

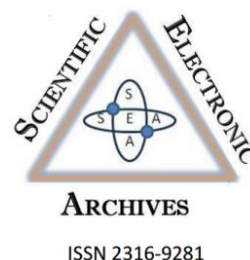
**Scientific Electronic Archives**

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 17 (5)

Sept/Oct 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.36560/17520241968>

Article link: <https://sea.ufr.edu.br/SEA/article/view/1968>



A co-inoculação de (*Azospirillum brasilense*) e (*Bradyrhizobium spp.*)  
promove crescimento em Feijão-Caupí no Semiárido Baiano

Co-inoculation of (*Azospirillum brasilense*) and (*Bradyrhizobium  
spp.*) promotes growth in Coupí Beans in Semi-arid Baiano

Corresponding author

**Bruno Gabriel Amorim Barros**

Universidade do Estado da Bahia

[brunoamorimagro1@gmail.com](mailto:brunoamorimagro1@gmail.com)

**Paula Pereira dos Passos**

Universidade do Estado da Bahia

**Paulo Roberto Barbosa de Jesus Júnior**

Universidade do Estado da Bahia

**Ana Thaila Rodrigues Felix**

Universidade do Estado da Bahia

**Adrielle dos Santos Oliveira**

Universidade do Estado da Bahia

**Nadja de Souza Cassimiro**

Universidade do Estado da Bahia

**Lindete Míria Vieira Martins**

Universidade do Estado da Bahia

**Resumo:** O estudo avaliou o crescimento inicial de plantas de Feijão-Caupí inoculadas com as estirpes BR's 3262, 3267 e *Azospirillum brasilense* em solo representativo do Vale do Submédio São Francisco. Foi realizado em casa de vegetação com sombreamento de 45%, na Universidade do Estado da Bahia utilizando vasos plásticos com capacidade para 5kg. Quarenta e cinco unidades amostrais foram distribuídas em 9 tratamentos (T1: controle absoluto; T2: controle nitrogenado; T3: inoculação BR3262; T4: inoculação BR3267; T5: inoculação *A. brasilense*; T6: BR3262 + *A. brasilense*; T7: BR3267 + *A. brasilense*; T8: BR3262 + *A. brasilense* + 10% de N; T9: BR3267 + *A. brasilense* + 10% de N) com cinco repetições, avaliando parâmetros de promoção de crescimento de comprimento e massas frescas e secas de parte aérea e raízes e fisiológicos de índice SPAD e atividade da enzima Redutase do Nitrato. Os dados coletados foram agrupados pelo teste de *Scott-Knott* à 5 de probabilidade. A co-inoculação mostrou resultados positivos no crescimento das plantas, indicando o potencial dos microrganismos na agricultura. A combinação das estirpes BR3262 e *A. brasilense* se destacou como promissora para o cultivo do Feijão-Caupí no Semiárido Baiano. O estudo demonstra a viabilidade desses microrganismos como alternativa para o aumento da produtividade agrícola.

**Palavras-chaves:** Biotecnologia, Rizóbio, *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

**Abstract.** The study evaluated the initial growth of Cowpea plants inoculated with strains BR's 3262, 3267 and *Azospirillum brasilense* in soil representative of the Sub-middle São Francisco Valley. It was carried out in a greenhouse with 45% shading, at the State University of Bahia using plastic pots with a capacity of 5kg. Forty-five sampling units were distributed into 9 treatments (T1: absolute control; T2: nitrogen control; T3: BR3262 inoculation; T4: BR3267 inoculation; T5: *A. brasilense* inoculation; T6: BR3262 + *A. brasilense*; T7: BR3267 + *A. brasilense*; T8: BR3262 + *A. brasilense* + 10% N; T9: BR3267 + *A. brasilense* + 10% N) with five replications, evaluating parameters to promote length growth and fresh and dry shoot masses. and physiological roots and SPAD index and Nitrate Reductase enzyme activity. The collected data were grouped using the Scott-Knott probability 5 test. Co-inoculation showed positive results on plant growth, indicating the potential of microorganisms in agriculture. The combination of strains BR3262 and *A. brasilense* stood out as promising for the cultivation of Cowpea in the Bahian Semiarid region. The study demonstrates the viability of these microorganisms as an alternative for increasing agricultural productivity.

