

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CÂMPUS DE CHAPADÃO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

LUIZ EDUARDO DE MORAIS FERNANDES FONTES

**COINOCULAÇÃO COM *Bradyrhizobium* E *Azospirillum* EM SEMENTES
DE FEIJÃO-CAUPI INFLUENCIA NA NODULAÇÃO, TEOR DE
NITROGÊNIO E ISOFLAVONAS**

CHAPADÃO DO SUL – MS

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CÂMPUS DE CHAPADÃO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

LUIZ EDUARDO DE MORAIS FERNANDES FONTES

**COINOCULAÇÃO COM *Bradyrhizobium* E *Azospirillum* EM SEMENTES
DE FEIJÃO-CAUPI INFLUENCIA NA NODULAÇÃO, TEOR DE
NITROGÊNIO E ISOFLAVONAS**

Orientadora: Profa. Dra. Charline Zaratini Alves

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Agronomia, área de
concentração: Produção Vegetal.

CHAPADÃO DO SUL – MS

2024



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

DISCENTE: Luiz Eduardo de Moraes Fernandes Fontes

ORIENTADOR: Dra. Charline Zaratín Alves

TÍTULO: Coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* em sementes de feijão-caupi influencia na nodulação, teor de nitrogênio e isoflavonas.

AVALIADORES:

Prof. Dra. Charline Zaratín Alves

Prof. Dr. Alek Sandro Dutra

Prof. Dr. Márcio Dias Pereira

Chapadão do Sul, 22 de novembro de 2024.

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Charline Zaratín Alves, Professora do Magistério Superior**, em 22/11/2024, às 09:35, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Alek Sandro Dutra, Usuário Externo**, em 22/11/2024, às 09:39, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Márcio Dias Pereira, Usuário Externo**, em 22/11/2024, às 09:40, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5259847** e o código CRC **41575AAB**.

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Rod MS 306, Km 105, Caixa Postal 112

Fone: (67)3562-6351

CEP 79560-000 - Chapadão do Sul - MS

Referência: Processo nº 23455.000621/2024-26

SEI nº 5259847

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me permitido ter saúde e força para superar todas dificuldades ao longo do ciclo de estudos.

Aos meus pais, que mesmo distantes se fizeram presentes apoiando e dando forças para que eu chegasse ao final da pós-graduação.

Aos meus colegas que me apoiaram na condução do trabalho e professores de graduação que me incentivaram a prosseguir no caminho dos estudos através da pós-graduação.

A minha orientadora, professora Charline Zaratin Alves, por ter aceitado me orientar, pela paciência em tirar todas minhas dúvidas e todo aprendizado adquirido ao longo do curso, tanto em laboratório quando em sala de aula.

À Ana Carina Cândido, técnica do laboratório de tecnologia de sementes, pela ajuda em algumas avaliações e críticas construtivas na minha banca de qualificação.

Ao professor Cid Naudi Silva Campos, por todo aprendizado através das duas disciplinas ministradas ao longo da pós-graduação e críticas construtivas na minha banca de qualificação.

Ao professor Paulo Eduardo Teodoro por todo esclarecimento de dúvidas sobre meu ingresso e apoio na pós-graduação além dos ensinamentos pelas disciplinas obrigatórias ministradas.

Aos demais professores e técnicos que tive a oportunidade de conhecer e terem compartilhado seus conhecimentos de maneira eficiente.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa durante a realização do Mestrado e a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) pelo acolhimento através do programa de pós-graduação em Agronomia, campus Chapadão do Sul, proporcionando crescimento pessoal e profissional.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Dados de precipitação e temperatura ocorridos observados durante a safra 2023/2024.12
- FIGURA 2.** Análise de comparação de médias nas variáveis morfológicas e teor de nitrogênio para as variedades BRS Tumucumaque e BRS Novaera de feijão-caupi.15
- FIGURA 3.** Análise de comparação de médias nas variáveis morfológicas e teor de nitrogênio para as variedades BRS Tumucumaque e BRS Novaera de feijão-caupi.16
- FIGURA 4.** Análise de comparação de médias para o conteúdo de isoflavonas nas variedades BRS Tumucumaque e BRS Novaera de feijão-caupi.17
- FIGURA 5.** Análise de componentes principais nas variáveis morfológicas e teor de nitrogênio para as variedades BRS Tumucumaque e BRS Novaera de feijão-caupi.18
- FIGURA 6.** Análise de componentes principais para o conteúdo de isoflavonas nas variedades BRS Tumucumaque e BRS Novaera de feijão-caupi.20

RESUMO

COINOCULAÇÃO COM *Bradyrhizobium* E *Azospirillum* EM SEMENTES DE FEIJÃO-CAUPI INFLUENCIA NA NODULAÇÃO, TEOR DE NITROGÊNIO E ISOFLAVONAS

A fixação biológica de N é uma prática consolidada em diversas leguminosas como a soja; porém, ainda pouco explorada para o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). Nesse contexto, torna-se importante entender como a aplicação de bactérias fixadoras de nitrogênio (N), isoladas ou em associação, podem trazer benefícios quanto a demanda por N na cultura e reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados que afetam negativamente a sustentabilidade na agricultura pela emissão de gases de efeito estufa, assim como a contaminação das águas subterrâneas. O trabalho teve como objetivo verificar se a coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* favorece a nodulação, o teor de N e a produção de isoflavonas na cultura do feijão-caupi. O experimento foi instalado no delineamento em blocos casualizados, em duas variedades de feijão-caupi, com sete tratamentos que consistiram na testemunha, aplicação isolada de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*, e diferentes doses de coinoculação (75, 150, 225 e 300 mL para 50 kg⁻¹ de semente de cada inoculante), com quatro repetições. Aos 30 dias após a emergência foram avaliados número de nódulos, massa seca de nódulos, raiz e parte aérea das plantas. Também foram avaliados teor de N e conteúdo de isoflavonas no terceiro trifólio completamente desenvolvido a partir do ápice das plantas colhidos aos 45 dias após emergência. O uso isolado dos inoculantes não foi benéfico assim como a coinoculação em doses elevadas, pelo efeito de competição das bactérias na rizosfera vegetal. A coinoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense* em sementes de feijão-caupi para as variedades BRS Tumucumaque e BRS Novaera é uma prática viável e eficiente. A dose de 75 mL de cada inoculante favorece a formação de nódulos, desenvolvimento radicular e teor de N, além de contribuir para produção de isoflavonas na cultura do feijão-caupi para ambas variedades estudadas.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata* (L.) Walp, flavonóides, sustentabilidade, simbiose.

ABSTRACT

COINOCULATION WITH *BRADYRHIZOBIUM* AND *AZOSPIRILLUM* IN COWPEA SEEDS INFLUENCES NODULATION, NITROGEN CONTENT AND ISOFLAVONS

Biological N fixation is a well-established practice in various legumes such as soybeans; however, it is still little explored in the case of cowpeas (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). In this context, it is important to understand how the application of nitrogen-fixing bacteria (N), alone or in association, can bring benefits in terms of the demand for N in the crop and reduce the use of nitrogen fertilizers, which negatively affect sustainability in agriculture through the emission of greenhouse gases, as well as the contamination of groundwater. The aim of this study was to determine whether co-inoculation of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* favors nodulation, N content and isoflavone production in cowpea crops. The experiment was set up in a randomized block design, on two varieties of cowpea, with seven treatments consisting of the control, isolated application of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense*, and different doses of co-inoculation (75, 150, 225 and 300 mL for 50 kg⁻¹ of seed of each inoculant), with four replications. At 30 days after emergence, the number of nodules, dry mass of nodules, roots and aerial parts of the plants were assessed. N content and isoflavone content were also assessed in the fully developed third trefoil from the apex of the plants harvested 45 days after emergence. The use of inoculants alone was not beneficial, nor was co-inoculation in high doses, due to the effect of competition between the bacteria in the plant's rhizosphere. Co-inoculation of *B. japonicum* and *A. brasilense* in cowpea seeds for the BRS Tumucumaque and BRS Novaera varieties is a viable and efficient practice. The dose of 75 mL of each inoculant favors the formation of nodules, root development and N content, as well as contributing to the production of isoflavones in the cowpea crop for both varieties studied.

