

AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA À SECA EM FEIJOEIRO  
INOCULADO COM RIZÓBIO E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS  
ENDOFÍTICAS NA PRESENÇA DE ÁCIDOS HÚMICOS

**ANTÓNIO DA PIEDADE MELO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2014

AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA À SECA EM FEIJOEIRO  
INOCULADO COM RIZÓBIO E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS  
ENDOFÍTICAS NA PRESENÇA DE ÁCIDOS HÚMICOS

**ANTÔNIO DA PIEDADE MELO**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas

Coorientador: Prof. Fábio Lopes Olivares

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2014

AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA À SECA EM FEIJOEIRO  
INOCULADO COM RIZÓBIO E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS  
ENDOFÍTICAS NA PRESENÇA DE ÁCIDOS HÚMICOS

**ANTÔNIO DA PIEDADE MELO**

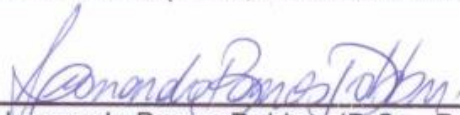
Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 11 de fevereiro de 2014

Comissão Examinadora



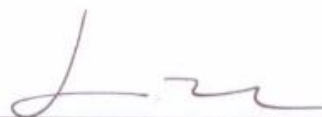
Prof. Leonardo O. Médici (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) – UFRRJ



Prof. Leonardo Barros Dobbss (D.Sc., Produção Vegetal) – UVV



Dr.ª Inga Gonçalves de Azevedo (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – UENF



Prof. Luciano Pasqualoto Canellas (Ph.D., Ciência do Solo) – UENF  
(Orientador)

Aos meus pais Julião Melo e Nhataha Maria Helena Bernardo (*in memoriam*) pela educação;

Aos meus queridos filhos Tony Jolie Melo e Celton Jean Melo, com todo o carinho;

À minha amada esposa, Célia das Eiras Melo, pelo amor, pelo carinho, pela compreensão e pelo suporte emocional;

Aos meus irmãos: Nina, Nené, John (*in memoriam*), Julinho, Dino, Dito e Lulu, pelo companheirismo.

Dedico e ofereço.

## AGRADECIMENTOS

A Deus Pai todo poderoso;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e ao Laboratório de Solos (LSOL), pela oportunidade de realização deste curso;

Ao Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para Agricultura (Nudiba) pela oportunidade;

Ao Ministério de Ciências e Tecnologias de Moçambique (MCT) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos;

A Universidade Eduardo Mondlane (UEM), Escola Superior de Negócios e Empreendedorismo de Chibuto (ESNEC) pela confiança e autorização para cursar o mestrado em Produção Vegetal;

Ao Ministério da Agricultura de Moçambique pela cessão das sementes da cultivar de feijoeiro Bonus;

Ao meu orientador Prof. Luciano Pasqualoto Canellas, pela confiança, pelas oportunidades e pelos ensinamentos;

Ao meu coorientador Prof. Fabio Lopes Olivares, pelos ensinamentos;

Aos demais professores do LSOL, pela oportunidade de aprendizado, pelo incentivo, pela confiança e pela contribuição para os meus conhecimentos durante o curso de mestrado;

Ao Professor Leonardo Oliveira Médici, da UFRRJ, pela prontidão e disponibilidade;

Ao Professor Adelson Paulo de Araújo, da UFRRJ, pelo apoio e pela disponibilidade;

À Dra. Alena Torres Netto pela ajuda na determinação de variáveis fisiológicas;

À Dra. Inga Gonçalves de Azevedo;

Ao Dr. Leonardo Barros Dobbss;

Aos meus colegas de estudo em grupo Wilder, Jéssica, Polly, Ana Silva, Régis, Tarciana, Lucas, Luciano, Seldon, Lázaro e William pelo compartilhamento de conhecimentos;

Aos meus amigos Salvador, Márcio, Nelson, Pedro, Paulo Victor, Juninho, Luís Alfredo, Kaká, Fábio, Érica, Camila, Pollyana e Lívia;

A todos, mesmo que não estejam aqui citados que, direta ou indiretamente, contribuíram com a minha formação.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Características gerais e importância da cultura do feijoeiro comum .....	3
2.2 Respostas das plantas a ambientes com déficit hídrico.....	5
2.2.1 Respostas morfofisiológicas.....	7
2.2.2 Respostas bioquímicas .....	8
2.3 Substâncias húmicas e crescimento radicular .....	10
2.4 Rizóbio e bactérias diazotróficas endofíticas no manejo da adubação nitrogenada.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Localização e delineamento experimental .....	15
3.2 Condições de cultivo .....	16
3.3 Monitoramento dos níveis de irrigação .....	18
3.3.1 Curva de retenção de água no solo.....	19

3.4	Características avaliadas .....	21
3.4.1	Análises biométricas.....	21
3.4.1.1	Massa seca de raízes e da parte aérea .....	21
3.4.1.2	Número e massa seca dos nódulos .....	22
3.4.2	Análises fisiológicas .....	22
3.4.2.1	Taxa fotossintética líquida, condutância estomática e transpiração ....	22
3.4.2.2	Conteúdo relativo de água nas folhas (CRA) .....	23
3.4.3	Análises bioquímicas.....	23
3.4.3.1	Atividade da fenilalanina amônia liase (PAL).....	23
3.4.3.2	Atividade de enzimas antioxidantes .....	24
3.5	Análise dos resultados .....	27
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
5.	RESUMO E CONCLUSÕES.....	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Etapas de desenvolvimento do feijoeiro e descrição morfológica das fases .....	4
<b>Tabela 2</b> - Resultado da análise química do solo .....	16
<b>Tabela 3</b> - Análise de variância: Probabilidade dos efeitos de dois níveis de irrigação (I) e quatro tratamentos (T) e interação (I x T) nas variáveis biométricas e fisiológicas.....	29
<b>Tabela 4</b> - Massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca das raízes (MSR) do feijoeiro cv Bonus sob dois níveis de irrigação.....	30
<b>Tabela 5</b> - Número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN) em raízes de feijoeiro cv Bonus sob dois níveis de irrigação.....	31
<b>Tabela 6</b> - Conteúdo relativo de água nas folhas (CRA) de feijoeiro Bonus sob dois níveis de irrigação e três momentos de coletas.....	39
<b>Tabela 7</b> - Atividade da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) em folhas de feijoeiro Bonus, sob dois níveis de irrigação e três momentos de coletas .....	40

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Temperatura (a) e umidade relativa do ar (b) do ambiente onde as plantas foram cultivadas. ....	18
<b>Figura 2</b> - Curva de retenção de água do Latossolo Amarelo distrófico típico na profundidade de 20 cm. ....	21
<b>Figura 3</b> - Absorbância das soluções padrões a 290 nm, em função da concentração.....	24
<b>Figura 4</b> - Taxa fotossintética líquida (A) em cultivar de <i>P. vulgaris</i> L., Bonus, nos diferentes tratamentos. ....	33
<b>Figura 5</b> - Condutância estomática (gs) em cultivar de <i>P. vulgaris</i> L., Bonus, nos diferentes tratamentos. ....	35
<b>Figura 6</b> - Transpiração (E) em cultivar de <i>P. vulgaris</i> L., Bonus, nos diferentes tratamentos. ....	37
<b>Figura 7</b> - Atividades das enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase do ascorbato em cultivar de <i>P. vulgaris</i> L., Bonus, nos diferentes tratamentos ....	42

## RESUMO

MELO, António da Piedade, M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2014. Avaliação da tolerância à seca em feijoeiro inoculado com rizóbio e bactérias diazotróficas endofíticas na presença de ácidos húmicos. Orientador: Luciano Pasqualoto Canellas. Coorientador: Fábio Lopes Olivares.

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão. Esta leguminosa constitui a base alimentar da população de muitos países em desenvolvimento e é considerado um dos mais importantes constituintes da dieta da população brasileira. Em Moçambique os feijões são cultivados em pequenas propriedades familiares de até 3 ha caracterizadas pelo baixo ou nenhum uso de insumos agrícolas e vulneráveis às variações climáticas, especialmente as secas. Dentre os fatores importantes para obtenção de altos índices produtivos nesta cultura, destaca-se a quantidade apropriada de água e nutrientes, além do potencial genético da cultivar utilizada. Esta pesquisa foi desenvolvida no âmbito de cooperação internacional entre Brasil e Moçambique, com o objetivo de avaliar a hipótese de que plantas co-inoculadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal e ácidos húmicos (AH) apresentam melhor recuperação ao déficit hídrico do que plantas não co-inoculadas. Para atender o objetivo da pesquisa foi instalado experimento com feijão em condições de casa de vegetação. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições e os tratamentos dispostos em arranjo fatorial

4 X 2 (testemunha absoluta, aplicação de N mineral e, rizóbio na presença ou não de bactérias diazotróficas endofíticas em conjunto com AH) e dois níveis de irrigação (com irrigação contínua na capacidade de campo e com déficit hídrico no estágio pré-floração). As variáveis analisadas foram: massa seca de raízes e parte aérea; número e massa dos nódulos; conteúdo relativo de água foliar, taxa fotossintética líquida, condutância estomática e transpiração; atividades da enzima fenilalanina amônia liase e de enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e peroxidase do ascorbato. A inoculação do feijoeiro com rizóbio na presença de bactérias diazotróficas endofíticas e AH promoveu aumentos respectivos de 47 e 174% na produção da biomassa seca da parte aérea e na massa seca das raízes aos 62 DAS no regime de déficit hídrico em relação à testemunha. O número e a massa seca de nódulos diminuíram com o déficit hídrico, sendo que a inoculação na presença de bactérias diazotróficas endofíticas e AH não atenuou esse efeito do déficit hídrico. O valor do conteúdo relativo de água após a reidratação foi maior nas plantas inoculadas com rizóbio na presença ou não de bactérias diazotróficas endofíticas e AH. Os valores da taxa fotossintética líquida, condutância estomática e transpiração foram maiores em plantas inoculadas com rizóbio na presença de bactérias diazotróficas endofíticas e AH após a reidratação proporcionando uma retomada mais rápida do crescimento das plantas. O déficit hídrico aumentou a atividade da PAL, consequentemente ativando os mecanismos de defesa e de produção de metabólitos secundários nas plantas de feijoeiro Bonus. O déficit hídrico também aumentou a atividade das enzimas antioxidantes. Com este trabalho pode-se concluir que plantas inoculadas com rizóbio na presença de bactérias diazotróficas endofíticas e AH apresentaram melhor recuperação à seca em relação às não co-inoculadas indicando um processo biológico a ser desenvolvido visando à recuperação do feijoeiro face ao déficit hídrico.

Palavras-chave: insumos biológicos, substâncias húmicas, bactérias promotoras do crescimento, déficit hídrico.

## **ABSTRACT**

MELO, António da Piedade, M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2014. Evaluation of drought tolerance in bean inoculated with endophytic diazotrophic bacteria and rhizobia in the presence of humic acids. Advisor: Luciano Pasqualoto Canellas. Co-advisor: Fábio Lopes Olivares.

Brazil is the largest producer and consumer of beans. This legume is the staple food of many population in developing countries and is considered one of the most important constituents of the population diet. In Mozambique the beans are grown on small family farms up to 3 ha characterized by low or no use of agricultural inputs and vulnerable to climatic variations, especially droughts. Among the important factors in achieving high production rates in this culture, there are the appropriate amount of water and nutrients, and the genetic potential of the cultivar. This research was conducted as part of international cooperation between Brazil and Mozambique, aiming to evaluate the hypothesis that co-inoculated plants with plant growth promoting bacteria and humic acids (HA) have a better recovery to water stress than plants not co-inoculated. To meet the objective of the research an experiment with beans was installed in greenhouse conditions. The experiment was conducted in a completely randomized design with four repetition and the treatments in a 4 x 2 factorial arrangement (absolute control, N fertilization and rhizobia on the presence or absence of endophytic diazotrophic bacteria in conjunction with HA) and two levels of irrigation (with

continuous irrigation at field capacity and drought in pre-flowering stage). The variables analyzed were: dry mass of roots and shoots, number and mass of nodules, relative leaf water content, net photosynthetic rate, stomatal conductance and transpiration; activities of the enzyme phenylalanine ammonia lyase (PAL) and antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase. Inoculation of bean with rhizobia in the presence of endophytic diazotrophic bacteria and HA promoted respective increases of 47 and 174% in dry biomass of shoot and root dry weight at 62 DAS scheme drought compared to control. The number and mass of nodules decreased with drought and inoculation in the presence of endophytic diazotrophic bacteria and HA did not attenuate this effect of water stress. The value of relative water content after rehydration was greater in plants inoculated with rhizobia in the presence or absence of endophytic diazotrophic bacteria and HA. The values of net photosynthetic rate, stomatal conductance and transpiration were higher in plants inoculated with rhizobia in the presence of endophytic diazotrophic bacteria and HA after rehydration providing a faster resumption of plant growth. Drought increased the activity of PAL, consequently activating defense mechanisms and production of secondary metabolites in plants bean Bonus. Drought increased the activity of antioxidant enzymes. With this work we can conclude that plants inoculated with rhizobia in the presence of endophytic diazotrophic bacteria and HA showed better recovery drought compared to non-co-inoculated indicating a biological process to be developed to face the recovery of common bean to drought.

Keywords: biological inputs, humic substances, growth-promoting bacteria, water deficit.

## 1. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) constitui a base alimentar da população de muitos países em desenvolvimento e é considerado um dos mais importantes constituintes da dieta da população brasileira por ser, reconhecidamente, uma excelente fonte proteica, de carboidratos e de ferro (Vieira et al., 2006). A produção mundial de feijão vem crescendo progressivamente desde os anos de 1960. O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial dessa leguminosa com produção em torno de três milhões de toneladas e produtividade média de 1022 kg ha<sup>-1</sup> (IBGE, 2013).

Em Moçambique, a produção de feijão no ano agrícola 2010/2011 foi em torno de 287 mil toneladas, correspondente a uma produtividade média de 528 kg ha<sup>-1</sup> (MINAG, 2012). É, portanto, uma das menores produtividades mundiais para cultivos de feijoeiro. Neste país, o cultivo desta leguminosa é feito geralmente em condições de deficiência hídrica e quase inexistência de suprimento à cultura com nitrogênio.

Dentre os fatores importantes para obtenção de altos índices produtivos nesta cultura, destaca-se a quantidade apropriada de água e nutrientes, além do potencial genético da cultivar utilizada. Para Francelli e Neto (2007), a água é o principal fator de produção afetando diretamente a disponibilidade de qualquer um dos nutrientes inorgânicos e orgânicos.

Nos países menos desenvolvidos o feijoeiro é cultivado, sobretudo, por pequenos e médios produtores sem irrigação, e por isso, em mais de 60% dos

seus cultivos, observa-se deficiência hídrica em algum estágio da cultura (Singh, 1995). Segundo Fageria et al. (1991), a fase da planta mais sensível à insuficiência de água é a reprodutiva, sendo altamente suscetível desde o início da floração até o início da formação das vagens. A produtividade é mais afetada quando o estresse hídrico ocorre entre 5 a 10 dias antes da antese, podendo haver uma diminuição superior a 50% no rendimento (Norman et al., 1995). Esse efeito é causado principalmente pela baixa taxa de polinização e pelo aborto de óvulos promovendo a abscisão dos órgãos reprodutivos resultante do decréscimo na translocação de fotoassimilados das folhas para as flores (Kramer e Boyer, 1995).

Experimentos já realizados em casa de vegetação e a campo têm demonstrado que o uso em conjunto de ácidos húmicos e bactérias endofíticas promotoras do crescimento vegetal pode, aparentemente, induzir a tolerância ao déficit hídrico, por promover o crescimento do sistema radicular (Marques Jr, 2010; Canellas et al., 2012). Além disso, ainda não foi estudado a possibilidade de co-inoculação dessas bactérias promotoras do crescimento vegetal com rizóbio na presença de ácidos húmicos. Nesse sentido, e no âmbito de cooperação internacional entre Brasil e Moçambique, desenvolveu-se esta pesquisa com o objetivo de avaliar o efeito da inoculação com bactérias promotoras do crescimento vegetal e ácidos húmicos na recuperação do feijoeiro submetido ao déficit hídrico.