**Keywords:** Biotechnology, Rhizobia, *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

## Introdução

O Feijão-Caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp é uma leguminosa herbácea, pertencente à família Fabaceae que apresenta considerável adaptação a climas tropicais e subtropicais, sendo cultivado em continentes como América Latina, África, sudeste da Ásia e sul dos Estados Unidos (JAYATHILAKE et al., 2018). A cultura apresenta importância, devido ao seu índice de proteínas, tolerância a estresses abióticos e por ser considerada importante para o segmento da agricultura familiar (CARVALHO et al., 2019).

O Brasil é considerado o terceiro maior produtor de Feijão-Caupí do mundo, tendo alcançado uma produtividade equivalente a 3 milhões de toneladas de grãos durante a safra de 2021/2022 com destaque para a região Nordeste responsável por 22% desta produção (CONAB, 2022).

Apesar de possuir diversas características que beneficiam o seu cultivo, o feijoeiro enfrenta desafios de baixa produtividade em razão da ocupação extensiva do solo por suas raízes e à disponibilidade limitada de nutrientes essenciais para o seu crescimento como o Nitrogênio (N).

O Nitrogênio é um dos elementos mais abundantes na atmosfera, todavia essa elevada concentração é indisponível para as plantas (SENA et al. 2020). O consumo global de fertilizantes nitrogenados está aumentando progressivamente, afim de atender as necessidades de uma população crescente (SIEBRECHT et al. 2020). O emprego sem moderação destes insumos é um tema preocupante, uma vez que possuem custo elevado e degradam o meio ambiente a cada dose de sua aplicação (GOPALAKRISHNAN et al., 2015).

Como alternativa ao uso de adubos nitrogenados, pode-se recorrer à Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), processo simbiótico realizado por bactérias do gênero *Rhizobium* em plantas leguminosas, conforme mencionado por Galindo et al. (2021). A FBN desempenha um papel significativo no fornecimento de nitrogênio atmosférico às plantas por meio da formação de estruturas chamadas de nódulos (DOBEREINER, 1997). A adoção de inoculantes rizobianos na cultura da soja resulta em uma economia anual de aproximadamente US\$ 9 bilhões em comparação com o uso de insumos nitrogenados.

As cepas BR3262 (*Bradyrhizobium pchyrrhizi*) e BR3267 (*Bradyrhizobium yuanmigenense*) são considerados estirpes de referência para inoculação e sucesso da FBN em Feijão-Caupí. Ensaios em casa de vegetação e campo, mostraram que ambos os microrganismos trazem benefícios para a cultura (LEITE et al. 2018). Porém, para alcançar altos rendimentos é imprescindível que a FBN seja altamente eficiente (MORETTI et al. 2018). A co-inoculação ou inoculação mista pode ser definida como a reunião de dois ou mais microrganismos que contribuem para processos microbianos, melhorando o crescimento e desenvolvimento das plantas (BARBOSA et al., 2021).

Pesquisas recentes mostram que a co-inoculação de *Bradyrhizobium spp.* com outras Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal – BPCV como *Azospirillum brasilense*, são capazes de fornecer benefícios a cultura do feijoeiro como aumento do sistema radicular, produção de sideróforos, síntese de hormônios de crescimento, proteção contra patógenos e melhor nodução de espécies leguminosas (ARORA et al., 2017; GALINDO et al., 2017).

O gênero *Azospirillum* é um dos grupos de microrganismos mais estudados pelos microbiologistas, pois possui capacidade de associação com aproximadamente 113 espécies vegetais que se encontram distribuídas em 35 famílias (PÉREZ et al. 2018). *A. brasilense* é considerada uma bactéria que promove o crescimento de plantas, a partir da produção de fitoreguladores como auxina e giberelina. Desde 2009, as cepas Ab-V5 e Ab-V6 são amplamente utilizadas como inoculantes comerciais, em virtude do seu potencial em áreas com cultivo de gramíneas e cereais (EMBRAPA, 2022).

A utilização de BPCV surge como alternativa inovadora no processo de aumentar a simbiose rizóbio-leguminosa. Para Armendariz et al. (2019), a junção destes microrganismos na soja, trouxe mecanismos fisiológicos que favorecem os cultivos, mesmo em condições de estresses abióticos como seca e salinidade.

Dessa forma, este estudo teve por objetivo avaliar o desenvolvimento inicial de plantas de Feijão-Caupí co-inoculado com as estirpes de *Bradyrhizobium* BR's 3262, 3267 e *Azospirillum*

*brasilense* em uma amostra de solo representativa do Submédio do Vale do São Francisco no Semiárido Baiano.

### Material e Métodos

#### Localização e caracterização edafoclimática da área experimental

O experimento ocorreu em dois momentos, sendo neste trabalho chamados de ciclos. O primeiro ciclo foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo, localizado no Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Universidade do Estado da Bahia – DTCS/UNEB, Campus III, Juazeiro – BA para obtenção e crescimento dos isolados utilizados.