Keywords: *Vigna unguiculata* (L.) Walp, flavonoids, sustainability, symbiosis.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
MATERIAL E MÉTODOS	11
RESULTADOS	14
DISCUSSÃO	20
CONCLUSÕES	23
REFERÊNCIAS	23

INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), embora seja uma leguminosa originária do continente africano com produção elevada nessa região, tem seu cultivo amplamente difundido ao redor do mundo em setores agroecológicos de seca, como na América Latina e sul da Ásia (BOUKAR et al., 2018). Nos últimos anos, a cultura tem sido utilizada em várias regiões brasileiras devido ao alto valor alimentar dos seus grãos, sendo considerada fonte de proteína vegetal, ferro, zinco, carboidratos, vitaminas e aminoácidos, constituindo-se em um importante componente da dieta alimentar das populações de menor poder aquisitivo (FILGUEIRAS et al., 2009). Também conhecido como feijão de corda e feijão macassar, o feijão-caupi se destaca no Nordeste brasileiro, como cultura de grande importância socioeconômica por ser a principal fonte de proteína vegetal para a população, principalmente a rural (ALMEIDA et al, 2010).

A oferta de produto padronizado de alta qualidade e com oferta regular, vem despertando o interesse de agroindústrias de outras regiões e está contribuindo para a abertura de novos mercados para a cultura (FREIRE FILHO et al., 2011). A expectativa para o feijão-caupi é deixar de ser atividade exclusiva de subsistência para se tornar potencial agrícola; no entanto, a baixa produtividade no Brasil está relacionada, principalmente, à baixa tecnologia de produção, no qual o fornecimento de nutrientes merece destaque. Nesse contexto, um dos insumos agrícolas mais importantes para o feijão-caupi atingir elevada produtividade é o nitrogênio (N).

Dentre os gêneros de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) mais estudados destaca-se o *Bradyrhizobium* (ARAÚJO, 2008), cuja interação com as leguminosas é um exemplo de simbiose intensamente estudada, e os benefícios para a sustentabilidade agrícola são reconhecidos devido ao processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (HUNGRIA et al., 2008). Por outro lado, existe o *Azospirillum*, que são bactérias diazotróficas capazes de realizar a FBN e promover o crescimento radicular e da parte aérea das plantas, principalmente pela sua capacidade em produção de fito-hormônios como as auxinas, ganhando destaque quando associadas com algumas gramíneas, embora seja consolidado seu uso em leguminosas (KHOSO et al., 2024).

Nos casos em que se tem utilizado *Azospirillum brasilense* em leguminosas, o efeito benéfico da associação com rizóbio se deve na maior parte, à capacidade que a bactéria tem de produzir fitormônio que resulta em um maior desenvolvimento do sistema radicular, e, conseqüentemente na exploração de um volume maior de solo (DE BRUIJN, 2015). Também há efeito na nodulação precoce, pois o *Azospirillum* coloniza as raízes antes do *Rhizobium* e produz

flavonóides que atraem o *Rhizobium* (CHIBEBA et al., 2008), além do aumento no número de nódulos (COSTA et al., 2014). As isoflavonas são uma classe dos flavonóides, e desempenham importante papel no sistema de defesa nas plantas, principalmente em situações de estresses (ZHOU et al., 2024; HUANG et al., 2023).

Têm-se evidenciado que a combinação de diferentes microrganismos que interagem sinergicamente, podem aumentar a eficiência da inoculação, além de promover maior desenvolvimento e produtividade dos vegetais a eles associados, embora seja essencial observar as condições do solo e da rizosfera em que se encontram os microrganismos (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

Em relação às isoflavonas de modo geral, sua atuação na nodulação das plantas tem característica ampla. Elas participam de diversas etapas do processo, por meio da quimioatração das bactérias do gênero *Rhizobium* e o desenvolvimento do nódulo por meio da simbiose com bactérias fixadoras de N (ZHUANG et al., 2024; DONG e SONG, 2020). Nesse sentido, estudos que envolvem microrganismos e compostos secundários da classe das isoflavonas despertam interesse, principalmente pela crescente demanda em modelos sustentáveis de agricultura.

Com base nisso, o presente trabalho teve por objetivo almejar doses de recomendação de *B. japonicum* e *A. brasilense* que pudessem favorecer a nodulação, teor de N e isoflavonas na cultura do feijão-caupi nas cultivares BRS Tumucumaque e BRS Novaera.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Câmpus Experimental da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Câmpus de Chapadão do Sul – CPCS/UFMS na safra 23/24. Sua sede está a uma altitude de 790 m acima do nível do mar e situa-se nas seguintes coordenadas geográficas: Latitude - 18° 41' 33" Sul e Longitude - 52° 40' 45" Oeste de Greenwich. A classe de solo predominante é Latossolo Vermelho Distrófico e o clima é, segundo Köppen, do tipo tropical úmido (Aw), com estação chuvosa no verão e seca no inverno, além da precipitação média anual de 1.850 mm. Na Figura 1 são apresentados os dados de precipitação e temperatura local durante o período de experimento.

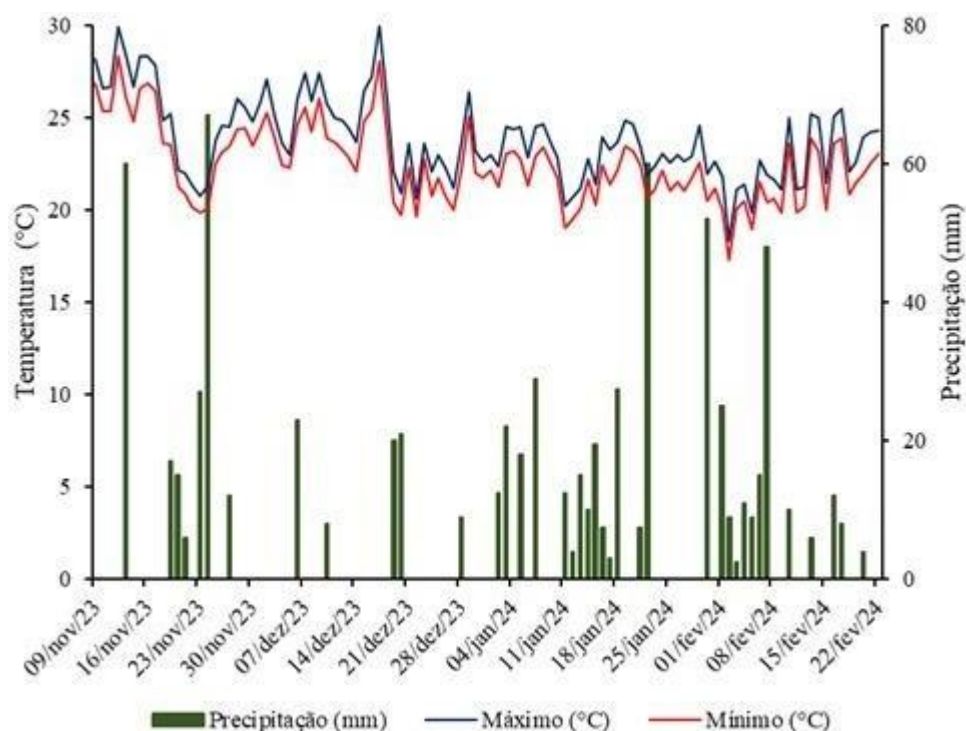


Figura 1 - Condições climáticas observadas durante a safra 2023/2024 na região da área experimental. Fonte: Inmet.