Objetivos específicos:

Avaliar o efeito da inoculação sobre aspectos morfológicos do feijoeiro submetido à seca: massa seca de raízes e parte aérea;

Avaliar o número e a massa dos nódulos;

Monitorar alterações no metabolismo foliar induzidas pela seca por meio da atividade da enzima fenilalanina amônia liase e da atividade de enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, catalase e peroxidase do ascorbato;

Avaliar os efeitos dos tratamentos sobre aspectos fisiológicos como: conteúdo relativo de água foliar, taxa fotossintética líquida, condutância estomática e transpiração.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Características gerais e importância da cultura do feijoeiro comum

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é originário das Américas, pertencente à classe Dicotyledoneae, família Fabaceae, é a espécie mais cultivada entre as demais do gênero *Phaseolus*.

O desenvolvimento do feijoeiro compreende duas grandes fases específicas, denominadas de fases vegetativa e reprodutiva, diferenciadas entre si pela expressão de diferentes eventos. A fase vegetativa tem seu início compreendido entre a germinação até o aparecimento dos primeiros botões florais. A fase reprodutiva transcorre desde a emissão dos botões florais até o pleno enchimento de vagens e a maturação das sementes. Na fase reprodutiva evidencia-se notória sensibilidade à deficiência hídrica e ao excesso de água. Na Tabela 1 são apresentadas as etapas de desenvolvimento e as características morfológicas de fases do ciclo do feijoeiro propostas por Gepts e Fernández (1985).

**Tabela 1** - Etapas de desenvolvimento do feijoeiro e descrição morfológica das fases

Estádio	Início da etapa	Descrição	Duração (dias)
<b><i>Fase vegetativa</i></b>			
V <sub>0</sub>	Germinação	Sementes em condições de germinar	5
V <sub>1</sub>	Emergência	Cotilédones acima do nível do solo	2 – 3
V <sub>2</sub>	Folhas primárias	Folhas primárias expandidas	4
V <sub>3</sub>	1ª folha trifoliolada	Primeira folha trifoliada aberta	5 – 9
V <sub>4</sub>	3ª folha trifoliolada	Terceira folha trifoliada aberta	7 – 15
<b><i>Fase reprodutiva</i></b>			
R <sub>5</sub>	Pré-floração	Plantas com pelo menos 1 botão floral	9 – 11
R <sub>6</sub>	Floração	Plantas com pelo menos 1 flor aberta	4 – 6
R <sub>7</sub>	Formação de vagens	Aparecimento das primeiras vagens	8 – 9
R <sub>8</sub>	Enchimento das vagens	Enchimento das primeiras vagens	18 – 24
R <sub>9</sub>	Maturação	Mudança de cor das vagens (ponto de maturidade fisiológica)	14 – 15

Fonte: Gepts e Fernández (1985).

Sob o ponto de vista nutricional, o feijão apresenta teores significativos de proteínas, carboidratos, e vitaminas (principalmente as do complexo B), minerais e fibra (Martinez et al., 1989). Apresenta, ainda, baixo conteúdo de gordura e de colesterol, o que torna seu consumo altamente vantajoso como alimento funcional e representa importante fonte de nutrientes, de energia e atuam na prevenção de distúrbios cardiovasculares e de vários tipos de câncer (Sathe et al., 1984). Graças às suas comprovadas propriedades nutritivas e terapêuticas, o feijão é altamente desejável como componentes em dietas de combate à fome e à desnutrição. Ademais, ocorre uma interessante complementação proteica quando o feijão é combinado com cereais, especialmente o arroz, isto porque, o feijão é pobre em aminoácidos sulfurados, e rico em lisina e o arroz é pobre em lisina e

relativamente rico em aminoácidos sulfurados (Mesquita, 2006), proporcionando, em conjunto, os oito aminoácidos essenciais ao nosso organismo.

O feijoeiro comum é cultivado por pequenos e grandes produtores, em diversificados sistemas de produção e em todas as regiões do Brasil, revestindo-se de grande importância econômica e social. No Norte e Noroeste Fluminense é comumente plantado na entressafra das águas (nos meses de maio a agosto) especialmente nas baixadas utilizando a água armazenada. Em Moçambique os feijões são cultivados em pequenas propriedades familiares (de até 3 ha, segundo o Plano Estratégico de Desenvolvimento do Sector Agrário, PEDSA) caracterizadas pelo baixo ou nenhum uso de insumos agrícolas e vulneráveis às variações climáticas, especialmente as secas. Processos biológicos visando manejo adequado da adubação e o aumento da tolerância ao déficit hídrico podem contribuir para o aumento da segurança alimentar nesses sistemas de cultivo de feijões.

## **2.2 Respostas das plantas a ambientes com déficit hídrico**

De todos os fatores ligados à produção agrícola, o clima destaca-se como o de mais difícil controle e de maior influência sobre a limitação à expressão do potencial produtivo. Dentre os elementos do clima, o que se apresenta como mais limitante às culturas é a água. Os vegetais dependem mais da disponibilidade de água que de qualquer outro elemento ambiental para a sua distribuição na superfície terrestre. A sua disponibilidade durante a fase de crescimento das plantas é considerada como a principal limitação à expressão do potencial do rendimento, independente do ciclo da cultivar, do local e da época da semeadura (Turner, 1986).

Déficit hídrico ocorre quando a planta é incapaz de absorver água suficiente para substituir a perda por transpiração e quando ocorre durante um período longo, a planta pode apresentar desordens em níveis morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, que podem comprometer irreversivelmente a produção agrícola (Wentworth et al., 2006; Porch et al., 2009).

A água utilizada pelas plantas na fotossíntese é absorvida pelas raízes e conduzida para a parte aérea juntamente com os nutrientes através do xilema pela "força" da transpiração. A ocorrência de déficit hídrico compromete a produtividade justamente por inviabilizar o processo fotossintético, uma vez que a água, além de constituir o componente em que ocorre a maioria das reações, também é responsável pela manutenção da transpiração, essencial para a permeabilidade do gás carbônico no mesófilo foliar. Segundo Sampaio (1998), do total de água absorvida pela planta, 98% é perdida para atmosfera na forma de transpiração, 1,8% é retida nos tecidos e apenas 0,2% é utilizada na fotossíntese.

As respostas das plantas à deficiência hídrica são caracterizadas por mudanças fundamentais na relação entre a célula e a água, nos seus processos fisiológicos, na estrutura de membranas, além de mudanças morfológicas e fenológicas (Pimentel, 2004). A capacidade das plantas apresentarem uma produção satisfatória em áreas sujeitas a déficit hídrico é definida como resistência à seca (Turner, 1986). Os mecanismos de resistência à seca podem ser divididos em escape, evitamento e tolerância. No primeiro, as plantas adotam uma estratégia de "fuga" apresentando rápido desenvolvimento fenológico e alto grau de plasticidade, sendo capazes de encurtar seu ciclo, se ocorrer falta de água, quando ela já tem um certo desenvolvimento vegetativo, que possa garantir a produção de sementes. No evitamento à desidratação, a planta evita o equilíbrio termodinâmico com o ambiente, que consiste na manutenção do turgor e volume celular, tanto pela absorção de água por um sistema radicular abundante quanto pela redução da perda por transpiração através do fechamento estomático ou por vias não estomáticas como a cutícula. Por fim, a tolerância à seca é um mecanismo que permite à planta manter o metabolismo, mesmo com a redução do potencial hídrico dos tecidos, devido principalmente ao acúmulo de solutos compatíveis ou osmólitos, proteínas osmoprotetoras e à capacidade antioxidante (Verslues et al., 2006).

A tolerância ao estresse hídrico ocorre em quase todas as plantas, mas a sua extensão varia de espécie para espécie, podendo ainda variar dentro de cada espécie. O déficit hídrico é questão global, visto que afeta a sobrevivência das culturas agrícolas a produção sustentável de alimentos (Jaleel et al., 2007). A duração, intensidade e taxa de avanço do estresse irão influenciar as respostas

das plantas à deficiência hídrica, porque estes fatores influenciam na atenuação dos processos associados à aclimação (Chaves et al., 2009).

### **2.2.1 Respostas morfofisiológicas**

Em situação de estresse causado pela deficiência hídrica, ocorre a limitação das trocas gasosas entre planta e ambiente devido ao fechamento dos estômatos que condicionará a queda da taxa de fotossíntese. O processo da fotossíntese visa converter o CO<sub>2</sub> inorgânico captado pela planta da atmosfera em compostos orgânicos ricos em carbono, que por sua vez, sustentarão a sobrevivência da planta. Com o desencadeamento do déficit hídrico na planta, a transpiração começa a reduzir devido ao fechamento dos estômatos, diminuindo a assimilação de CO<sub>2</sub>, reduzindo a translocação de produtos fotossintetizados e o acúmulo de açúcares. Ocorrem danos nas membranas e redução da atividade enzimática; o crescimento e desenvolvimento da planta ficam comprometidos sendo mais afetado o alongamento celular do que a divisão. (Jaleel et al., 2008). Ademais, a planta apresenta um decréscimo da produção da área foliar, reduz o alongamento do caule e a proliferação de raiz, diminui a eficiência do uso da água e ocorre a aceleração da senescência e da abscisão das folhas.

Segundo Oliveira et al. (2002), o fechamento dos estômatos ocorre em resposta a um decréscimo no potencial hídrico foliar ocasionado pela baixa disponibilidade de água no solo. Esta constatação foi verificada por Pimentel e Perez (2000), nos seus estudos sobre estabelecimento de parâmetros de tolerância à seca, em genótipos de feijoeiro.

Outro fator relevante afetado pela deficiência hídrica é a transpiração, pois esta é responsável pela translocação de compostos dentro da célula, além de ser um importante fator no resfriamento dos tecidos e de ser essencial para a permeabilidade do CO<sub>2</sub> no mesófilo foliar. O efeito do estresse hídrico sobre a transpiração produz significativas diferenças entre plantas sob deficiência hídrica e irrigadas. Oliveira et al. (2009) trabalhando com diferentes cultivares de cafeeiros irrigados e não irrigados, verificaram menor taxa de transpiração na condição de não irrigação em resposta ao aumento de resistência estomática e à

redução do potencial hídrico foliar. O aumento da resistência estomática no decorrer do dia, provocado pelo aumento do déficit de pressão de vapor, promove uma perda de turgescência das folhas, justamente para prevenir um aumento da taxa de transpiração.

A transpiração excessiva retarda o crescimento de muitas plantas e causa morte em muitas outras por desidratação. Segundo Santos e Carlesso (1998), quando o déficit hídrico ocorre de forma rápida, os mecanismos morfológicos e fisiológicos são gravemente afetados e a planta necessita adaptar-se à nova posição de maneira rápida. Deste modo, plantas conduzidas em condições de irrigação geralmente apresentam menos resistência a situações de estresse hídrico no solo, enquanto que em plantas submetidas ao déficit hídrico gradual ou à deficiência de água no solo no início do seu ciclo, mais facilmente ocorre a sua adaptação.

### **2.2.2 Respostas bioquímicas**

O déficit hídrico pode alterar profundamente a organização das células foliares. Perdas importantes podem acontecer nos cloroplastos, causando a dilatação dos tilacoides e modificações na sua organização molecular. O teor de clorofila e número do grana também pode diminuir. O declínio na funcionalidade dos cloroplastos, inevitavelmente leva a formação de radicais de oxigênio altamente reativos. As espécies reativas de oxigênio geram prejuízos às macromoléculas, sendo um dos principais obstáculos para o crescimento (Farooq et al., 2009). Assim, a real função do ajuste osmótico poderia estar potencialmente ligada à eliminação de radicais livres, gerando de forma adicional a retenção de água. Dessa forma, a realização de um ajuste osmótico eficaz poderia evitar maiores danos aos cloroplastos e, conseqüentemente aos teores de clorofila (Hare e Cress, 1997).

As plantas produzem uma grande variedade de produtos secundários chamados de compostos fenólicos, que agem como compostos de defesa contra patógenos, suporte mecânico e proteção contra radiação UV (Taiz e Zeiger, 2009). Zhao et al. (2005) observaram que as plantas que receberam estímulo de

estresse apresentaram alta atividade da enzima peroxidase e fenilalanina amônia-liase, em relação àquelas que não receberam o estímulo. Segundo Chakraborty et al. (2001), a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase aumenta em resposta a diferentes tipos de estresse, especialmente ao estresse térmico, sendo considerada por muitos autores como “proteína do estresse”, relacionando-se com desenvolvimento de mecanismos de proteção e adaptação de plantas a situações adversas.

Uma das mais bem estudadas respostas das plantas ao déficit hídrico é a acumulação de prolina nas células. A acumulação desse aminoácido é resultado do aumento do fluxo de glutamato que é metabolizado pela Pirrolina-5-Carboxilato Sintetase (P5CS), a enzima que regula a taxa de biossíntese de prolina, bem como de um decréscimo no metabolismo desse aminoácido. Tal enzima, responsável pela transformação de Pirrolina-5-Carboxilato (P5C) em prolina, tem sua expressão regulada por mudanças no potencial osmótico do citoplasma (Hare e Cress, 1997). Um decréscimo no potencial osmótico da célula leva a um aumento na síntese de P5C e, conseqüentemente, a um aumento na síntese de prolina. A acumulação de prolina em células vegetais submetidas ao déficit hídrico tem sido sugerida como um mecanismo de ajuste osmótico.

Por outro lado, a capacidade antioxidante das plantas resulta da habilidade de desintoxicar espécies reativas de oxigênio, as quais são geradas normalmente pelo metabolismo dos organismos aeróbicos, porém aumentam durante a seca devido a danos no aparato fotossintético. A eliminação das espécies reativas de oxigênio é realizada por compostos antioxidantes como a glutathiona reduzida (GSH), o ascorbato (AsA), o tocoferol, as vitaminas e os pigmentos carotenoides, os quais agem em conjunto com as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathiona redutase (GR), catalase (CAT) e peroxidase do Ascorbato (APX) (Gratão et al., 2005). As SODs dismutam  $O_2^{\cdot -}$  a  $H_2O_2$  e localizam-se principalmente nas mitocôndrias e nos cloroplastos, compartimentos que geram a maior parte das espécies reativas de oxigênio nas células vegetais (Apel e Hirt, 2004). O  $H_2O_2$  gerado é então eliminado pelas CATs e APXs. As CATs são enzimas peroxissomais e glioxissomais que catalisam a redução direta do  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$  (Yanik e Donaldson 2005), enquanto as APXs eliminam o  $H_2O_2$  utilizando o ascorbato como doador específico de elétron na redução do peróxido de hidrogênio à água (Shigeoka et al. 2002; Cavalcanti et al.,

2007). Xiong e Zhu (2002) verificaram que em plantas sujeitas à deficiência hídrica, observa-se um aumento na atividade dessas enzimas relacionado ao aumento na tolerância à seca.

A adaptação das plantas à seca (e também aos solos de baixa fertilidade) inclui mudanças morfoanatômicas, fisiológicas e bioquímicas como descritas acima. Todos esses processos de adaptação são influenciados de algum modo pela matéria orgânica do solo e por processos microbiológicos indicando a possibilidade de geração de tecnologias de baixo custo econômico e ambiental visando aumento da tolerância à seca.

### **2.3 Substâncias húmicas e crescimento radicular**

A matéria orgânica do solo (MOS) é o produto da decomposição de tecidos de plantas, animais e microrganismos, bem como, da atividade de síntese de novos compostos. A relação entre a MOS e a produção agrícola é consistente com os resultados de mais de cem anos de pesquisa agrícola moderna e com milhares de anos de produção (Herrick e Wander, 1997). Esta relação é baseada na influência crítica da MOS nas propriedades, nos processos e nas funções do solo. As substâncias húmicas (SH), constituem a maior parte da MOS compreendendo até 80% do seu conteúdo (em solos tropicais intemperizados pode corresponder mais de 90%) (Santos et al. 2008). Devido aos efeitos das SH sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, o seu papel na promoção do crescimento vegetal já é bem reconhecido (Nardi et al., 2002; 2009).

O uso direto de SH solúveis como promotores de crescimento vegetal não é uma novidade, mas o aumento do mercado de SH tem atraído a atenção de novos produtores, empresas e agricultores interessados em saber como essas substâncias usualmente utilizadas em baixas concentrações, podem trazer benefícios para a produção sustentável. Segundo Piccolo (2001), as SH solúveis são constituídas por moléculas pequenas e heterogêneas, de várias origens e auto-organizadas em conformações supramoleculares. Podem ser operacionalmente divididas em ácidos fúlvicos (AF) e ácidos húmicos (AH). Os AF apresentam grupamentos funcionais hidrofílicos em quantidades suficientes para



permanecer solúvel em qualquer valor de pH enquanto que os AH apresentam maior quantidade de domínios hidrofóbicos. Com o abaixamento do pH o maior número de ligações de hidrogênio entre as moléculas aumenta a massa molecular aparente do agregado promovendo a sua floculação e precipitação (Piccolo, 2002).

As SH isoladas e solúveis podem estimular diretamente o crescimento e a produtividade das plantas. Seus efeitos sobre o desenvolvimento vegetal são dependentes da fonte de obtenção do material, das doses utilizadas, da forma como é aplicado, do tipo de natureza química do material, da espécie e da idade do vegetal estudado (Vaughan e Malcolm, 1985). Os efeitos mais relatados são os de promoção ao crescimento radicular (Nardi et al., 2002; 2009) além do incremento significativo ao metabolismo de várias espécies de plantas (Vaughan e Malcom, 1985; Chen e Aviad, 1990; Nardi et al., 2002; Zandonadi et al., 2007; Dobbss, et al., 2007; Canellas et al., 2010). O aumento da área radicular permite que a planta explore um volume maior de solo, além de representar um processo importante na adaptação das plantas a ambientes submetidos à deficiência hídrica ou com baixo conteúdo de nutrientes disponíveis (Fitter, 1991). A presença de moléculas ou unidades bioativas semelhantes às auxinas ligadas ou agregadas às SH tem sido indicada como uma das principais responsáveis pelo efeito de promoção do crescimento radicular. O aumento da emergência de raízes laterais, a indução de sítios de mitose nas raízes e a ativação das H<sup>+</sup>-ATPases em plantas tratadas com SH foram atribuídos a uma atividade do tipo auxínica (Canellas et al., 2002). As auxinas, principal hormônio envolvido no enraizamento, induzem o aumento de H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática nas plantas (Frias et al., 1996). As bombas de H<sup>+</sup> membranares acidificam o apoplasto e deixam a parede celular mais maleável facilitando o alongamento celular (Hager et al., 1991; Frias et al., 1996). A ativação das bombas de H<sup>+</sup> também promove a nutrição vegetal pela geração do gradiente eletroquímico que dirige o transporte iônico através das membranas celulares via sistemas transportadores secundários. Estão, também, envolvidas no turgor celular. Russel et al. (2006) verificaram que a aplicação de SH em plantas de ervilha nas concentrações entre 0,1 mg C L<sup>-1</sup> e 10 mg C L<sup>-1</sup> proporcionou abertura estomática máxima, sendo que estas respostas foram semelhantes às das auxinas. Estes autores verificaram que

a abertura estomática em resposta à auxina e às SH envolve a ativação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub>.

O estresse hídrico induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas plantas que protegem suas células e compartimentos subcelulares dos efeitos citotóxicos das ERO com o auxílio de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), glutathione redutase (GSH), catalase (CAT) e metabólitos, como a glutathione, ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol e carotenoides (Soares e Machado, 2007). É bem conhecido que compostos fenólicos podem reduzir a formação de ERO pela formação de ânions superóxidos ou peroxidação de lipídios. Entretanto, foi verificada a indução da atividade da catalase por AH (Yan-Chun e Rong-Ling, 1991; Cordeiro et al., 2011).

É possível, portanto, que devido à sua capacidade de modificar o crescimento radicular, regular a abertura de estômatos e aliviar o estresse das ERO que AH possam contribuir com o aumento a tolerância das plantas à seca.

## **2.4 Rizóbio e bactérias diazotróficas endofíticas no manejo da adubação nitrogenada**

O nitrogênio (N) é um dos elementos mais abundante nas plantas e está presente nos aminoácidos, nas proteínas, no DNA, no RNA e em outras estruturas celulares. Porém, embora esteja presente na atmosfera em aproximadamente 78% da constituição gasosa, o N é encontrado na forma molecular N<sub>2</sub> não absorvível pelas plantas. As fontes de fornecimento do N às plantas podem ser pelo solo, principalmente pela decomposição da matéria orgânica; pela fixação não biológica, resultante de descargas elétricas, combustão e vulcanismos; pelos fertilizantes nitrogenados; e pelo processo de fixação biológica de N atmosférico (FBN).

No processo de FBN, organismos procariotos são capazes de assimilar o N<sub>2</sub> encontrado na atmosfera e convertê-lo em NH<sub>3</sub>, forma assimilável pelas plantas. A FBN ocorre graças à enzima nitrogenase, o que do ponto de vista

energético é dispendioso para o organismo que a realiza, sendo que a reação pode ocorrer à temperatura ambiente e pressão atmosférica adequada (Reis et al., 2006). Dentre os procariotos capazes de fixar o N destacam-se as bactérias do gênero *Rhizobium* e as diazotróficas endofíticas. A FBN constitui um processo chave com elevado potencial de aplicação na agricultura comercial e, portanto, tem sido alvo de pesquisas desenvolvidas no Brasil e no mundo com vias a possibilitar a redução de custos e o impacto ambiental (Hungria et al., 2007).

Estudos a campo têm demonstrado incrementos no rendimento de grãos na cultura do feijoeiro, pela inoculação com estirpes de rizóbio de elevadas eficiência simbiótica e competitividade, em relação à população nativa de rizóbio do solo (Peres et al., 1994; Hungria et al., 2000; 2003). Pelegrin et al. (2009) verificaram que a adubação com 20 kg ha<sup>-1</sup> de N, acrescida de inoculante com a estirpe de *R. tropici* CIAT 899 possibilitou a obtenção de rendimento de grãos na cultura de feijoeiro equivalente à aplicação de até 160 kg ha<sup>-1</sup> de N.

Contudo, diversos fatores ambientais podem limitar a FBN na interação rizóbio-feijoeiro, interferindo nas atividades fisiológicas de cada um dos parceiros envolvidos (Hungria et al., 1993). Dentre os fatores ambientais mais importantes para o processo da FBN, a ocorrência de deficiências hídricas, ou seja, seca durante o ciclo de cultivo tem efeito negativo em diferentes etapas do processo de nodulação e na atividade nodular, além de afetar a sobrevivência do rizóbio no solo. Sendo assim, a escolha da espécie de rizóbio é um fator importante para a FBN devido à grande variabilidade entre espécies do gênero *Rhizobium* com respeito à resposta às variações ambientais.

Bactérias diazotróficas endofíticas são aquelas que fixam N<sub>2</sub> atmosférico e colonizam o interior de tecidos das plantas sem causar sintomas de doenças (Döbereiner, 1992). A inoculação de bactérias diazotróficas capazes de fixar o N atmosférico e fornecer à planta é uma alternativa que pode substituir, ainda que parcialmente, a adubação nitrogenada resultando em benefícios ao produtor por diminuir os custos de produção. Os microrganismos diazotróficos endofíticos podem desempenhar importante papel na reabilitação e sustentabilidade dos ecossistemas, uma vez que incorporam N por meio da fixação biológica em quantidades que podem variar de 25 a 50 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de N e produzem e liberam substâncias reguladoras do crescimento vegetal, como auxinas,

giberelinas e citocininas, as quais contribuem para melhorar a nutrição mineral e utilização de água pelas plantas (Bazzicalupo e Okon, 2000).

Estudos têm demonstrado que o uso em conjunto de rizóbio e bactérias diazotróficas endofíticas proporciona aumentos significativos na produção de culturas quando comparados à inoculação somente com rizóbio ou com bactérias endofíticas (Remans et al., 2008; Bárbaro et al., 2009; Lima et al., 2011). Hungria et al. (2013) verificaram aumento na produção de grão de feijão de 432 kg ha<sup>-1</sup> em comparação com controle não inoculado e, aumento de 323 kg ha<sup>-1</sup> em comparação com inoculação apenas com *R. tropici*. Neste mesmo trabalho os autores verificaram que a co-inoculação proporcionou aumento de 167 kg ha<sup>-1</sup> na produção de grão de soja em comparação com a inoculação apenas com *B. japonicum* e, aumento de 445 kg ha<sup>-1</sup> em comparação com controle não inoculado.

Por outro lado, Marques Jr. et al. (2008) avaliaram o efeito do uso em conjunto de ácidos húmicos e *Herbaspirillum seropedicae*, sobre o crescimento radicular de microtoletes de cana-de-açúcar e observaram promoção significativa do crescimento radicular, com incrementos que variaram de 60 a 118% no comprimento e de 33 até 233% na área radicular dos tratamentos em relação às plantas-controle. Conceição et al. (2009) verificaram que ácidos húmicos não interferem negativamente no crescimento das bactérias e estimulam a colonização da microbiota nativa. Recentemente, Canellas et al. (2012) observaram em um experimento de campo que plantas de milho co-inoculadas com *H. seropedicae* e 20 mg de C L<sup>-1</sup> de SH mostraram um aumento na produção de grãos, sugerindo um efeito sinérgico.

O uso em conjunto de rizóbio, microrganismos endofíticos promotores do crescimento vegetal e AH ainda não foi avaliado experimentalmente.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Localização e delineamento experimental

O experimento foi conduzido na casa de vegetação da UENF, Campos dos Goytacazes (RJ) entre os meses de julho a setembro de 2013 com intuito de avaliar a tolerância à seca. O material vegetal utilizado consistiu de plantas da espécie *Phaseolus vulgaris* L., "Bonus". Essa variedade tem ciclo entre 90 a 105 dias e é de crescimento indeterminado Tipo IV (Vilhordo et al., 1980). As sementes foram fornecidas pelo Departamento de Semente do Ministério da Agricultura de Moçambique (MINAG). Estas apresentavam coloração marrom com listras avermelhadas. O substrato de crescimento das plantas foi composto pela camada superficial de Latossolo Amarelo distrófico típico, segundo a chave da classificação do Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (EMBRAPA, 2013). O solo foi coletado em Travessão, distrito de Campos dos Goytacazes em corte de estrada, com coordenadas geográficas de 21°45'S de latitude e 41°20'W de longitude e a 11 m de altitude (Oliveira, 1996).

O solo coletado na profundidade de 0 a 20 cm foi submetido à análise química no Centro de Análises da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Campus Campos dos Goytacazes. O resultado da referida análise está descrito na Tabela 2. A granulometria do solo foi composta por 570,0 g kg<sup>-1</sup> de areia, 32,0 g kg<sup>-1</sup> de silte e 398,0 g de argila kg<sup>-1</sup> de solo.

**Tabela 2** - Resultado da análise química do solo

Profund.	Na	Ca	Mg	Al	H+Al	pH <sub>água</sub>	MO	Corg	P	K
(cm)	----- cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----						----- g kg <sup>-1</sup> -----		-- mg dm <sup>-3</sup> --	
0 – 20	0,03	0,6	0,4	0,7	5,9	5,3	19,1	11,1	1	41
Profund.	SB	T	t	m	V	Fe	Cu	Zn	Mn	
(cm)	----- cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----			----- % -----		----- mg dm <sup>-3</sup> -----				
0 – 20	1,1	7,0	1,8	38	16	62,0	0,2	0,4	1,3	

Segundo o sistema de classificação de Koppen (1948), o clima da região Norte Fluminense é do tipo AW, tropical quente úmido com período seco no inverno e chuvoso no verão e com temperatura média anual de 23 °C, e precipitação anual em torno de 1023 mm (Ometto, 1981).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições e os tratamentos dispostos em arranjo fatorial 4 X 2 (testemunha absoluta, aplicação de N mineral e, rizóbio na presença ou não de bactérias diazotróficas endofíticas em conjunto com ácidos húmicos) e dois níveis de irrigação (com irrigação contínua na capacidade de campo e com déficit hídrico no estágio pré-floração), totalizando 32 unidades experimentais, na qual cada unidade experimental correspondeu a 1 planta por vaso.

### 3.2 Condições de cultivo

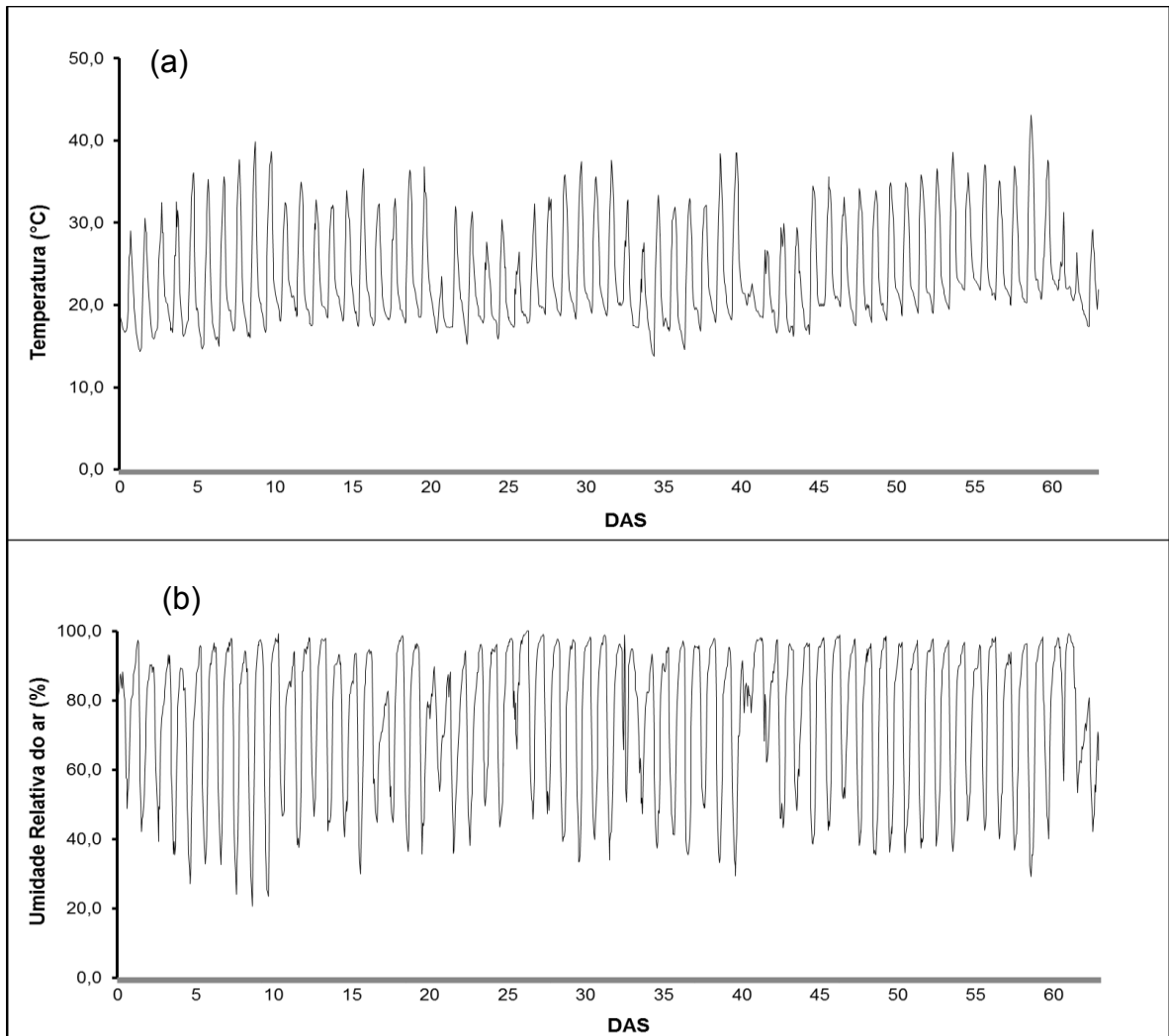
A semeadura (25/07/13) foi feita utilizando-se três sementes por vaso plástico contendo 9,0 kg de camada superficial. O desbaste foi realizado até 10 dias após a semeadura (DAS), sendo mantida uma planta por vaso. A coleta final foi realizada aos 62 DAS.