Antes da instalação do experimento foi realizada análise de solo na área, com os seguintes índices: pH (CaCl₂) = 5,0; Al trocável (cmol dm⁻³) = 0,07; Ca+Mg (cmol dm⁻³) = 4,10; P (mg dm⁻³) = 21,9; K (mg dm⁻³) = 99; matéria orgânica (g dm⁻³) = 26,4; V (%) = 51,5; m (%) = 1,6; soma de bases (cmol dm⁻³) = 4,35; CTC (cmol dm⁻³) = 8,4; na camada de 0-0,20 m e pH (CaCl₂) = 4,7; Al trocável (cmol dm⁻³) = 0,09; Ca+Mg (cmol dm⁻³) = 2,00; P (mg dm⁻³) = 5,1; K (mg dm⁻³) = 83; matéria orgânica (g dm⁻³) = 19,8; V (%) = 32; m (%) = 3,9; soma de bases (cmol dm⁻³) = 2,21; CTC (cmol dm⁻³) = 6,9; na camada de 0,20-0,40 m.

A adubação foi feita de acordo com a recomendação para a cultura do feijão-caupi, com ausência de adubação nitrogenada (MELO et al., 2018). Não houve necessidade de calagem e o preparo do solo adotado foi o cultivo mínimo. A cultura foi instalada na época da primeira safra, com o plantio no final de outubro. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com sete tratamentos e quatro repetições. As parcelas consistiram de cinco linhas de seis metros de comprimento, no espaçamento de 0,45m entre linhas, sendo consideradas como área útil, as três linhas centrais, desprezando-se 0,5m de cada extremidade. Foi utilizada a densidade de 200 mil plantas ha⁻¹, com 9 plantas m⁻¹.

As variedades utilizadas foram a BRS BRS Tumucumaque e BRS BRS Novaera,

lançadas pela Embrapa Meio-Norte, sendo recomendadas para a Região Centro- Oeste. Os tratamentos consistiram da inoculação isolada e em combinação de *B. japonicum* (Gelfix 5® SEMIA 5079 e SEMIA 5080 – 5×10^9 UFC mL⁻¹) e *A. brasilense* (Masterfix L® Abv5 e Abv6 – 5×10^9 UFC mL⁻¹), no tratamento de sementes. As doses foram aplicadas para 50 kg de semente, sendo: T1 (Test) – testemunha (sem inoculação); T2 (Brady) – inoculação com *B. japonicum* (150 mL); T3 (Azo) – inoculação com *A. brasilense* (150 mL); T4 (B+A75) – *B. japonicum* + *A. brasilense* (75 mL + 75 mL); T5 (B+A150) – *B. japonicum* + *A. brasilense* (150 mL + 150 mL); T6 (B+A225) – *B. japonicum* + *A. brasilense* (225 mL + 225 mL); e T7 (B+A300) – *B. japonicum* + *A. brasilense* (300 mL + 300 mL).

As sementes foram tratadas com Standak Top® e Protreat®, a fim de evitar o ataque de pragas e doenças que podem prejudicar o estabelecimento da cultura. As BPCP foram aplicadas à sombra, no momento que antecedeu a semeadura, sendo acondicionadas em sacos plásticos e adicionadas as respectivas doses por tratamento, com agitação por dois minutos. O plantio foi realizado manualmente de acordo a disposição dos tratamentos.

Aos 30 dias após a emergência (DAE) foram adentrados dois metros, de uma linha após a bordadura de cada parcela, colhendo-se cinco plantas seguidas, sendo retiradas cuidadosamente do solo de forma que se preservasse ao máximo o sistema radicular, no qual se avaliou o número de nódulos planta⁻¹ (NN), massa seca de nódulos planta⁻¹ (MSN) e a fitomassa seca de raiz (MSR) e parte aérea (MPA). O NN de cada planta foi contabilizado e calculado a média. Para a fitomassa seca, as plantas tiveram o sistema radicular, parte aérea e nódulos acondicionados em sacos de papel e secos em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C, até massa constante, sendo posteriormente pesadas em balança de precisão de 0,0001g.

Para determinar o teor de nitrogênio (N), foi colhido o terceiro trifólio completamente desenvolvido a partir do ápice da planta, os quais foram lavados em água corrente, e posteriormente colocados em solução detergente neutro a 0,1%, solução de ácido clorídrico (HCl) a 0,3% e água deionizada (PRADO, 2021). O material vegetal foi seco em estufa de circulação forçada de ar (65 ± 5 °C) até peso constante, sendo obtida a matéria seca das folhas de feijão-caupi. O material foi moído e pesado (0,1 g) após a secagem, seguindo a técnica de titulação Kjeldahl. O material passou por digestão, destilação e titulação com ácido sulfúrico (H₂SO₄) sendo determinado o teor de N em extratos obtidos pela digestão sulfúrica.

Para a extração das isoflavonas, 50 mg das amostras vegetais de folhas secas e moídas foram adicionadas em eppendorf de 2 mL, no qual foi adicionado 1,5 mL de metanol 70% contendo ácido acético (0,1%). A mistura foi agitada brevemente e depois incubada por 2 h em ultrassom. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 15 min e o

sobrenadante obtido foi filtrado por meio de uma seringa com filtro de 0,2 μm e transferidos para vials de 1,5 mL antes da injeção em um sistema de cromatografia líquida de ultra performance (UPLC). Alíquotas de 10 μL foram utilizadas para injeção direta no equipamento, com três repetições (CARRÃO-PANIZZI et al., 2002).

A separação e quantificação das isoflavonas foram realizadas em cromatógrafo líquido no sistema UPLC Waters Acquity série 1100, com injetor automático de amostras. Foi utilizado uma coluna de fase reversa do tipo HSS C18, 1,8 μm (diâmetro interno de 2,1 mm (i.d.) \times 100 mm) com uma pré-coluna Acquity HSS C18, 1,8 μm (2,1 mm i.d. \times 5 mm). Para a separação das isoflavonas foi utilizado o sistema de gradiente linear binário, tendo como fases móvel: água Milli-Q e ácido acético 0,1% como solvente A e acetonitril e ácido acético 0,1% como solvente B. O gradiente inicial foi de 99% para o solvente A e 1,0% para o solvente B de 0 a 9 minutos, 41,2% A e 58,8% B de 9 a 9,1 minutos, 100% B de 9,1 a 11 minutos e retornando a 99% A e 1% B aos 11 minutos e permanecendo assim até 15 minutos, que foi o tempo de corrida para cada amostra (CARRÃO-PANIZZI et al., 2002). A vazão da fase móvel foi de 0,289 mL min^{-1} e a temperatura da coluna durante a corrida foi de 30 $^{\circ}\text{C}$.