A adubação de plantio foi realizada considerando o nível de tecnologia 2 com estimativa de produção de 1200 a 1800 kg ha<sup>-1</sup>. Foram aplicados em cada vaso o equivalente a 80 kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (fosfato de potássio dibásico P.A.), 30 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O (cloreto de potássio P.A.), e 2000 kg ha<sup>-1</sup> de carbonato de cálcio P.A.

No tratamento com N, cada vaso recebeu equivalente a 20 kg ha<sup>-1</sup> de N, na forma de ureia, aplicado no plantio e 30 kg ha<sup>-1</sup> aplicados em cobertura, aos 25 dias após a emergência da cultura (DAE), conforme as recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais (Ribeiro et al., 1999).

As sementes foram inoculadas com inoculante comercial recomendado para a cultura do feijoeiro, composto pela combinação das estirpes CIAT 899 (= BR322), BR520 e BR534 de *Rhizobium tropici* obtido junto à coleção de estirpes da Embrapa Agrobiologia (50 g do inoculante + 50 mL de H<sub>2</sub>O para 10 kg de semente), na presença ou não de uma mistura contendo *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 e *Burkholderia silvatlantica* estirpe UENF 117111, combinados a ácidos húmicos (AH) isolados de vermicomposto (1 mL por semente contendo 10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup> e 50 mg C L<sup>-1</sup>).

Durante a condução do experimento foi medida a umidade relativa e a temperatura do local por meio de um termo higrômetro Data Logger (modelo CEM DT-172) onde os dados e as informações foram armazenados a cada hora (Figura 1). A temperatura variou de 13,8 °C a 43,1 °C, com média de 23,63 °C e a umidade relativa do ar variou de 20,7% a 100% com média de 74,72%.



**Figura 1** - Temperatura (a) e umidade relativa do ar (b) do ambiente onde as plantas foram cultivadas.

### 3.3 Monitoramento dos níveis de irrigação

A umidade do solo nos vasos foi monitorada diariamente por um medidor comercial HidroFarm (HFM2010), cuja medição é feita através de uma medida eletromagnética denominada ISAF (Impedância do Solo em Alta Frequência), que é proporcional à umidade. O valor informado pelo medidor foi referente à média da umidade volumétrica do solo em porcentagem, presente a um raio de 15 cm de distância do sensor e ao longo dos seus 20 cm de comprimento.



O suprimento de água às plantas foi realizado de modo a manter a umidade do solo próxima à capacidade de campo (23,8%) até o início do período de florescimento, quando a imposição do déficit hídrico foi realizada. O déficit hídrico foi induzido pela suspensão da irrigação, até a umidade do solo próxima ao ponto de murcha permanente (13,1%), quando a irrigação foi retomada. No tratamento irrigado a umidade foi mantida continuamente na capacidade de campo. A baixa demanda evapotranspiratória do ambiente de cultivo permitiu o desenvolvimento de um déficit hídrico de baixa intensidade e longa duração (16 dias). No entanto, os tratamentos com presença de ácidos húmicos e N mineral apresentaram valores de umidade do solo na faixa de 13,1% no 14<sup>o</sup> dia de déficit hídrico, tendo estes tratamentos sido mantidos nesta umidade até que os restantes tratamentos atingissem o mesmo valor de umidade, fato que ocorreu no 16<sup>o</sup> dia após a suspensão da irrigação. Após a reidratação, todos os tratamentos foram conduzidos com suprimento adequado de água, até o final do experimento.

### **3.3.1 Curva de retenção de água no solo**

Para a obtenção dos valores de umidade na capacidade de campo e no ponto de murcha permanente, foi determinada a curva de retenção de água no solo (Figura 2), a partir de dois grupos de amostras do solo coletado. No primeiro grupo as amostras foram saturadas em bandejas com água até o nível da borda dos anéis, sendo depois transferidas para funis de placa porosa e submetidas às sucções de 1, 3, 6 e 10 kPa. As amostras permaneceram nos funis até que entrassem em equilíbrio (ou seja, até que cessasse a perda de água, o que ocorria em torno de dois a três dias). Após isso as amostras foram pesadas em balança analítica e depois levadas à estufa a 105 °C por 48 horas para determinação da umidade volumétrica. No segundo grupo, após as amostras serem saturadas em bandejas com água, foram levadas a câmaras de pressão de Richards, ficando submetidas às pressões de 100 e 1500 kPa, até atingir equilíbrio (em 10 e 30 dias, respectivamente). Abertas as câmaras, as amostras foram pesadas e de seguida levadas à estufa a 105 °C por 48 horas para

determinação da umidade volumétrica. A umidade ( $\theta$ ,  $\text{m}^3 \text{m}^{-3}$ ) foi obtida pela equação:

$$\theta = \frac{V_a}{V} = \frac{m_a/\rho_a}{V} \quad (1)$$

onde  $V_a$  é o volume de água na amostra em equilíbrio no funil ou na câmara de pressão;  $V$  é o volume do anel;  $\rho_a$  é a densidade da água; e  $m_a$  é a massa de água na amostra, obtida pela diferença entre as pesagens no momento do equilíbrio e após a secagem em estufa.

Os resultados foram ajustados à equação de Van Genuchten (1980):

$$\theta = \theta_r + \frac{\theta_s - \theta_r}{(1 + |\alpha \cdot \phi_m|^n)^m} \quad (2)$$

onde  $\theta_s$  é a umidade na saturação ( $\text{m}^3 \text{m}^{-3}$ );  $\theta_r$  é a umidade residual ( $\text{m}^3 \text{m}^{-3}$ );  $\phi_m$  é o potencial mátrico ( $\text{kPa}^{-1}$ );  $\alpha$  ( $\text{kPa}^{-1}$ ) e  $m$  e  $n$  (adimensionais) são parâmetros empíricos do modelo. Para obtenção das equações,  $\theta_s$  foi assumida como correspondente à porosidade total,  $n$  foi considerado dependente de  $m$  ( $m = 1 - 1/n$ ), e  $\theta_r$ ,  $\alpha$  e  $m$  foram estimados com o auxílio do suplemento *so/ver* do programa Microsoft Office Excel 2010, pelo método dos mínimos quadrados.

A microporosidade foi obtida a partir da equação ajustada para a curva de retenção, sendo correspondente a umidade no potencial mátrico de -6 kPa (equivalente a uma sucção de 0,6 m de coluna de água). A macroporosidade, que compreende os poros maiores que 0,05 mm de diâmetro, foi obtida pela diferença entre a porosidade total e a microporosidade, de acordo com as equações:

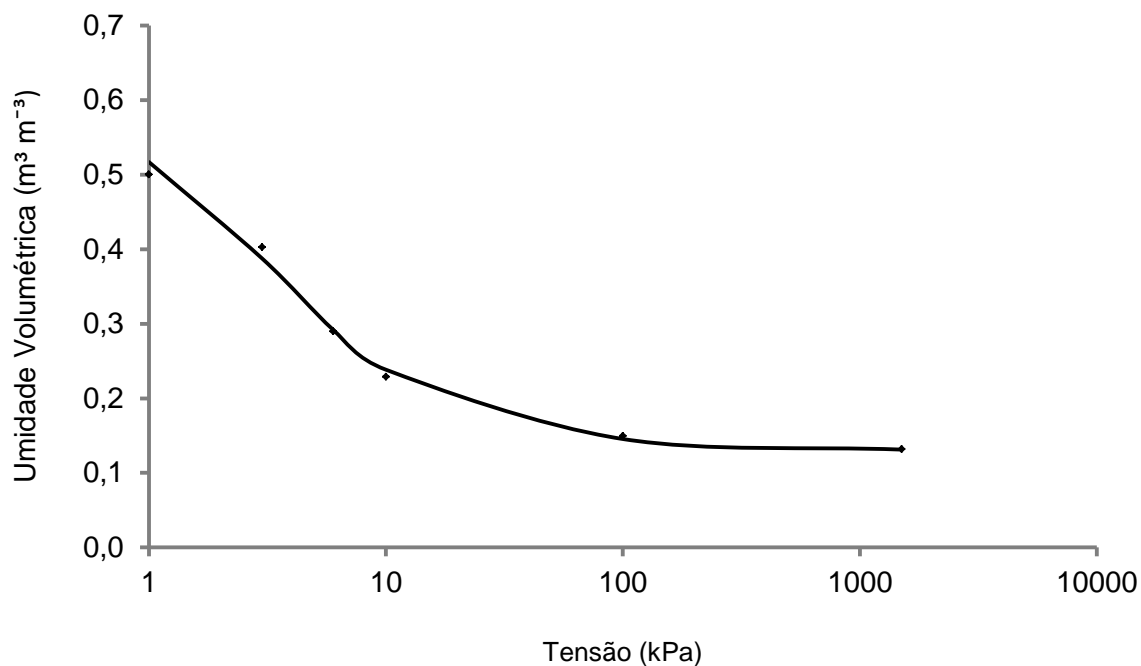
$$M_a = P_T - M_i \quad (3)$$

$$P_T = 1 - \rho/D_p \quad (4)$$

$$\rho = M_s/V \quad (5)$$

onde;  $M_a$  = macroporosidade ( $\text{m}^3 \text{m}^{-3}$ ),  $P_T$  = porosidade total ( $\text{m}^3 \text{m}^{-3}$ ),  $M_i$  = microporosidade ( $\text{m}^3 \text{m}^{-3}$ ),  $\rho$  = densidade do solo ( $\text{Mg m}^{-3}$ ),  $D_p$  = densidade das partículas ( $\text{Mg m}^{-3}$ ),  $M_s$  = massa do solo seco em estufa (Mg) e  $V$  = volume do anel ( $\text{m}^3$ ).

Da mesma forma que a microporosidade, a equação da curva de retenção foi utilizada para estimar a umidade na capacidade de campo ( $\theta_{cc}$ ) e no ponto de murcha permanente ( $\theta_{PMP}$ ), correspondentes aos potenciais mátricos de -10 kPa e -1500 kPa, respectivamente.



**Figura 2** - Curva de retenção de água do Latossolo Amarelo distrófico típico na profundidade de 20 cm.

### 3.4 Características avaliadas

#### 3.4.1 Análises biométricas

##### 3.4.1.1 Massa seca de raízes e da parte aérea

A massa seca de raízes e da parte aérea foi obtida no final do experimento (62 DAS). Para tal, o material vegetal foi separado em parte aérea e raízes, lavados em água corrente, secos em papel-toalha e em seguida colocados

em saco de papel e levados à estufa para secagem (60 °C até massa constante). Após a secagem, o material foi pesado em balança analítica.

#### **3.4.1.2 Número e massa seca dos nódulos**

O número e a massa seca dos nódulos foram obtidos aos 62 DAS. Os nódulos foram retirados das raízes e ainda úmidos separados por diâmetro por peneiras circulares com malhas de 4, 2 e 1 mm. Os nódulos retidos em cada peneira foram espalhados em folhas de acetato e a imagem foi digitalizada em *scanner* em tons de cinza e 300 dpi de resolução. O tamanho dos nódulos nas imagens foi determinado com o software ImLab, desenvolvido pela PUC-Rio (Scuri, 2010). A imagem foi convertida para tons de cinza e contraste de preto e branco invertido. No processo de limpeza de impurezas da imagem, foram descartados objetos com diâmetro inferior a 0,5 mm. O software efetuou a contagem e forneceu atributos dos objetos. Conhecendo-se a resolução da imagem, foi calculada a área de cada objeto e seu respectivo diâmetro, considerando a projeção dos nódulos nas imagens como círculos perfeitos. Em seguida, os nódulos (separados por cada classe de diâmetro obtida por peneiramento) foram secos em estufa (60 °C até massa constante) e pesados.

#### **3.4.2 Análises fisiológicas**

##### **3.4.2.1 Taxa fotossintética líquida, condutância estomática e transpiração**

A taxa fotossintética líquida ( $A$ ), a condutância estomática ( $g_s$ ), e a transpiração ( $E$ ) foram determinadas às 7:00 h da manhã aos 31, 34, 47 e 50 DAS utilizando-se o folíolo central da 3ª ou 4ª folha trifoliada contada a partir do ápice. Para tanto foi utilizado o Sistema Portátil de Medição das Trocas Gasosas, modelo LI-6200, LI-COR, Lincoln, NE, USA. Foi acoplada à câmara do equipamento um sistema de LEDs que fornecem luz artificial na faixa de  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### **3.4.2.2 Conteúdo relativo de água nas folhas (CRA)**

As análises foram efetuadas aos 31, 47 e 50 DAS às 12:00 h. As folhas foram coletadas e devidamente acondicionadas em sacolas plásticas e mantidas em recipiente térmico resfriado para evitar a desidratação dos tecidos. Logo em seguida o material foi levado ao laboratório.

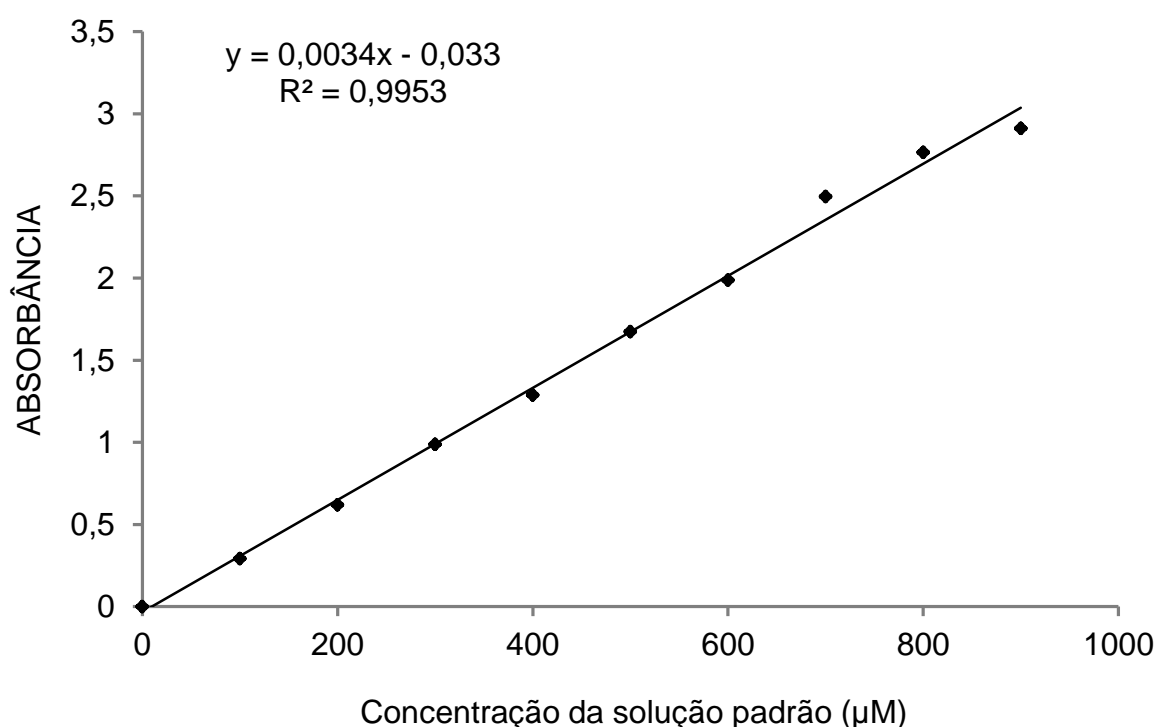
As medidas foram feitas segundo adaptação do protocolo de Turner (1981), utilizando a seguinte equação:  $(\text{massa fresca} - \text{massa seca}) / (\text{massa saturada} - \text{massa seca}) \times 100$ . Foram utilizados discos foliares de área conhecida ( $2,0 \text{ cm}^2$ ) retirados do folíolo central da 3ª ou 4ª folha trifoliada contada a partir do ápice, sendo imersos em água na placa de petri e colocados na geladeira por 24 h e então determinada a massa túrgida. Finalmente sua massa seca foi obtida em balança analítica após estufa com circulação de ar forçado a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  até massa constante.

### **3.4.3 Análises bioquímicas**

#### **3.4.3.1 Atividade da fenilalanina amônia liase (PAL)**

As determinações da atividade da enzima fenilalanina amônia liase (PAL, E.C. 4.3.1.5) foram realizadas aos 31, 47 e 50 DAS utilizando-se 3ª ou 4ª folha trifoliada contada a partir do ápice. As folhas foram coletadas, devidamente acondicionadas e transportadas ao laboratório. A atividade da PAL foi determinada de acordo com metodologia preconizada por Ardila et al. (2007) com algumas pequenas modificações descritas a seguir: foram tomados 0,2 g de tecido foliar fresco e macerados em banho de gelo com 2 mL de tampão 1 M TRIS HCl pH 8,8. O material foi centrifugado, 1500 g por 15 min, a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  do extrato proteico foram adicionadas em tubos de ensaio com 450  $\mu\text{L}$

de L-fenilalanina 40  $\mu\text{M}$  e incubados a 30  $^{\circ}\text{C}$  por 30 min. Foram adicionados posteriormente 250  $\mu\text{L}$  de HCl 6 mol  $\text{L}^{-1}$  e os tubos foram colocados em banho de gelo por 30 min. Após esse tempo foi adicionado 4800  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  e deixado em repouso por 15 min. O material foi centrifugado e a absorbância medida em 290 nm. A curva de calibração (Figura 3) foi obtida com ácido cinâmico e a atividade enzimática foi expressa como em  $\mu\text{M}$  de ácido cinâmico  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  de massa fresca.



**Figura 3** - Absorbância das soluções padrões a 290 nm, em função da concentração.

#### 3.4.3.2 Atividade de enzimas antioxidantes

As atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1), catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6) e peroxidase do ascorbato (APX, E.C. 1.11.1.11) foram realizadas aos 31, 47 e 50 DAS utilizando-se 3<sup>a</sup> ou 4<sup>a</sup> folha trifoliada

contada a partir do ápice. Para obtenção do extrato enzimático, amostras de folhas (massa fresca) do feijoeiro submetido aos diferentes tratamentos foram maceradas em N líquido. Em seguida foi adicionado um meio de homogeneização composto por: tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8; ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM; fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999). O homogeneizado, depois de filtrado através de quatro camadas de gaze, foi centrifugado a 12000 g por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático bruto.

a) Superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1)

Para a dosagem da atividade da superóxido dismutase, foi preparado um coquetel do meio de reação da enzima, composto de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,5), metionina 50 mM, riboflavina 0,1 mM, EDTA 5 mM e NBT 1 mM. A metionina e a riboflavina foram preparadas no escuro e mantidas em recipientes envolvidos em papel alumínio para evitar fotoxidação. O NBT foi o último reagente a ser preparado, na hora da reação, com os mesmos cuidados para evitar fotoxidação. Em cada tubo de ensaio foram adicionados: 1,5mL de tampão fosfato de sódio, 780 µL de metionina, 60 µL de riboflavina, 60 µL de EDTA, 320 µL de água e 225 µL de NBT. Tubos foram identificados como branco do claro, nos quais foram adicionados 50 µL de água em cada e branco do escuro, nos quais foram adicionados 50 µL do extrato bruto em cada. Nos demais tubos, todos em duplicata, foram adicionados 50 µL da amostra em cada. Os tubos do branco do escuro ficaram protegidos da luz (envolvidos com papel alumínio) por 10 minutos. Os tubos do branco do claro e os demais tubos contendo as amostras foram levados a uma câmara de fotorredução (uma caixa fechada, contendo uma lâmpada) onde permaneceram por 10 minutos, até a identificação da reação (os tubos do branco do claro apresentaram uma coloração azulada, que indica a máxima redução do NBT para formar formazan azul). Os tubos foram, então, levados para leitura espectrofotométrica a 560 nm.

A partir dos dados de absorbância obtidos, a atividade da enzima foi dada em unidades de SOD, ou seja, a quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a

fotorredução do NBT (Bailly et al, 1996; Goel e Sheoran, 2003). O cálculo foi feito da seguinte forma:

$$\text{SOD} = \left[ \frac{A}{a-b} \right] - 1 \quad (6)$$

Onde:

A = média das absorvâncias dos tubos sem amostra (branco do claro);

a = médias das absorvâncias dos tubos contendo as amostras;

b = média das absorvâncias dos tubos contendo amostras, mantidos no escuro (branco do escuro).

#### b) Catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6)

A atividade da enzima catalase foi determinada pela adição de 25  $\mu\text{L}$  do extrato bruto e 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  250 mM a 3,775 mL de meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), água ultrapura, previamente incubados a 28  $^\circ\text{C}$  (Havir e Mchale, 1989). As amostras foram levadas para leitura espectrofotométrica, na qual foram feitas leituras de 15 em 15 segundos, por um período de 2 minutos a 240 nm, evidenciando-se o decréscimo da atividade da enzima. O coeficiente de extinção  $\text{H}_2\text{O}_2$  considerado foi o de 36  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (Nakano e Asada, 1981).

#### c) Peroxidase do Ascorbato (APX, E.C. 1.11.1.11)

A atividade da enzima peroxidase do ascorbato (E.C. 1.11.1.11) foi determinada pela adição de 50  $\mu\text{L}$  do extrato bruto e 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM a 3,750 mL de meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), água ultrapura e 200  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 10 mM, previamente incubados a 28  $^\circ\text{C}$  (Nakano e Asada, 1981). As amostras foram levadas para leitura espectrofotométrica, na qual foram feitas leituras de 15 em 15 segundos, por um período de 3 minutos a 290 nm, evidenciando-se o decréscimo da atividade da



enzima. O coeficiente de extinção  $\text{H}_2\text{O}_2$  considerado foi o de  $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Nakano e Asada, 1981).

### **3.5 Análise dos resultados**

Para análise da variância foi aplicado o teste F com o auxílio do Programa estatístico SISVAR versão 5.3, sendo que quando fosse detectado efeito significativo, o teste  $t$  de student (LSD) em 5% de probabilidade seria utilizado para a comparação das médias.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da variância (Tabela 3) revelou efeito significativo dos diferentes níveis de irrigação (I) e tratamentos (T) para as seguintes variáveis biométricas e fisiológicas avaliadas: massa seca da parte aérea, massa seca de raiz, número de nódulos e massa seca de nódulos aos 62 DAS, taxa fotossintética líquida, condutância estomática e transpiração aos 31, 34, 47 e 50 DAS. No entanto, para a variável fisiológica conteúdo relativo de água nas folhas não foram observadas diferenças significativas nos tratamentos aos 31, 47 e 50 DAS.

A interação (I x T) foi significativa para massa seca da parte aérea, massa seca de raiz, número de nódulos, massa seca de nódulos e condutância estomática. Não foi significativa para taxa fotossintética líquida, transpiração e conteúdo relativo de água nas folhas (Tabela 3).

**Tabela 3** - Análise de variância: Probabilidade dos efeitos de dois níveis de irrigação (I) e quatro tratamentos (T) e interação (I x T) nas variáveis biométricas e fisiológicas

Variável	I	T	I x T	CV (%)
Massa seca da parte aérea (MSPA)	*	*	*	15.37
Massa seca de raiz (MSR)	*	*	*	19.08
Número de nódulos (NN)	*	*	*	11.94
Massa seca de nódulos (MSN)	*	*	*	10.56
Condutância estomática (gs)	*	*	*	6,37
Taxa fotossintética líquida (A)	*	*	NS	4,83
Transpiração (E)	*	*	NS	17,55
Conteúdo relativo de água (CRA)	*	NS	NS	7,03

\* - Significativo em 5% de probabilidade pelo teste F. CV = coeficiente de variação.

NS - não significativo.

A inoculação do feijoeiro com rizóbio (Riz) e com rizóbio na presença de bactérias diazotróficas endofíticas e ácidos húmicos (AHBac) promoveu aumento de 35% na produção da biomassa seca da parte aérea do feijoeiro aos 62 DAS no regime de irrigação contínua em relação à testemunha (Tabela 4). Esse aumento foi maior (cerca de 47%) no regime de déficit hídrico nas plantas inoculadas com Riz + AHBac. Aumentos ainda maiores foram observados na massa seca das raízes na ordem de 110% nos tratamentos inoculados no regime irrigado e de 174% no tratamento inoculado na presença de AHBac com déficit hídrico (Tabela 4). Em comparação com aplicação de N mineral, no regime de déficit hídrico o tratamento Riz na presença de AHBac apresentou valores inferiores de 7 e 35% da biomassa seca da parte aérea e da massa seca das raízes, respectivamente.

Por outro lado, os resultados mostraram não haver diferenças significativas na produção da biomassa seca da parte aérea entre os níveis de irrigação nas plantas inoculadas com Riz + AHBac. Com o déficit hídrico foi observado diminuição da massa seca de raízes e da parte aérea no tratamento testemunha e inoculado com Riz. Com a introdução de AHBac essa diminuição não foi significativa. No tratamento testemunha o déficit hídrico proporcionou a

diminuição da massa seca das raízes de modo similar aos encontrados por Pimentel e Perez (2000). Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de irrigação quando as plantas foram inoculadas com Riz na presença de AHBac, indicando um possível efeito da inoculação Riz + AHBac na recuperação do feijoeiro face ao déficit hídrico.

**Tabela 4** - Massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca das raízes (MSR) do feijoeiro cv Bonus sob dois níveis de irrigação<sup>(1)</sup>

Tratamento	MSPA (g planta <sup>-1</sup> )		MSR (g planta <sup>-1</sup> )	
	IC	DH	IC	DH
Testemunha	96,96Ca(0%)	7,71Ca(0%)	2,19Ca(0%)	1,48Ca(0%)
Riz	13,03Ba(34,33%)	9,27BCb(20,23%)	4,57Ba(108,67%)	3,14Bb(112,16%)
Riz + AHBac	13,26Ba(36,70%)	11,34ABa(47,08%)	4,60Ba(110,05%)	4,05Ba(173,65%)
N	16,93Aa(74,55%)	12,22Ab(58,50%)	9,27Aa(323,29%)	6,25Ab(322,30%)

<sup>(1)</sup>Médias de quatro repetições. Riz = rizóbio; AHBac = presença de bactérias diazotróficas endofíticas e ácidos húmicos; N = nitrogênio; IC = irrigação contínua; DH = déficit hídrico. Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste *t* de student (LSD) em 5% de probabilidade.

Como esperado foram verificadas diferenças significativas no número e na massa seca de nódulos entre os tratamentos com irrigação contínua e com suspensão da irrigação (Tabela 5), efeito previamente descrito por Pimentel e Perez (2000). No entanto, tanto para o número como para a massa seca de nódulos, as diferenças não foram significativas entre os tratamentos Riz e Riz + AHBac. Hungria et al. (2013) observaram que a inoculação com bactérias promotoras do crescimento vegetal não alterou a nodulação, fato também manifestado no presente trabalho, no entanto, utilizando-se bactérias promotoras do crescimento na presença de AH (Tabela 5).

As plantas que receberam N mineral apresentaram menor número e massa de nódulos, resultados semelhantes foram obtidos por (Mercante et al., 2006; Pelegrin et al., 2009; Hungria et al., 2013). Contudo, Pelegrin et al. (2009) verificaram que a adubação com pequena quantidade de N (20 kg ha<sup>-1</sup>) acrescida

de inoculante com a estirpe de *R. tropici* CIAT 899 possibilitou a obtenção de rendimento de grãos na cultura de feijoeiro equivalente à aplicação de até 160 kg ha<sup>-1</sup> de N.

**Tabela 5** - Número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN) em raízes de feijoeiro cv Bonus sob dois níveis de irrigação<sup>(1)</sup>

Tratamento	NN (n° planta <sup>-1</sup> )		MSN (mg planta <sup>-1</sup> )	
	IC	DH	IC	DH
Testemunha	38 Ba	20 Bb	99,75 Ba	75,50 Bb
Riz	55 Aa	32 Ab	114,00 Aa	86,25 ABb
Riz + AHBac	53 Aa	32 Ab	115,75 Aa	98,50 Ab
N	14 Ca	9 Ca	41,25 Ca	27,00 Cb

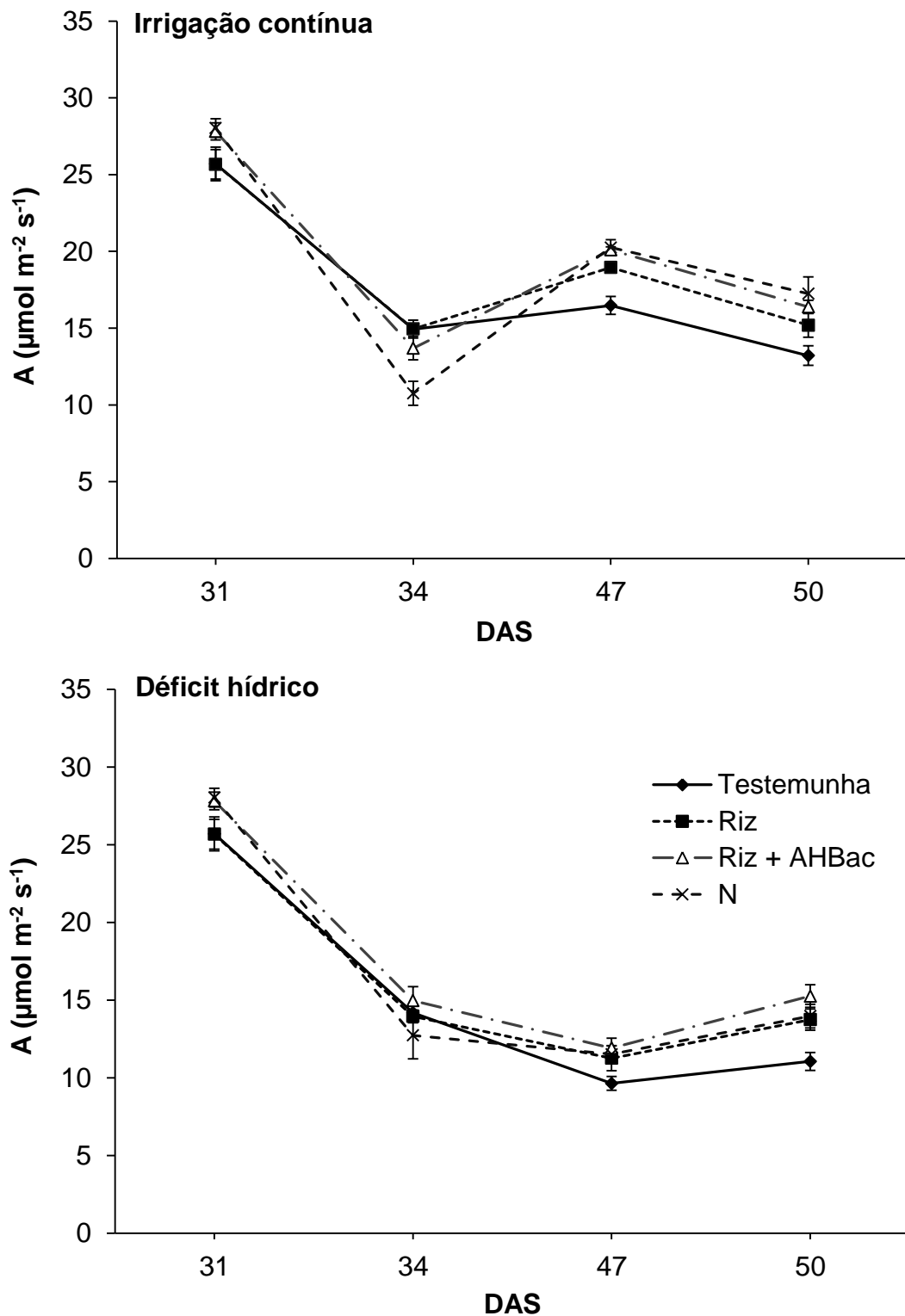
<sup>(1)</sup>Médias de quatro repetições. Riz = rizóbio; AHBac = presença de bactérias diazotróficas endofíticas e ácidos húmicos; N = nitrogênio; IC = irrigação contínua; DH = déficit hídrico. Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste *t* de student (LSD) em 5% de probabilidade.