A detecção das isoflavonas foi realizada utilizando o detector de arranjo de fotodiodo da marca Waters, ajustado para o comprimento de onda igual a 254 nm. Para a detecção das isoflavonas foram utilizados padrões adquiridos comercialmente de daidzein (D1), daidzin (D2) e genistin (G1), solubilizados em metanol 70%, nas seguintes concentrações: 0,000125, 0,0002, 0,0005, 0,001, 0,01, 0,02 mg mL^{-1} . A identidade qualitativa e quantitativa do pico foi confirmada comparando os tempos de retenção e os espectros de UV de compostos individuais pelo método de adição padrão.

Todos os solventes utilizados nas análises cromatográficas foram grau HPLC, e antes da utilização foram filtrados à vácuo em membrana de 0,2 μm de porosidade e posteriormente desgaseificados em sistema a vácuo utilizando ultrasom. A água utilizada foi destilada e em seguida ultrapurificada em sistema Milli-Q sendo posteriormente desgaseificada.

As variedades foram analisadas separadamente. Os dados foram submetidos à análise de variância, comparando-se as médias pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. A análise multivariada de componentes principais foi utilizada para analisar os dados, por meio do software R, versão 3.5.1 (R CORE TEAM, 2018).

RESULTADOS

Os tratamentos de inoculação e coinoculação foram significativos para NN, MSN, MSR e MSPA para ambas variedades. O tratamento B+A75 proporcionou maior NN para as duas

variedades, embora para a BRS Novaera, não tenha diferido do B+A225 (Figuras 2A e 2B). Para MSN (Figura 2C e 2D), MSR (Figura 2E e 2F) os tratamentos B+A75, B+A150 e B+A225 mostraram melhor desempenho para a variedade BRS Tumucumaque; assim como B+A75 e B+A225 mostraram superioridade estatística para a BRS Novaera.

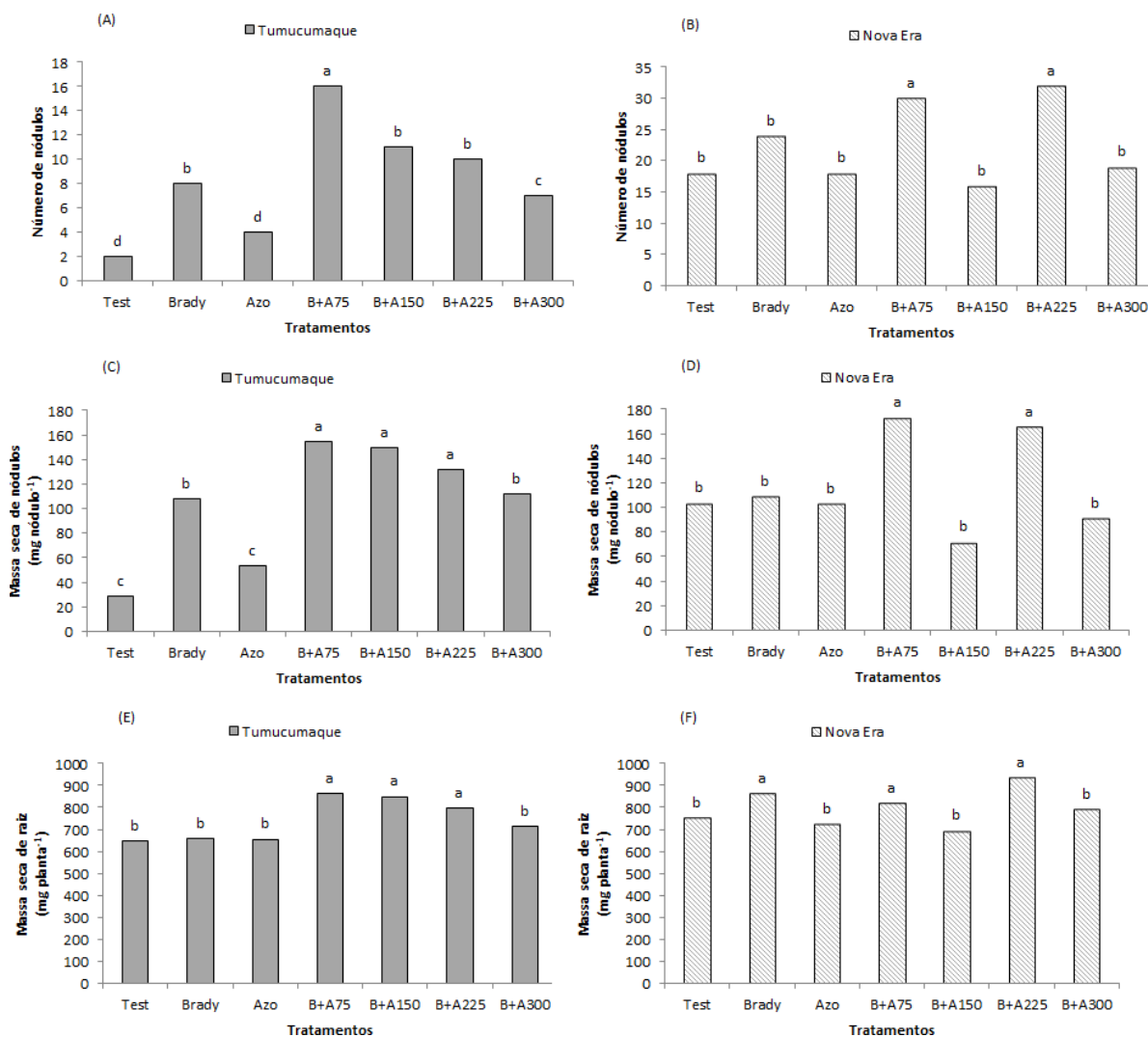


Figura 2 – Número de nódulos (A, B), massa seca de nódulos (C, D), massa seca de raiz (E, F) para as variedades BRS Tumucumaque e BRS Novaera respectivamente, em função da inoculação e coinoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense* em sementes de feijão-caupi.

Para MSPA os tratamentos B+A75, B+A150 e B+A225 tiveram quantias superiores estatisticamente na variedade BRS Tumucumaque, já para variedade Novaera os tratamentos com Bradyrhizobium, B+A75 e B+A225 tiveram resultados melhores (Figuras 3A e 3B). Para o teor de N (Figuras 3C e 3D), os tratamentos B+A75, B+A150 e B+A225 apresentaram melhor desempenho na variedade BRS Tumucumaque; e B+A75 e B+A225 apresentaram maiores

valores de N para a variedade BRS Novaera.

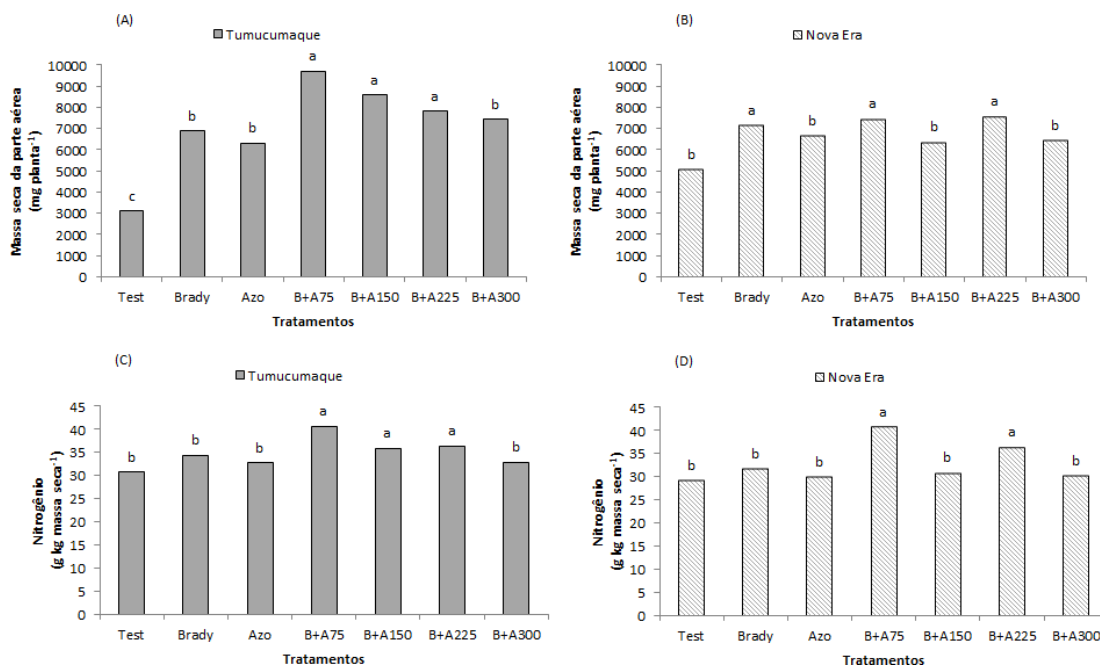


Figura 3 – Massa seca de parte aérea (A, B) e teor de N (C, D) para as variedades BRS Tumucumaque e BRS Novaera respectivamente, em função da inoculação e coinoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense* em sementes de feijão-caupi.

Para as isoflavonas, o tratamento B+A75 apresentou melhor desempenho para daidzein (Figura 4A), daidzin (Figura 4C), genistin (Figura 4E) e isoflavonas totais (Figura 4G) na variedade BRS Tumucumaque. Na BRS Novaera, os tratamentos B+A75, B+A225 e B+A300 mostraram melhor desempenho para daidzein (Figura 4B); B+A75 para daidzin (Figura 4D); B+A75 e B+A150 para genistin (Figura 4F) e B+A75 para isoflavonas totais (Figura 4H).

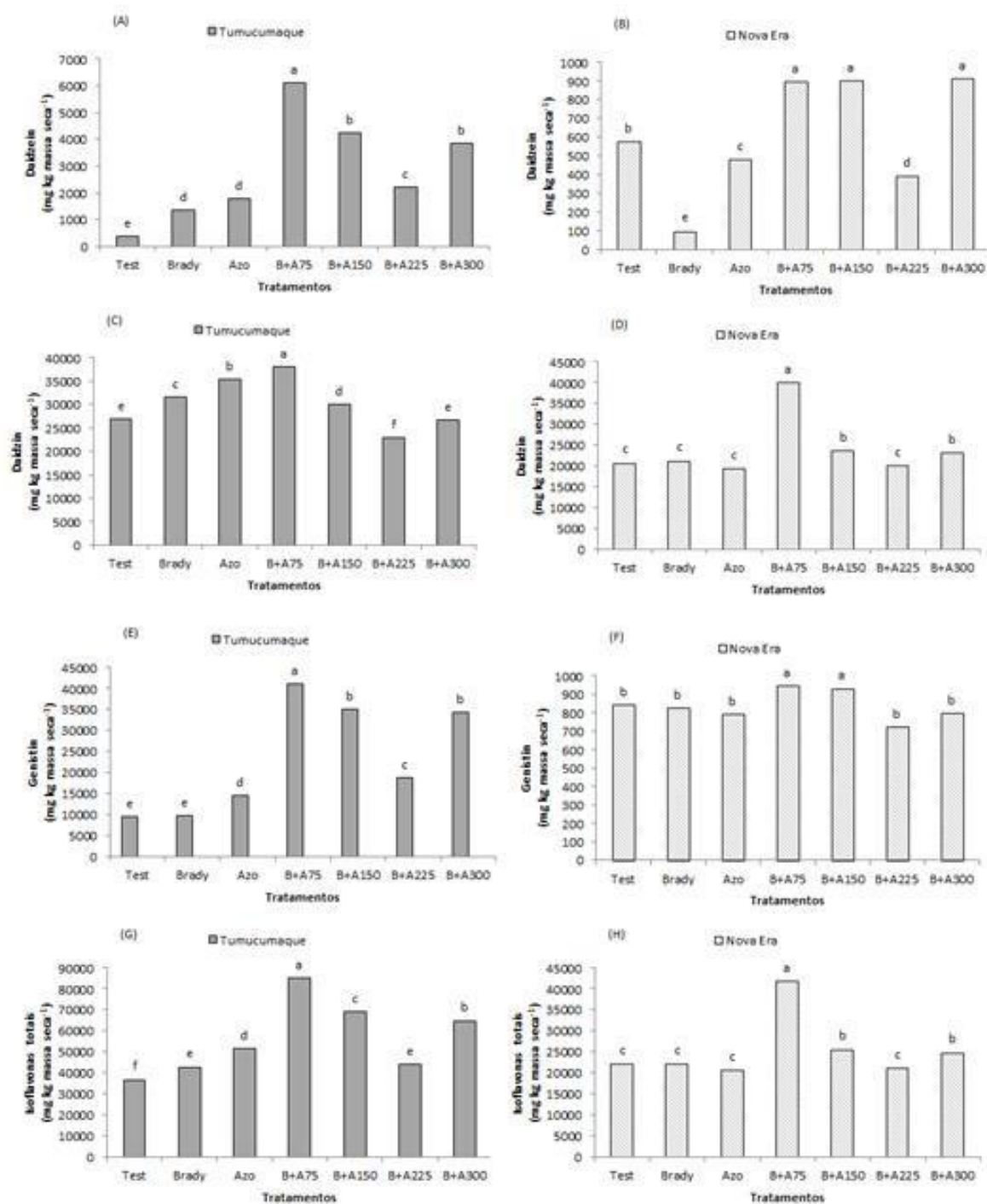


Figura 4 – Daidzein (A, B), daidzin (C, D), genistein (E, F) e isoflavonas totais (G, H) para as variedades BRS Tumucumaque e BRS Novaera respectivamente, em função da inoculação e coinoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense* em sementes de feijão-caupi.

Os resultados da análise de componentes principais (ACP) para NN, MSN, N, MSR e

MSPA tiveram seus vetores com maior proximidade dos tratamentos B+A75, B+A150 e B+A225, ao contrário dos tratamentos com *B. japonicum*, *A. brasilense*, B+A300 e a testemunha que ocupam quadrantes opostos sem relação com o conjunto de dados para a variedade BRS Tumucumaque (Figura 4A). Para a BRS Novaera, o N, MSN, NN, e MSPA tiveram seus vetores próximos ao tratamento B+A75, com exceção da MSR que ficou disposta no quadrante inferior com maior proximidade ao tratamento B+A225.

Por outro lado, os tratamentos com *B. japonicum*, *A. brasilense*, B+A150, B+A300 e a testemunha tiveram seus vetores em extremos opostos indicando uma relação negativa para o conjunto de dados (Figura 4B). Vale destacar que a porcentagem de variação explicada para os dois primeiros componentes representaram valor acima de 90% da variação total dos dados (Figuras 4A e 4B).