A deficiência hídrica ocasionou diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos na taxa fotossintética líquida (A) (Figura 4), com reduções significativas no período de déficit hídrico máximo (47 DAS). Neste período, a testemunha apresentou menor valor de taxa fotossintética ( $9,64 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) entre os tratamentos, e não foram verificadas diferenças significativas entre os demais tratamentos. Após reidratação (50 DAS), todos os tratamentos apresentaram taxas fotossintéticas compatíveis com as plantas irrigadas continuamente. Contudo, as diferenças foram significativas entre os tratamentos, com destaque para Riz + AHBac que apresentou maior valor de A ( $15,26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), correspondendo a uma diferença de 7% em relação ao mesmo tratamento com irrigação contínua.

A diminuição no valor da taxa fotossintética líquida em situação de déficit hídrico é geralmente atribuída ao fechamento estomático com consequente

restrição à difusão de gás carbônico. Entretanto, Tezara et al. (1999), em estudo realizado com girassóis afirmaram que a diminuição da síntese de adenosina trifosfato (ATP) e ribulose bifosfato (RuBP), responsáveis pelo metabolismo do gás carbônico no ciclo de Calvin, seriam os verdadeiros responsáveis pela diminuição desse parâmetro.

Souza et al. (2004), em experimento com plantas irrigadas da cultivar *V. unguiculata*, Vita 7, alcançaram taxas fotossintéticas de  $17,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Anyia e Herzog (2004) ao analisarem esse mesmo parâmetro em plantas irrigadas da cultivar *V. unguiculata*, RCXAC, observaram taxas de  $12,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Pimentel e Hébert (1999) em experimento com plantas irrigadas da cultivar de *P. vulgaris*, BAT 117, encontraram valores de A de  $13,90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Sob deficiência hídrica, as cultivares citadas não apresentaram grandes variações de comportamento.



**Figura 4** - Taxa fotossintética líquida ( $A$ ) em cultivar de *P. vulgaris* L., Bonus, nos diferentes tratamentos: Testemunha absoluta; inoculação com rizóbio (Riz) na presença ou não de bactérias diazotróficas endofíticas e ácidos húmicos isolados de vermicomposto (AHBac); e aplicação de nitrogênio mineral (N), submetidos a dois níveis de irrigação: Irrigação contínua com umidade do solo na capacidade de campo e sob déficit hídrico no estágio pré-floração. DAS = Dias após a sementeira. Cada ponto representa média de quatro repetições. Barras verticais em cada ponto ao longo do gráfico representam o desvio padrão.

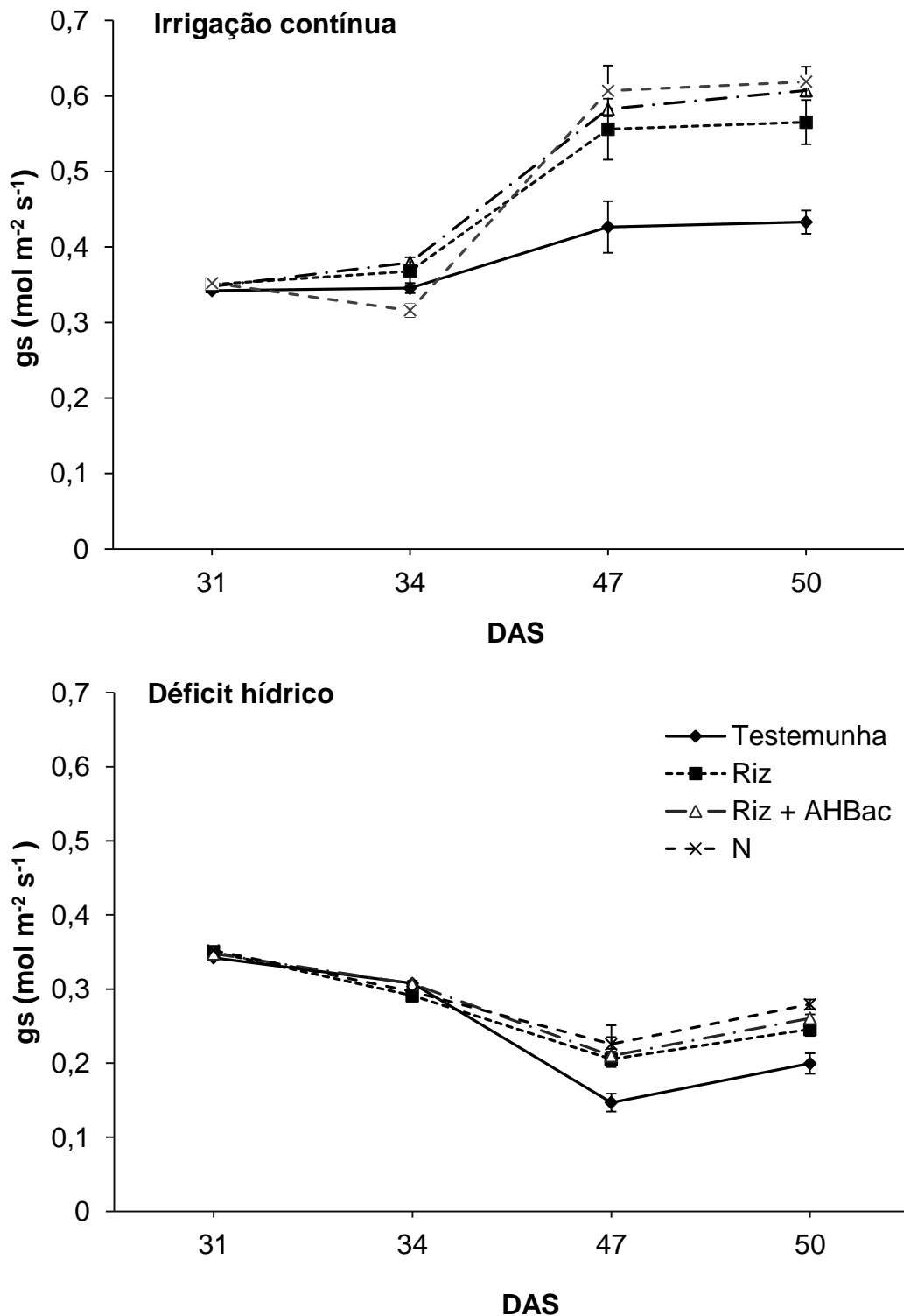
Com relação à condutância estomática (gs), foram verificadas diminuições em todos os tratamentos com a progressão da deficiência hídrica (Figura 5). Mas, não foram observadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos nos primeiros três dias de déficit hídrico. Já no 16º dia de déficit hídrico (47 DAS), houve diferenças entre os tratamentos, com destaque para testemunha que apresentou menor valor de condutância estomática ( $0,15 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Os outros tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si, neste dia. Aos 50 DAS (dois dias após a reidratação, em plantas submetidas ao déficit hídrico) as plantas que receberam N mineral e as inoculadas com Riz + AHBac apresentaram maiores valores de condutância estomática ( $0,28 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $0,26 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente), apresentando diferenças significativas em relação à testemunha, mas não entre si.

É provável que os valores maiores de condutância estomática após a reidratação condicionaram maior atividade fotossintética e uma retomada mais rápida do crescimento da planta. A presença AHBac proporcionou maior abertura dos estômatos. Russel et al. (2006) verificaram que a aplicação de SH em plantas de ervilha proporcionou abertura estomática máxima. Neste caso, é provável que os maiores valores de condutância estomática obtidos nesse experimento sejam devido ao uso combinado de AHBac. A testemunha foi o tratamento mais afetado pelo déficit hídrico, apresentando o valor da condutância estomática ( $0,20 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) menor que os demais após a reidratação.

Estes valores baixos observados para condutância estomática em resposta ao déficit hídrico justificam a menor taxa transpiratória nesta situação (Figura 6). Resultados semelhantes aos observados nesse experimento foram encontrados por Santos et al. (2006) em estudos realizados com as cultivares de *P. vulgaris* A320 e Ouro Negro.

O fechamento estomático junto com a inibição do crescimento foliar estão entre as primeiras respostas à seca protegendo as plantas contra perda de água. Plantas que conseguem rapidamente evitar a perda de água com a diminuição do fluxo estomático e manter, temporariamente, taxas fotossintéticas iguais mesmo em seca apresentam mecanismos de adaptação à seca. A abertura e o fechamento dos estômatos são ocasionados pelas mudanças no turgor das células guarda, as quais respondem a sinais químicos que vão das raízes desidratadas até os brotos.

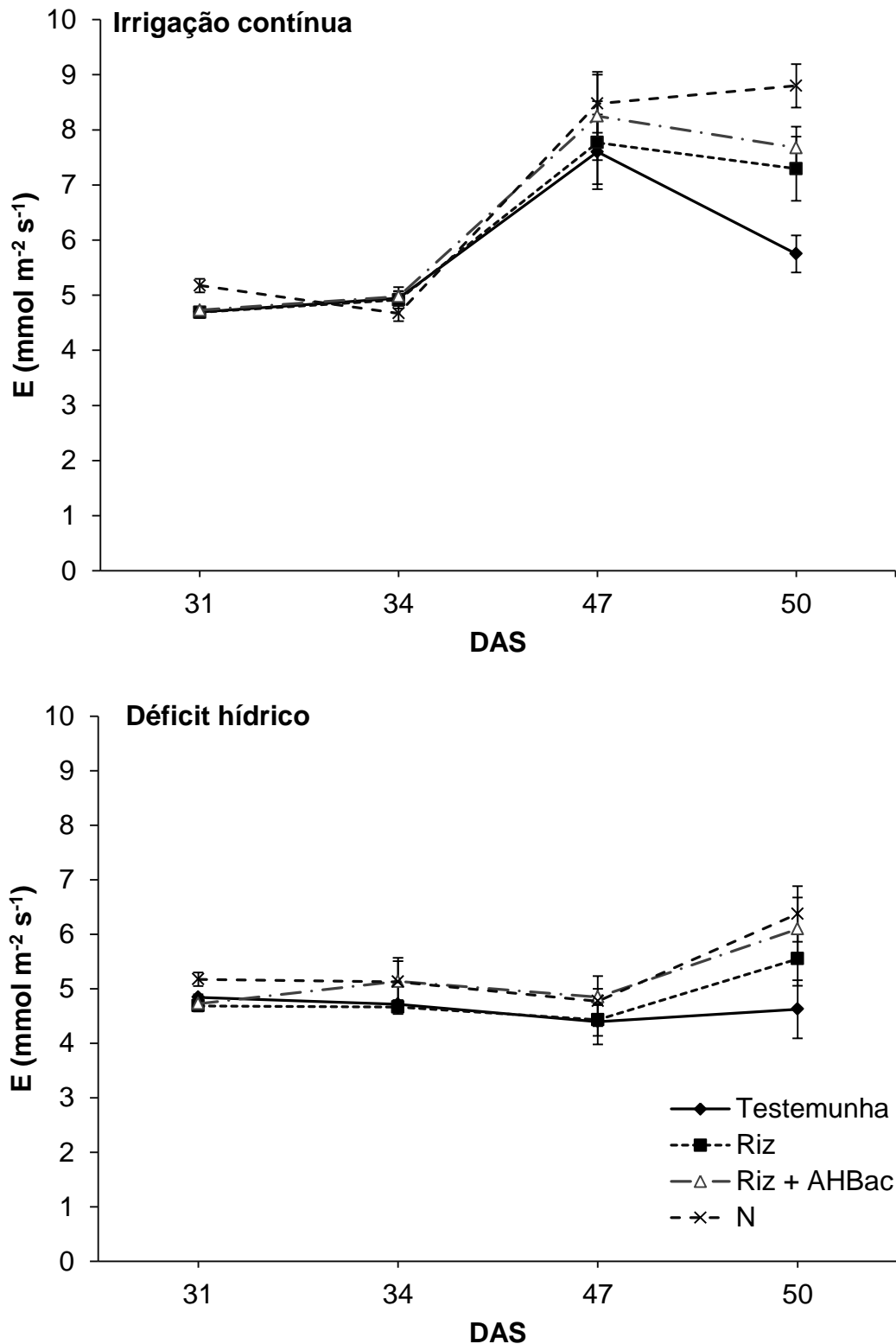




**Figura 5** - Condutância estomática (gs) em cultivar de *P. vulgaris* L., Bonus, nos diferentes tratamentos: Testemunha absoluta; inoculação com rizóbio (Riz) na presença ou não de bactérias diazotróficas endofíticas e ácidos húmicos isolados de vermicomposto (AHBac); e aplicação de nitrogênio mineral (N), submetidos a dois níveis de irrigação: Irrigação contínua com umidade do solo na capacidade de campo e sob déficit hídrico no estágio pré-floração. DAS = Dias após a semeadura. Cada ponto representa média de quatro repetições. Barras verticais em cada ponto ao longo do gráfico representam o desvio padrão.

A transpiração foliar (E) está relacionada à redução da temperatura da folha. Neste trabalho, as respostas de E foram bem semelhantes às respostas de gs, evidenciando uma relação entre as duas variáveis (Figuras 5 e 6). Foram observadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos nas respostas de E (Figura 6). No entanto, não houve diferenças significativas entre os tratamentos no período de restrição hídrica mais intensa (47 DAS). Já no período após seca (50 DAS), foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos submetidos ao déficit hídrico, nos quais os tratamentos aplicação de N mineral e inoculação com Riz na presença de AHBac apresentaram maiores valores de E ( $6,37 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e  $6,10 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), correspondendo a reduções respectivas de 27 e 20% em relação aos mesmos tratamentos sem deficiência hídrica.

Souza et al. (2005), em experimento realizado com a cultivar de *P. vulgaris* L., Jalo, observaram taxas transpiratórias próximas de  $5,0 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  em plantas irrigadas. Valores semelhantes foram observados nesse experimento na testemunha em plantas irrigadas continuamente. Os demais tratamentos com irrigação contínua apresentaram valores na faixa de 7,3 a  $8,8 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . É provável que a interação AHBac na concentração de  $50 \text{ mg C L}^{-1}$  condicionou maior abertura dos estômatos e consequente maior transpiração em plantas de feijoeiro submetidas ao déficit hídrico.



**Figura 6** - Transpiração (E) em cultivar de *P. vulgaris* L., Bonus, nos diferentes tratamentos: Testemunha absoluta; inoculação com rizóbio (Riz) na presença ou não de bactérias diazotróficas endofíticas e ácidos húmicos isolados de vermicomposto (AHBac); e aplicação de nitrogênio mineral (N), submetidos a dois níveis de irrigação: Irrigação contínua com umidade do solo na capacidade de campo e sob déficit hídrico no estágio pré-floração. DAS = Dias após a sementeira. Cada ponto representa média de quatro repetições. Barras verticais em cada ponto ao longo do gráfico representam o desvio padrão.