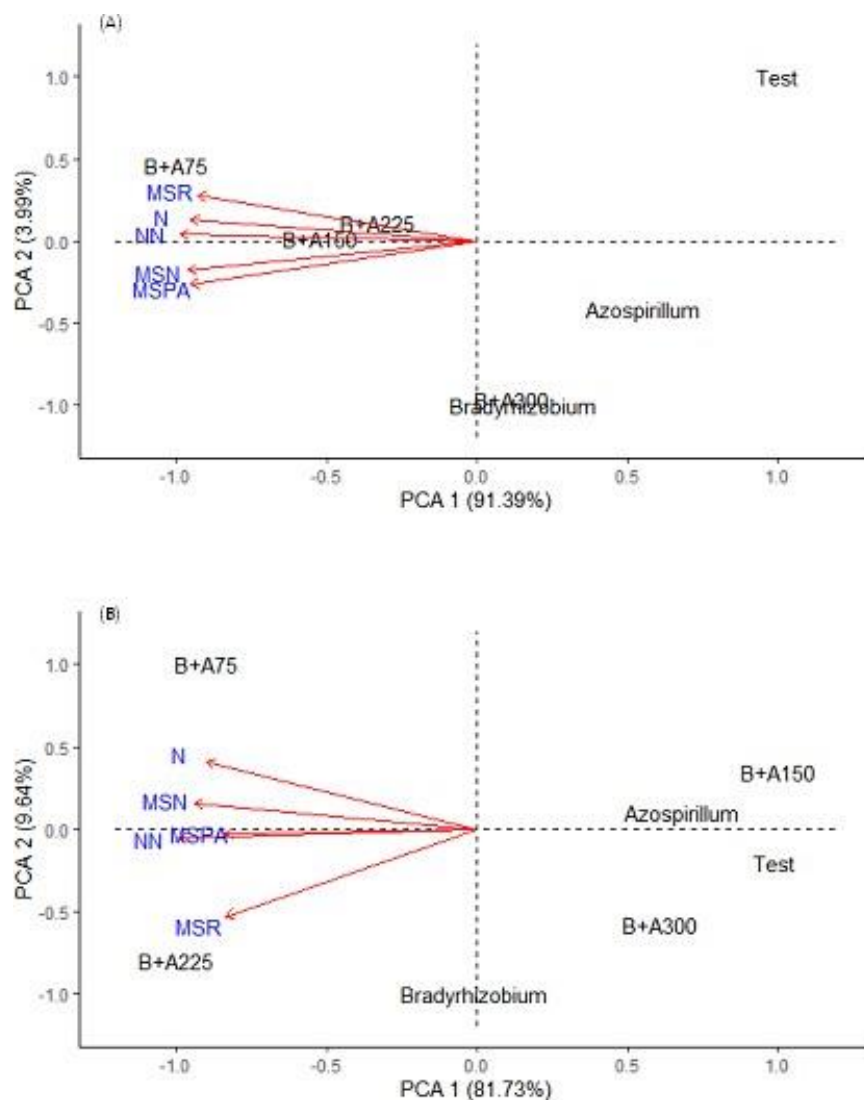


Figura 5 - Análise de componentes principais para N, número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR) e massa seca da parte aérea (MSPA), em função da

coinoculação de diferentes doses das bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense* em plantas de feijão-caupi para as variedades BRS Tumucumaque (A) e BRS Novaera (B).

Na ACP para as isoflavonas, os vetores de D1, D2, G1 e Isotot na variedade BRS Tumucumaque mostraram proximidade como tratamento B+A75. Os tratamentos B+A150 e B+A300 apresentaram pouca proximidade com as variáveis analisadas, estando dispersos no quadrante inferior, assim como os tratamentos com *B. japonicum*, *A. brasilense*, B+A225 e a testemunha, que ficaram em quadrantes opostos comparados com B+A75 (Figura 5A).

Para a variedade BRS Novaera, as variáveis D1 e D2 além dos Isotot tiveram seus vetores próximos do tratamento B+A75, embora a variável G1 apresentou distância similar para os tratamentos B+A150 e B+A300. Por fim, os tratamentos com bactérias isoladas, *B. japonicum*, *A. brasilense*, além do tratamento B+A225 e a testemunha tiveram seu posicionamento em quadrantes opostos (Figura 5B). Assim como nas Figuras 4A e 4B se destaca a porcentagem de variação explicada para cada componente, nas quais os dois primeiros componentes representaram em conjunto valor acima de 90% da variação total dos dados.

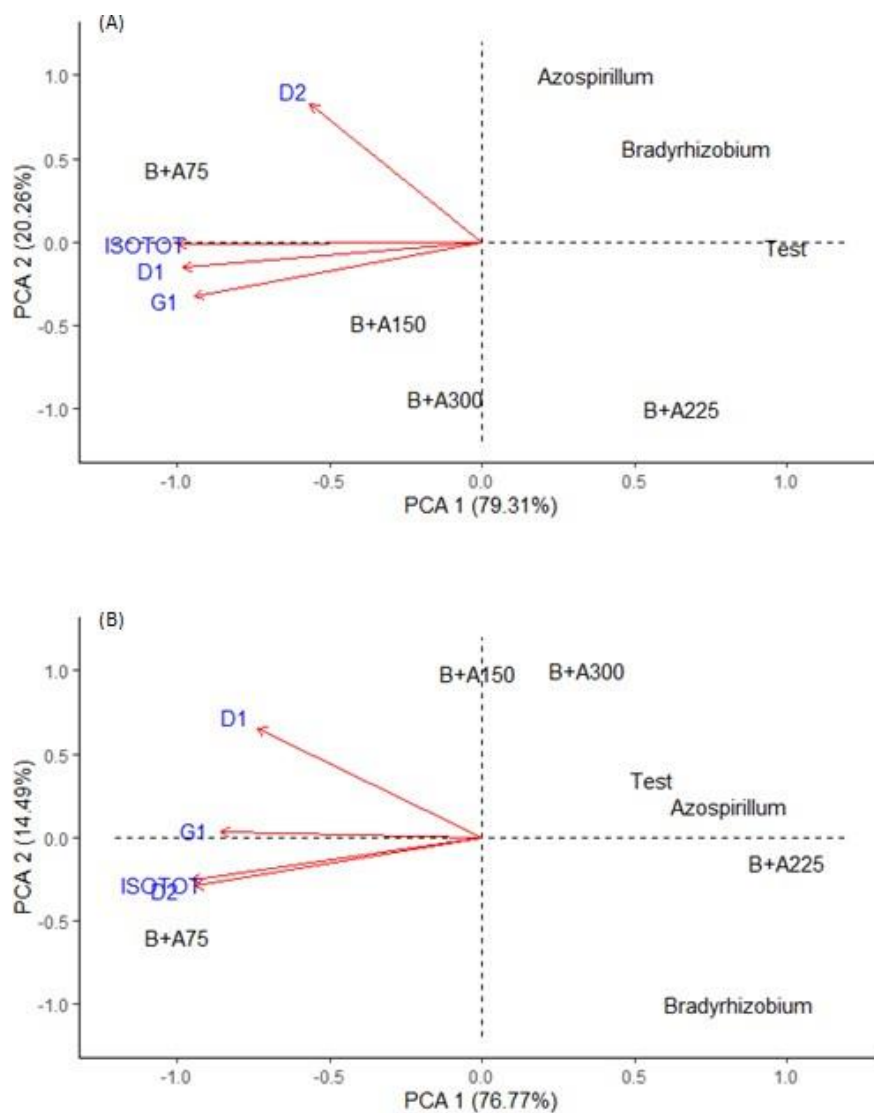


Figura 6 - Análise de componentes principais para daidzein (D1), daidzin (D2), genistin (G1) e isoflavonas totais (ISOTOT), em função da coinoculação de diferentes doses das bactérias *B. japonicum* e *A. brasilense* em plantas de feijão-caupi para as variedades BRS Tumucumaque (A) e BRS Novaera (B).

DISCUSSÃO

O N tem papel fundamental no metabolismo vegetal sendo um dos elementos mais requeridos pelas plantas, participando da síntese de ácidos nucleicos, proteínas e outros compostos nitrogenados. Dessa forma, as bactérias fixadoras de N, como *B. japonicum* e *Azospirillum*, surgem como grandes aliadas na nutrição de plantas no cultivo de leguminosas como a soja e o feijão-caupi (SOUMARE et al., 2020; ULZEN et al., 2016). O teor de N pode estar associado a quantidade de nódulos e o crescimento vegetativo da parte aérea e radicular ao apresentarem maior fitomassa seca, fato observado no tratamento B+A75 (Figuras 2 e 3).

Dados semelhantes foram encontrados por Ayalew et al. (2022) com o uso de *Bradyrhizobium* como bactéria fixadora de N na cultura do feijão-caupi.

Almeida et al. (2022) destacaram a importância do uso dos bioinsumos na agricultura com sua capacidade em promover o máximo desempenho de vários caracteres nas plantas, como o crescimento de raízes e nódulos, melhorando a absorção e aproveitamento dos nutrientes disponíveis no solo. Prando et al. (2024) relataram melhor desempenho da nodulação com acréscimo de 35% na cultura da soja com uso da coinoculação, além da redução na emissão de gases de efeito estufa. Esses dados estão de acordo com o presente trabalho, pois no tratamento B+A75 a nodulação dobrou quando comparado ao tratamento somente com *B. japonicum* na variedade BRS Tumucumaque e aumentou 25% para a variedade BRS Novaera (Figura 2).

Atualmente vários trabalhos relatam a coinoculação como uma técnica vantajosa. Leite et al. (2022) verificaram aumento significativo no crescimento vegetal, além de parâmetros produtivos na cultura do feijão comum através da coinoculação com cepas de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium tropici*. Em genótipos de feijão-caupi, o uso associado da bactéria *Bacillus subtilis* com água ácida de uma mina abandonada de ouro na África, Nevhulaudzi et al. (2020) observaram aumento significativo na nodulação, assim como na massa fresca e seca de raízes, demonstrando que os efeitos da aplicação de microorganismos não se limitam a parâmetros nutricionais, mas também tendem ser benéficos em situações extremas, como em solos contaminados.

As isoflavonas têm relação com a nodulação por serem secretadas pelas raízes estabelecendo uma associação com os rizóbios, ajudando na formação dos nódulos pela ativação da sua biossíntese (LI et al., 2018; XU e WANG, 2023). Este fato pode estar relacionado com o tratamento B+A75, no qual foi obtido maior número de nódulos assim como conteúdo de isoflavonas (Figuras 2, 4, 5 e 6). O uso da inoculação e coinoculação tende a ser uma ferramenta somatória para cultura do feijão-caupi em variedades já consolidadas no mercado, quando se objetiva incrementos quantitativos e qualitativos relacionados a metabólitos secundários do grupo das isoflavonas e suas propriedades antioxidantes.

Miransari e Smith (2009), ao usarem isoflavona genistin em plantas de soja para alívio de estresse salino, verificaram aumento no número de nódulos e parte aérea da cultura com *B. japonicum*. Este fato pode estar associado com a transcrição de genes que são relacionados a biossíntese das isoflavonas, como visto no presente trabalho, no qual o NN e MSPA tiveram maiores valores quando também houve incremento no conteúdo de genistin com tendência similar de ambos (Figuras 2, 3, 4, 5 e 6). Em plantas de *Sophora flavescens*, Mai et al. (2024)

identificaram que a biossíntese de metabólitos, como os flavonóides, é enriquecido por vias biossintéticas da nodulação, em particular das isoflavonas, fator relevante que agrega na exploração dos estudos em plantas da família das fabáceas, como é o caso do feijão-caupi, pela sua capacidade de nodulação.

Quando se trata de metabólitos secundários, as isoflavonas exercem importância cada vez maior para as pesquisas, com base em suas propriedades como suplementos alimentares com intuito de melhorar a saúde humana e animal, o que determina a otimização desses compostos nas plantas (GALATRO et al., 2024). Karuwal et al. (2023) mostraram que a genética tem influência considerável no conteúdo de isoflavonas na cultura de feijão-caupi, no qual foram identificadas variedades com maior teor desses compostos, devido a pigmentação do tegumento das sementes. Este fato se assemelha ao que foi observado neste trabalho; o teor de isoflavonas da variedade BRS Tumucumaque foi muito superior ao da BRS Novaera mostrando que a genética tem grande influência na produção de compostos secundários nas plantas (Figura 4C).

O fato da maior quantidade de isoflavonas estar associada ao tratamento B+A75 se deve, provavelmente, a maior produção de nódulos e desenvolvimento radicular da cultura, pois esses compostos são produzidos na zona de infecção dos nódulos, além do envolvimento das rizobactérias com a produção de fito-hormônios como as auxinas (GARCIA et al., 2015; LIU e MURRAY, 2016). Essa relação pode ser fundamentada pelo mecanismo das isoflavonas no transporte de auxinas quando se ligam a proteínas transportadoras desse hormônio, onde é aumentado proporcionando surgimento de nódulos nas raízes das plantas (DONG e SONG, 2020). Além disso, alguns estudos mostram que isoflavonas do grupo daidzein tem grande atuação em fatores que envolvem nodulação, como a promoção de crescimento bacteriano em casos isolados *in vitro*, indução da expressão de genes e promoção do crescimento de células da bactéria *B. japonicum* (HARTWIG et al. 1991; VAN NOORDEN et al. 2006). Nesse caso, é justificável a tendência similar da análise de componentes principais para o tratamento B+A75 para isoflavonas, com número de nódulos e massa seca da raiz (Figuras 5 e 6).

A rizosfera vegetal é ocupada por diversos tipos de bactérias, que podem ser patogênicas ou benéficas. No entanto, esse meio pode se tornar competitivo para sobrevivência desses seres, com emprego de diversos meios de enfrentamento intra e interespecíficos (CHEPSERGON e MOLELEKI, 2023). Dessa forma, a coinoculação B+A75 possivelmente garantiu um número de células de BPCP que minimizou a competição entre elas. No tratamento B+A300 houve redução dos valores da maioria das variáveis, fato que pode ser atribuído à possível competição pelo alto número de colônias de bactérias. Além disso, na cultura da soja,

Rego et al. (2018) também verificaram que a coinoculação com *B. japonicum* e *A. brasilense* beneficiou o desenvolvimento das plantas, incrementando os componentes de produção em doses menores.

Explorando o potencial da cultura do feijão-caupi, alguns estudos mostram o efeito benéfico da associação de microrganismos. Rodrigues et al. (2012) constataram que o feijão-caupi respondeu significativamente a inoculação de estirpes de *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus* coinoculados com a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. A coinoculação *Bradyrhizobium* e *Bacillus subtilis* favoreceu o aumento na nodulação em feijão-caupi. A eficiência simbiótica da colonização conjunta em feijão-caupi pela interação *Paenibacillus* e as estirpes de *Bradyrhizobium* nos diferentes métodos de inoculação se mostrou variável (SILVA et al., 2006).

Existe uma crescente demanda por um modelo sustentável de agricultura. A redução no uso de fertilizantes inorgânicos surge como uma rota alternativa para a mitigação da emissão de gases de efeito estufa nas propriedades, principalmente quando relacionado ao uso de adubos nitrogenados.