Não foram observadas diferenças significativas no conteúdo relativo de água (CRA) entre os tratamentos dentro de cada nível de irrigação (Tabela 6). Entretanto, houve diferenças significativas entre os níveis de irrigação. Após a reidratação (50 DAS), os tratamentos Riz e inoculação com Riz na presença de AHBac apresentaram maiores valores de CRA, 86,1 e 86,3% respectivamente, sendo que não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de irrigação (irrigação contínua na capacidade de campo e déficit hídrico) nesses tratamentos. Estes resultados mostram a tendência da rápida recuperação do feijoeiro Bonus quando submetido a um período curto de seca. Contudo, nenhum dos tratamentos atingiu valores críticos de CRA que pudessem comprometer a sobrevivência dos tecidos vegetais. De acordo com Bray et al. (2000), embora haja variação a depender do tipo de tecido e da espécie, os valores considerados críticos situam-se abaixo de 50%. Ainda segundo os mesmos autores, as plantas que realizam ajustamento osmótico conseguem manter altos valores de CRA associados a baixos valores de potencial hídrico foliar. Este parece ser o caso da cultivar estudada quando submetida ao tratamento Riz na presença de AHBac.

Diallo et al. (2001) também não encontraram reduções significativas em CRA no estudo realizado com a cultivar B89-504 da espécie *V. unguiculata*. Estudo realizado por França et al. (2000) com as cultivares de *P. vulgaris*, A320, Carioca, Ouro Negro e Xodó apresentou CRA entre 80 e 90%. Os autores associaram a ausência de variações significativas nesse parâmetro à osmorregulação. Reforçando esses resultados, Martinez et al. (2007), em experimento realizado na Universidade do Chile com as cultivares de *P. vulgaris* Barbucho, Coscorrón, Pinto 114, Orfeo e Tórtola também não observaram variações significativas intra e Intergenótipos no CRA em virtude da deficiência hídrica. Tal parâmetro variou entre 78,7 e 90,8% nas plantas estudadas.

**Tabela 6** - Conteúdo relativo de água nas folhas (CRA) de feijoeiro Bonus sob dois níveis de irrigação e três momentos de coletas<sup>(1)</sup>

Tratamento	CRA (%)				
	31 DAS	47 DAS		50 DAS	
	IC	IC	*DH	IC	*DH
Testemunha	92,5 A	91,1 Aa	67,5 Ab	91,6 Aa	78,7 Ab
Riz	93,4 A	95,3 Aa	74,1 Ab	92,8 Aa	86,1 Aa
Riz + AHBac	95,1 A	94,5 Aa	73,9 Ab	93,7 Aa	86,3 Aa
N	93,4 A	95,2 Aa	76,1 Ab	93,8 Aa	83,4 Ab

<sup>(1)</sup>Médias de quatro repetições. DAS = dias após a semeadura; Riz = rizóbio; AHBac = presença de bactérias diazotróficas endofíticas e ácidos húmicos; N = nitrogênio; IC = irrigação contínua; DH = déficit hídrico. Valores seguidos de mesma letra em mesmo momento de coleta não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste *t* de student (LSD) em 5% de probabilidade. \*Dias 47 e 50 representam déficit hídrico máximo e dois dias após a reidratação respectivamente, para tratamentos submetidos ao déficit hídrico.

A atividade da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) nas folhas foi significativamente ( $P < 0,05$ ) modificada pelos tratamentos (Tabela 7). No período de déficit hídrico máximo (47 DAS) foram observadas diferenças significativas entre os níveis de irrigação. As plantas em condições de déficit hídrico apresentaram maiores valores de PAL. Nessas condições, a atividade da enzima foi maior e estatisticamente diferente nas plantas adubadas com N ( $96,8 \mu\text{M min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) em comparação com os demais tratamentos. Os tratamentos Riz e inoculação com Riz na presença de AHBac não apresentaram diferenças ( $P < 0,05$ ) entre si no momento de deficiência hídrica intensa. O déficit hídrico aumentou a atividade da PAL, conseqüentemente ativando os mecanismos de defesa e de produção de metabólitos secundários nas plantas de feijoeiro Bonus. Após a reidratação ocorreu a estabilização da atividade de PAL nos tratamentos. Entretanto, a testemunha apresentou menor atividade ( $48,5 \mu\text{M min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) e estatisticamente diferente com os demais tratamentos na condição de déficit hídrico.

Estes resultados estão de acordo com a observação de (Chakraborty et al., 2001; Rivero, 2001), que citam a fenilalanina amônia liase como uma “enzima do estresse”, relacionando-a com o desenvolvimento de mecanismos de proteção e adaptação de plantas a situações adversas. Esses mesmos autores relatam

ainda que a atividade da PAL está diretamente relacionada com a tolerância de plantas a diversos fatores bióticos e abióticos, cujo déficit hídrico traz consequências significantes nas concentrações de metabólitos secundários em plantas.

**Tabela 7** - Atividade da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) em folhas de feijoeiro Bonus, sob dois níveis de irrigação e três momentos de coletas<sup>(1)</sup>

Tratamento	PAL ( $\mu\text{M min}^{-1} \text{g}^{-1}$ )				
	31 DAS	47 DAS		50 DAS	
	IC	IC	*DH	IC	*DH
Testemunha	59,2 C	67,2 Ba	69,7 Ca	49,5 Aa	49,0 Ba
Riz	85,0 B	75,1 ABa	79,3 BCa	54,3 Aa	60,3 Aa
Riz + AHBac	83,9 B	65,9 Ba	81,9 Bb	52,7 Aa	61,9 Aa
N	103,1 A	79,9 Aa	96,8 Ab	58,0 Aa	64,9 Aa

<sup>(1)</sup>Médias de quatro repetições. DAS = dias após a semeadura; Riz = rizóbio; AHBac = presença de bactérias diazotróficas endofíticas e ácidos húmicos; N = nitrogênio; IC = irrigação contínua; DH = déficit hídrico. Valores seguidos de mesma letra em mesmo momento de coleta não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste *t* de student (LSD) em 5% de probabilidade. \*Dias 47 e 50 representam déficit hídrico máximo e dois dias após a reidratação respectivamente, para tratamentos submetidos ao déficit hídrico.

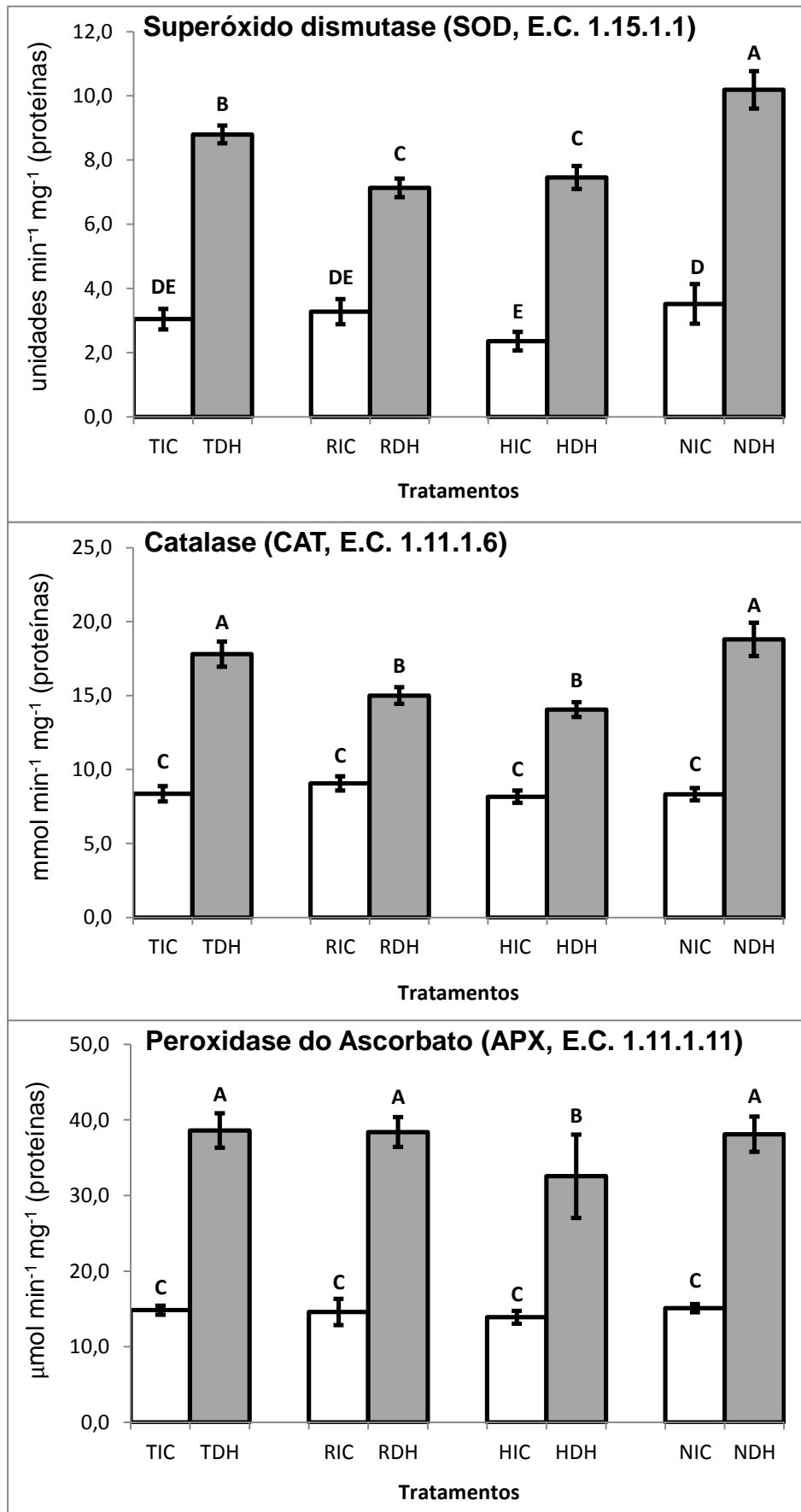
Foram verificadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os níveis de irrigação nas diferentes atividades de enzimas antioxidantes analisadas (Figura 8). Em relação aos tratamentos, não foram observadas diferenças significativas nas atividades de CAT e APX sob condições de irrigação contínua. Entretanto, nas mesmas condições, foram observadas diferenças entre os tratamentos na atividade de SOD.

Foi verificado o aumento da atividade das enzimas em todos os tratamentos quando as plantas foram sujeitas ao déficit hídrico. Resultados semelhantes foram obtidos por Xiong e Zhu (2002). Estes autores verificaram que em plantas sujeitas à deficiência hídrica observa-se um aumento na atividade dessas enzimas relacionado ao aumento na tolerância à seca. Porém, houve

diferenças significativas entre os tratamentos sob déficit hídrico, em todas as atividades enzimáticas analisadas. As plantas que receberam N mineral apresentaram maior valor de SOD (10,2 unidades  $\text{mg}^{-1}$  de proteínas) e os tratamentos Riz e inoculação com Riz na presença de AHBac tiveram menores atividades respectivas (7,1 e 7,5 unidades  $\text{mg}^{-1}$  de proteínas).

Para a atividade de CAT, a aplicação de N mineral às plantas e a testemunha não apresentaram diferenças ( $P < 0,05$ ) entre si, quando submetidas ao déficit hídrico e, apresentaram maiores valores em relação aos demais tratamentos. Já para a atividade de APX, o tratamento Riz na presença de AHBac apresentou menor valor (32,6  $\text{mmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteínas) em situação de déficit hídrico enquanto que os demais tratamentos não apresentaram diferenças em nível de 5% de probabilidade pelo teste *t* de student (LSD).

Cordeiro et al. (2011) verificaram indução da atividade da CAT por AH. Vasconcelos et al. (2009) em estudos com plantas de milho e de soja também verificaram aumentos nas atividades de SOD e APX nas plantas de milho com aplicação de SH, mas não observaram efeito aumentos na atividade de CAT. Apesar de ocorrer aumentos nas atividades das enzimas antioxidantes em todos os tratamentos submetidos à seca, as plantas inoculadas com Riz+AHBac em regime de déficit hídrico apresentaram menores atividades enzimáticas em relação aos demais tratamentos nas mesmas condições de umidade, ou seja, a inoculação com AHBac promoveu menor atividade das enzimas antioxidantes.



**Figura 7** - Atividades das enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase do ascorbato em cultivar de *P. vulgaris* L., Bonus, nos diferentes tratamentos: TIC = testemunha, com irrigação contínua; TDH =



testemunha, com déficit hídrico; RIC = rizóbio, com irrigação contínua; RDH = rizóbio, com déficit hídrico; HIC = ácido húmico na presença de rizóbio e bactérias diazotróficas endofíticas, com irrigação contínua; HDH = ácido húmico na presença de rizóbio e bactérias diazotróficas endofíticas, com déficit hídrico; NIC = nitrogênio, com irrigação contínua; NDH = nitrogênio, com déficit hídrico. Barras seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste *t* de student (LSD) em 5% de probabilidade. Média de 3 coletas (31, 47 e 50 DAS) com 4 repetições cada para tratamentos sob regime de irrigação contínua e 2 coletas (47 e 50 DAS) com 4 repetições cada para tratamentos sob déficit hídrico. DAS = Dias após a semeadura.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Esta dissertação mostrou que o uso da tecnologia de co-inoculação com rizóbio e bactérias diazotróficas endofíticas na presença de ácidos húmicos em plantas de feijoeiro é promissor e representa uma nova frente de pesquisa para o desenvolvimento de tecnologias alternativas para a agricultura, principalmente para países como o caso de Moçambique, cuja agricultura é caracterizada pelo baixo ou nenhum uso de insumos agrícolas e vulneráveis às variações climáticas, especialmente as secas.

Esta pesquisa foi desenvolvida no âmbito de cooperação internacional entre Brasil e Moçambique e a sua hipótese foi de que plantas co-inoculadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal e ácidos húmicos apresentam melhor recuperação ao déficit hídrico do que plantas não co-inoculadas. Para atender o objetivo proposto nesse trabalho foi instalado experimento na casa da vegetação. Foram avaliados a biomassa das plantas, o número e a massa de nódulos, a taxa fotossintética líquida, a condutância estomática e a transpiração e a atividade das seguintes enzimas: fenilalanina amônia liase, superóxido dismutase, catalase e peroxidase do ascorbato.

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

Plantas inoculadas com Riz na presença de AHBac apresentaram melhor recuperação à seca em relação às não co-inoculadas, indicando um possível

efeito da inoculação Riz + AHBac na recuperação do feijoeiro face ao déficit hídrico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anyia, A. O., Herzog, H. (2004) Water-use efficiency, leaf area and leaf gas exchange of cowpeas under mid-season drought. *European Journal of Agronomy*, 20:327-339.
- Apel, K., Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Ardila, H., Baquero, B., Martínez, S. (2007) Inducción de la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa en clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) por elicitores del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi* raza 2. *Revista colombiana de química*, 36(2):151-167.
- Bailly, C, Benamar, A, Corbineau, F, Come, D. (1996) Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. *Physiologia Plantarum*, 97:104-110.
- Bazzicalupo, M., Okon, Y. (2000) Associative and endophytic symbiosis. In: Pedrosa, F., Hungria, M., Yates, M. G., Newton, W. E. (eds.) *Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 409-410.