CONCLUSÕES

O uso isolado dos inoculantes não foi benéfico assim como a coinoculação em doses elevadas, pelo efeito de competição das bactérias na rizosfera vegetal.

A coinoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense* em sementes de feijão-caupi é uma prática viável e eficiente em diferentes doses. A dose de 75 mL de cada inoculante favorece a formação de nódulos, desenvolvimento radicular e teor de N, além de contribuir para produção de isoflavonas na cultura do feijão-caupi para ambas variedades estudadas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.L.G. et al. 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.

ALMEIDA, A. da S. et al. Biological inputs, more economy and greater sustainability. **Colloquium Agrariae**, v.18, n.4, p.53-60, 2023.

AYALEW, T. et al. Leaf growth, gas exchange and assimilation performance of cowpea varieties in response to *Bradyrhizobium* inoculation. **Heliyon**, v.8, n.1, p.1-8, 2022.

ARAÚJO, F.F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis* formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.2, p.456-462, 2008.

BOUKAR, O. et al. Cowpea (*Vigna unguiculata*): Genetics, genomics and breeding. **Plant breeding**, v. 138, p. 415-424, 2019.

CARRÃO-PANIZZI, M.C. et al. Extraction time for isoflavone determination. **Braslian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n.4, p. 515-518, 2002.

CHEPSERGON, J.; MOLELEKI, L. N. Rhizosphere bacterial interactions and impact on plant health. In Current Opinion in Microbiology. **Elsevier Ltd**, v.73, e102297, 2023.

CHIBEBA, A.M. et al. Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. **American Journal of Plant Science**, v. 6, n.10, p.1641-1649, 2015.

CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo primeiro levantamento, agosto/2024 - **Companhia Nacional de Abastecimento**, Brasília: Conab, v.11, n.11, 129p, 2024.

COSTA, E.M. et al. Resposta da soja a inoculação e co-inoculação com bactérias promotoras do crescimento vegetal e *Bradyrhizobium*. **Enciclopédia Biosfera**, v.10, n.19, p.1678-1689, 2014.

DE BRUIJN, F. **Biological nitrogen fixation**. New Jersey: John Wiley & Sons, v.6, n.6, p. 1089-1101, 2016.

DONG, W., SONG, Y. The significance of flavonoids in the process of biological nitrogen fixation. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 16, p.1-18, 2020.

FILGUEIRAS, G.C. et al. Aspectos socioeconômicos. In: ZILLI, J.E.; VILARINHO, A.A.; ALVES, J.M.A. (Eds.). **A cultura do feijão-caupi na Amazônia brasileira**. Boa Vista, RR: Embrapa Roraima, v.1, p.23-58, 2009.

FREIRE FILHO, F.R. et al. Produção, melhoramento genético e potencialidades do feijão-caupi no Brasil. **IV Reunião nacional de Biofortificação**, Teresina, Piauí, Brasil, v.1, p.1-80, 2011.

GALATRO, A. et al. Plants as a source of dietary bioactives: Flavonoids and basis for their health benefits. **Aspects of Molecular Medicine**, v. 4, e.100048, 2024.

GARCIA, T.V. et al. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p.1-9, 2015.

HARTWIG, U.A. et al. Flavonoids released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiology**, v. 95, n. 3, p. 1-7, 1991.

HUANG, X. et al. Integrated metabolomic and transcriptomic analysis of specialized metabolites and isoflavonoid biosynthesis in *Sophora alopecuroides* L. under different degrees of drought stress. **Industrial Crops and Products**, v. 197, e116595, 2023.

HUNGRIA, M. et al. Conjunto mínimo de parâmetros para avaliação da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.83-91, 2008.

KARUWAL, R. L. et al. Identification of metabolite profiles of local cowpeas (*Vigna unguiculata* L. Walp) from Southwest Maluku, Indonesia. **Journal of Agriculture and Food Research**, v.14, e100788, 2023.

KHOSO, M. A. et al. Impact of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on plant nutrition and root characteristics: Current perspective. **Plant Stress**, v.11, e100341, 2024.

LEITE, R. de A. et al. Co-inoculation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* promotes growth and yield of common beans. **Applied Soil Ecology**, v.172, e104356, 2022.

LI, K. et al. Structure-activity relationship of eight high content flavonoids analyzed with a preliminary assign-score method and their contribution to antioxidant ability of flavonoids-rich

extract from *Scutellaria baicalensis* shoots. **Arab. J. Chem**, v.11, n.2, p.159–170, 2018.

LIU, C. W.; MURRAY, J. D. The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: An update. **Plants**, v.5, n.3, p.4045-4053, 2016.

MAI, C. et al. Integrated metabolomic and transcriptomic assisted identification of nodulated *Sophora flavescens* SflF7GT for improvement of flavonoid content. **Industrial Crops and Products**, v. 220, e119194, 2024.

MELO, F. B. et al. Recomendação de adubação e calagem para o feijão-caupi na região Meio-Norte do Brasil. **Emprapa Meio Norte**, p. 1-8, 2018.

MIRANSARI, M., SMITH, D. Alleviating salt stress on soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) - *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis, using signal molecule genistein. **Eur. J. Soil Biol**, v.45, n.2, p.146-152, 2009.

NEVHULAUDZI, T. et al. Interaction effect of *Bacillus subtilis* co-inoculation and minewater irrigation on cowpea's growth, physiology and nutritional quality. **Scientific African**, v.9, e00541, 2020.

PÉREZ-MONTAÑO, F. et al. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. **Microbiological research**, v. 169, n.5-6, p. 325-336, 2014.

PRADO, R. M. Mineral nutrition of tropical plants. **Springer**. 1.ed. Cham, Switzerland: Fapesp, 2021. 339 p.

PRANDO, A. M. et al. Benefits of soybean co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: Large-scale validation with farmers in Brazil. **European Journal of Agronomy**, v.155, e127112, 2024.

REGO, C.H.Q. et al. Co-inoculation with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* increases yield and quality of soybean seeds. **Agronomy Journal**, v.110, n.6, p.1-8, 2018.

RODRIGUES, A.C. et al. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. **Bioscience Journal**, v.28, n.1, p.196-202, 2012.

SILVA, V.N. et al. Atuação de rizóbios com rizobactéria promotora de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **Acta Scientiarum Agronomy**, v.28, n.3, p.407-412, 2006.

SOUMARE, A. et al. Exploiting biological nitrogen fixation: A route towards a sustainable agriculture. **Plants**, v.9, n.8, p.1-22, 2020.

ULZEN, J. et al. *Bradyrhizobium* Inoculants Enhance Grain Yields of Soybean and Cowpea in Northern Ghana. **Plant Sci**, v.7, p.1-9, 2016.

VAN NOORDEN, G.E. et al. Defective long-distance auxin transport regulation in the *Medicago truncatula* super numeric nodules mutant. **Plant Physiology**, v. 140, n. 4, p. 1-13, 2006.

XU, P.; WANG, E. Diversity and regulation of symbiotic nitrogen fixation in plants. In: **Current Biology Cell Press**, v.33, n.11, p.543-559, 2023.

ZHOU, C. et al. Soybean plants enhance growth through metabolic regulation under heterogeneous drought stress. **Agricultural Water Management**, v. 303, e109029, 2024.

ZHUANG, Y. et al. Rhizosphere metabolic cross-talk from plant-soil-microbe tapping into agricultural sustainability: Current advance and perspectives. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.210, e108619, p. 1-13, 2024.