- Bárbaro, I. M., Machado, P. C., Bárbaro Junior, L. S., Ticelli M., Miguel, F. B., Silva, J. A. A. (2009) Produtividade da soja em resposta à inoculação padrão e co-inoculação. *Colloq Agrar*, 5:1–7.
- Bray, E. A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk (2000) Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (eds.) *Biochemistry e Molecular Biology of Plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 1158-1203.
- Canellas, L. P., Balmori, D. M., Médici, L. O., Natália, N. O., Campostrini, E., Rosa, C. C. R., Façanha, A. R., Olivares, F. L. (2012) A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant Soil*, 366:119-132.
- Canellas, L. P., Piccolo, A., Dobbss, L. B., Spaccini, R., Olivares, F. L., Zandonadi, D. B., Façanha, A. R. (2010) Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. *Chemosphere*, 78:457-466.
- Canellas, L. P., Façanha, A. O., Olivares, F. L., Façanha, A. R. (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology*, 130:1951-1957.
- Cavalcanti, F. R., Lima, J. P. M. S., Ferreira-Silva, S. L., Viégas, R. A., Silveira, J. A. G. (2007) Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. *Journal of Plant Physiology*, 164:591-600.
- Chakraborty, U., Dutta, S., Chakraborty, B. (2001) Drought induced biochemical changes in Young tea leaves. *Indian Journal of Plant Physiology*, 6:103-106.
- Chaves, M. M., Flexas, J., Pinheiro, C. (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103:551-560.
- Chen, Y., Aviad, T. (1990) Effects of humic substances on plant growth. In: Maccarthy, P., Capp, C. E., Malcolm, R. L., Bloom, P. R., (eds) *Humic*

*substances in soil and crop sciences: selected readings*. Madison: American Society of America, p. 161-186.

- Conceição, P. M., Vieira, H. D., Canellas, L. P., Olivares, F. L., Conceição, P. S. (2009) Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. *Ciência Rural, Santa Maria*, 39(6):1880-1883.
- Cordeiro F. C., Santa-Catarina C., Silveira V., Souza S. R. (2011) humic acids effect on catalase activity and generation of reactive oxygen species in corn (*Zea mays*). *Biosc. Biotechnol Biochem*, 75:70-74.
- Diallo, A. T., Sambb, P. I., Roy-Macauley, H. (2001) Water status and stomatalbehaviour of cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp, plants inoculated with two *Glomus* species at low soil moisture levels. *European Journal of Soil Biol.* 37:187-196.
- Dobbss, L. B., Medici, L. O. , Peres, L. E. P., Pino-nunes, L. E. , Rumjanek, V. M., Façanha, A. R., Canellas, L. P. (2007) Changes in root development of *Arabidopsis* promoted by organic matter from oxisols. *Annals of Applied Biology*, 151:199-211.
- Döbereiner, J. (1992) Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. *Ci. Cult.*, 44:310-313.
- Embrapa (2013) *Sistema Brasileiro de Classificação de Solos*. 3. ed. rev. ampl. Brasília DF, 353p.
- Fageria, N. K., Baligar, V. C., Jones, C. A. (1991) Common bean and cowpea. In: Fageria, N. K., Baligar, V. C., Jones, C. A. (eds.) *Growth and mineral nutrition of field crops*. New York: M. Dekker, p. 280-318.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S. M. A. (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29:185-212.
- Fitter, A. H., Stickland, T. R. (1991) Architectural analysis of plant root systems 2. Influence of nutrient supply on architecture in contrasting plant species. *New Phytologist*, 118:383-389.

- França, M. G. C., Thi, A. T. P.; Pimentel, C., Rossiello, R. O. P., Zuily-Fodil, Y., Laffray, D. (2000) Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 43:227-237.
- Franceli, A. L., Neto, D. D. (2007) *Produção de feijão*. ESALQ/USP, 386p.
- Frias, I., Caldeira, M. T., Perez Castineira, J. R., Avarro Avino, J. P., Culianez Macia, F. A., Kuppinger, O., Stransky, H., Pages, M., Hager, A., Serrano, R. (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase, characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell*, 8:1533-1544.
- Gepts, P., Fernández, F., López, M. (1985) Etapas de desarrollo en la planta de frijol. In: López, M., Fernández, F., Schoonhoven, A. van (eds.) *Frijol: Investigación y producción*. Cali: PNUD, CIAT, p. 61-78.
- Goel, A., Sheoran (2003) Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. *Biologia Plantarum*, 46(3):429-434.
- Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P. J., Azevedo, R. A. (2005) making the life of heavy metal-stress plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32:481-494.
- Hager, A., Debus, G., Edel, H. G., Stransky, H., Serrano, R. (1991) Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Planta*, 185:527-537.
- Hare, P. D., Cress, W. A. (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plants Growth Regulation*, 21:79-102.
- Havir, E., Mchale, N. A. A. (1989) Regulation of Catalase Activity in Leaves of *Nicotiana sylvestris* by High CO<sub>2</sub>. *Plant Physiology*, 89(3):952-957.
- Herrick, J. E., Wander, M. M. (1997) Relationships between soil by selected stability parameters and cropping and tillage practices. Organic carbon and soil quality in cropped and rangeland soils: *Geoderma*, 68:321-329.
- Hungria, M., Nogueira, M. A., Araújo, R. S. (2013) Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Biol Fertil Soils*, 49:791–801.

- Hungria, M., Campo, R. J., Mendes, I. C. A. (2007) *importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro*. Londrina: Embrapa Soja, 80p.
- Hungria, M., Campo, R. J., Mendes, I. C. (2003) Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biology and Fertility of Soils*, 39:88-93.
- Hungria, M., Andrade, D. S., Chueire, L. M. O., Probanza, A., Gutierrez-Mañero, F. J., Megías, M. (2000) Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, 32:1515-1528.
- Hungria, M., Franco, A. A., Sprent, J. I. (1993) New sources of high-temperature tolerant rhizobia of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil*, 149:103-109.
- IBGE (2013) *Indicadores IBGE: Estatística da Produção Agrícola*, 79p.
- Jaleel, C. A., Gopi, R., Sankar, B., Gomathinayagam, M., Panneerselvam, R. (2008) Differential responses in water use efficiency in two varieties of *Catharanthus roseus* under drought stress. *Comptes Rendus Biologies*, 331:42-47.
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Sankar, B., Gopi, R., Somasundaram, R., Panneerselvam, T. (2007) Alterations in osmoregulation, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 59:150-157.
- Koppen, W. (1948) *Climatologia: Con un estudio de los climas de la tierra*. México: Fondo de cultura econômica, 479p.
- Kramer, P. J., Boyer, J. S. (1995) *Water relations of plants and soils*. San Diego: Academic, 495p.
- Lima, A. S. T., Barreto, M. C. S., Araújo, J. M., Seldin, L., Burity H. A., Figueiredo, M. V. B. (2011) Sinergismo *Bacillus*, *Brevibacillus* e, ou, *Paenibacillus* na simbiose *Bradyrhizobium-caupi*. *Rev Bras Ci Solo*, 35:713-721.



- Marques Jr, R. B. (2010) *Uso de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas na produção de milho e cana-de-açúcar*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 93p.
- Marques Jr., R. B., Canellas, L. P., Silva, L. G., Olivares, F. L. (2008) Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. *R. Bras. Ci. Solo*, 32:1121-1128.
- Martinez, C., Cuevas, F. (1989) *Evaluacion de la calidad culinaria y molinera del arroz. Guía de estudo*. Cali: CIAT, 75p.
- Martinez, J. P., Silva, H., Ledent, J. F, Pinto, M. (2007) Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Journal of Agronomy*, 26:30-38.
- Mercante, F. M., Otsubo, A. A., Lamas, F. M. (2006) Inoculação de *Rhizobium tropici* e aplicação de adubo nitrogenado na cultura do feijoeiro. *In: Reunião Brasileira de fertilidade de solo e nutrição de plantas, 27.; Reunião Brasileira sobre micorrizas,11.; Simpósio Brasileiro de microbiologia do solo, 9.; Reunião Brasileira de biologia do solo, 6.* (org) Bonito, MS. Fertbio 2006: A busca das raízes. Dourados, Embrapa Agropecuária Oeste, CD-ROM. (Documentos, 82).
- Mesquita, F. R. et al. (2006) Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): Composição química e digestibilidade protéica. *Ciênc. agrotec.*, 31(4):1114-1121.
- MINAG (2012) *Balanço do Plano Econômico e Social 2011*. Maputo, 244p.
- Nakano, Y., Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant Cell Physiology*, 22:867-880.
- Nardi S., Carletti P., Pizzeghello D., Muscolo A. (2009) Biological activities of humic substances. *In: Senesi N, Xing B, Huang P. M. (eds) Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in*

- environmental systems. Vol 2, part 1. Fundamentals and impact of mineral-organicbiota interactions on the formation, transformation, turnover, and storage of natural nonliving organic matter (NOM)*. Wiley, Hoboken, p. 305-339.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A. (2002) Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34:1527-1536.
- Norman, M. J. T., Pearson, C. J., Searle, P. G. E. (1995) *The ecology of tropical food crops*. 2. ed. Cambridge, Grã-Bretanha: Universty Press, 430p.
- Oliveira, L. F. C., Oliveira, R. Z., Castro, T. A. P. (2009) Comportamento fisiológico de cafeeiros submetidos a diferentes disponibilidade de água no solo. *Bioscience journal*, 25(3):83-91.
- Oliveira, M. A. J., Bovi, M. L. A., Machado, E. C., Gomes, M. M. de A., Habermann, G., Rodrigues, J. D. (2002) Fotossíntese, condutância estomática, e transpiração em pupunheira sob deficiência hídrica. *Scientia Agricola*, 59(01):59-63.
- Oliveira, V. de P. S. (1996) *Avaliação do sistema de irrigação por sulco da fazenda do alto em Campos dos Goytacazes – RJ*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 94p.
- Ometto, J. C. (1981) Bioclimatologia tropical. *Agronômica Ceres*, 390–398.
- Peixoto, P. H. P., Cambraia, J., Sant'anna, R., Mosquin, P. R., Moreira, M. A. (1999) Aluminium effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11(3):137-143.
- Pelegrin, R., Mercante, F. M., Otsubo, I. M. N., Otsubo, A. A (2009) Resposta da cultura do feijoeiro a adubação nitrogenada à inoculação com rizóbio. *R. Bras. Ci. Solo*, 33:219-226.
- Peres, J. R. R., Suhet, A. R., Mendes, I. C., Vargas, M. A. T. (1994) Efeito da inoculação com rizóbio e da adubação nitrogenada em sete cultivares de

- feijão em solos de Cerrados. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, 18:415-420.
- Piccolo, A. (2002) The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy*, 75:57-134.
- Piccolo, A. (2001). The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science*, 66(11):810–832.
- Pimentel, C. (2004). *A relação da planta com a água*. Seropédica, Rio de Janeiro: Edur, 191p.
- Pimentel, C., Perez, A. J. de La (2000) Estabelecimento de parâmetros para avaliação de tolerância à seca, em genótipos de feijoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35(1):31-39.
- Pimentel, C., Hébert, G. (1999) Potencial fotossintético e condutância estomática em espécies de feijão caupi sob deficiência hídrica. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 11(1):7-11.
- Porch, T. G., Ramirez V. H., Santana D., Harmsen E. W. (2009) Evaluation of common bean for drought tolerance in Juana Diaz. *J Agron Crop Sci*, 195:328-334.
- Reis, V. M., Oliveira, A. L. M., baldani, V. L. D., Olivares, F. L., Baldani, J. I. (2006) Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: Fernandes, M. S. (org) *Nutrição Mineral de Plantas*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Viçosa: cap. VI, p. 153-174.
- Remans, R., Ramaekers, L., Schelkens, S., Hernandez, G., Garcia, A., Reyes, J. L., Mendez, N., Toscano, V., Mulling, M., Galvez, L., Vanderleyden, J. (2008) Effect of Rhizobium–Azospirillum coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant Soil*, 312:25–37.
- Ribeiro, A. C., Guimarães, P. T. G., Alvares V., V. H. (1999) *Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais*. 5ª Aproximação. Viçosa: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 359p.

- Rivero, R. M. et al. (2001) Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science*, 160:315-321.
- Russell, L., Stokes, A. R., Macdonald, H., Muscolo, A., Nardi, S. (2006) Stomatal responses to humic substances and auxin are sensitive to inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub>. *Plant and Soil*, 283:175-185.
- Sampaio, E. S. (1998). *Fisiologia Vegetal: Teoria e experimentos*. Ponta Grossa: UEPG, 179p.
- Santos, G. A., Silva, L. S., Canellas, L. P., Camargo, F. A. O. (2008) *Fundamentos da matéria orgânica do solo: Ecossistemas tropicais e subtropicais*. 2. ed. Porto Alegre: Metrópole, 636p.
- Santos, M. G., Ribeiro, R. V., Oliveira, R. F., Machado, E. C., Pimentel, C. (2006) The role of inorganic phosphate on photosynthesis recovery of common bean after a mild water deficit. *Plant Science*, 170:699-654.
- Santos, R. F., Carlesso, R. (1998) Déficit hídrico e os processos morfológicos e fisiológicos das plantas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 2(3):287-294.
- Sathe, S. K., Deshpande, S. S., Salunkhe, D. K. (1984) Dry beans of Phaseolus: a review I. Chemical composition: proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 20:1-46.
- Scuri, A. (2010) ImLab versão 2.3. TecGraf / PUC – Rio.
- Shigeoka, S.; Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. e Yoshimura, K. (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, 53:1305-1319.
- Singh, S. P. (1995) Selection for water-stress tolerance in interracial populations of common bean. *Crop Science Society of America*, 35:118-124.
- Soares, A. M. S., Machado, O. L. (2007) Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, 1(1):17.

- Souza, G. M., Viana, J. de O. F., Oliveira, R. F. de. (2005) Folhas assimétricas em feijoeiro sob deficiência hídrica exibem fotossíntese assimétrica. *Brazilian Journal Plant Physiology*, 17:2.
- Souza, R. P., Machado, E. C., Silva, J. A. B., Lagoa, A. M. M. A., Silveira, J. A. G. (2004) Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. *Environmental and Experimental Botany*, 51:45–56.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2009) *Fisiologia vegetal*. 4. ed., Porto Alegre: Artmed, 819p.
- Tezara, W., Mitchell, V. J., Driscoll, S. D., Lawlor, D. W. (1999) Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, 401:914-917.
- Turner, N. C. (1981) Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant Soil*, 58:339-366.
- Turner, N. C. (1986) Adaptation to water deficits: A changing perspective. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13:175-190.
- Van Genuchten, M. Th. (1980) A closed-form equation for predicting the conductivity of unsaturated soils. *Soil Science Society of American Journal*, 44:892-898.
- Vasconcelos, A. C. F., Zhang, X., Ervin, E. H., Kiehl, J. C. (2009) Enzymatic antioxidant responses to biostimulants in maize and soybean subjected to drought. *Sci. agric.*, 66(3):395-402.
- Vaughan, D., Malcolm, R. E. (1985) Influence of humic substances on growth and physiological processes. In: Vaughan, D., Malcolm, R.E. (eds.) *Soil Organic Matter and Biological Activity*. Boston: MA, USA, p. 37-75.
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., Zhu, J. K. (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, 45:523-539.
- Vieira, C., Junior, T., Borém, A. (2006) *Feijão*. 2. ed. Viçosa: UFV, 600p.

- Vilhordo, B. W., Mulher, L., Ewald, L. F. (1980) Hábito de crescimento em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomia Sulriograndense*, 16(1):79-88.
- Wentworth, M., Murchie E. H, Gray J. E., Villegas D., Pastenes C., Pinto M., Horton P. (2006) Differential adaptation of two varieties of common bean to abiotic stress. II. Acclimation of photosynthesis. *J Exp Bot*, 57:699-709.
- Xiong, L., Schumaker, K. S., Zhu, J. K. (2002) Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. *The Plant Cell*, 165-183.
- Yanik, T., Donaldson, R. P. (2005) A protective association between catalase and isocitrate lyase in peroxisomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 435:243-252.
- Yan-Chun Z., Rong-Ling Z. (1991) Phenolic compounds and an analog as superoxide anion scavengers and anti oxidants. *Biochemical Pharmacology*, 42(6):1177-1179.
- Zandonadi, D. B., Canellas, L. P., Façanha, A. R. (2007) Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H<sup>+</sup> pumps activation. *Planta*, 225:1583-1595.
- Zhao, H. et al. (2005) Stress stimulus induced resistance to *Cladosporium cucumerinum* in cucumber seeding. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44:36-40.