O segundo foi conduzido em casa de vegetação do tipo arco com telado, contendo 45% de sombreamento, situada no sentido leste-oeste com 3,2m de pé direito, 10m de largura e 32m de comprimento, localizada também no DTCS/UNEB em Juazeiro – BA, obedecendo as coordenadas geográficas de 9°24S; 40° 30W, altitude de 368m e clima segundo a classificação de Koppen, BSh Semiárido quente, no período compreendido de abril à junho de 2023.

O solo utilizado foi retirado da camada 0-20cm de área sem presença de cultivos antecedentes nos últimos 6 anos, considerada como pastagem degradada, pertencente à classe Neossolo Flúvico com características físicas e químicas descritas na (Tabela 1).

**Tabela 1.** Composição química e física após análise de amostragem representativa de Neossolo Flúvico no município de Juazeiro – BA (2023).

pH	P	K	Ca	Mg	H+Al	SB	Areia	Silte	Argila
CaCl <sub>2</sub> mg dm <sup>-3</sup> -----cmolcdm <sup>-3</sup> -----							% g dm <sup>-3</sup> g kg <sup>-1</sup>		
7,0	15,0	0,19	3,18	0,86	0,64	4,24	86	12	2

#### Preparo do inóculo

Dois dos isolados utilizados neste experimento pertencem e foram obtidos a partir da coleção de microrganismos recomendados pela Embrapa e Ministério da Agricultura, ditas como estirpes de referência para inoculação em Feijão-Caupí.

Inicialmente, os inóculos de bactérias, BR3262 (*Bradyrhizobium pachyrrhizi*) e BR3267 (*Bradyrhizobium yuanmingense*) foram colonizados em meio de cultura YMA e levadas para incubação por 28°C durante 7 dias até ser possível a visualização de colônias puras.

As cepas de *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6) foram pertencentes da coleção de microrganismos funcionais do Laboratório de Microbiologia do Solo da UNEB/DTCS, sendo cultivadas no meio de cultura DYGS durante 3 dias, nas mesmas condições citadas acima.

Em seguida, os três isolados foram subcultivados em Erlenmeyers de 250ml nos mesmos meios de cultura já descritos, sem presença de ágar, sob agitação constante de 180 rotações por minuto (rpm) por um período de 7 dias em temperatura ambiente. Após aspecto turvo que indica crescimento, os caldos bacterianos foram levados para ajuste de densidade óptica (DO) em espectrofotômetro com leitura do comprimento da onda a 600nm.

#### Inoculação, semeadura e condução do experimento

Sementes da cultivar BRS Pujante foram desinfestadas superficialmente na sequência, álcool 70% (30s), hipoclorito de sódio comercial (5min) e 10 lavagens com água destilada estéril – ADE. A inoculação ocorreu após o ajuste da (DO) e desinfestação. O método utilizado foi o da microbiolização que consiste na imersão das sementes em inóculo bacteriano por cerca de 30 minutos.

A condução do experimento foi até 45 dias após a emergência (DAE) no pleno florescimento. Passados 8 (DAE) foi realizado o desbaste das plântulas, deixando duas por vaso. Nesse mesmo momento, os tratamentos que receberam os inóculos foram re-inoculados no sulco de plantio, utilizando 1ml de suspensão bacteriana.

Antes da semeadura, o solo recebeu adubação de fundação de Nitrogênio, Fósforo e Potássio (N-P-K) nas fontes de Ureia (45%), Super Simples (18%) e Cloreto de Potássio (60%) respectivamente, com exceção de N, para os tratamentos inoculados. A irrigação ocorreu pelo método localizado, utilizando uma bomba hidráulica com vazão de 1,8L/h com turno de rega a cada dois dias. A demanda de água era suprida por meio da diferença de pesagem úmida e seca do vaso, no intuito de atender a necessidade do solo em atingir capacidade de campo.

Paralelo à instalação do experimento de casa de vegetação com o intuito de estimar a densidade de células viáveis de rizóbio no solo, foi realizado um ensaio de Número Mais Provável – NMP em condições assépticas de câmara de germinação com fotoperíodo – B.O.D. Esta se compreendeu, na execução sucessivas de diluições seriadas (10<sup>-8</sup>) de 1g do solo utilizado no experimento em casa de vegetação. Após o procedimento, diluições de (10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> e 10<sup>-7</sup>) foram inoculadas em vasos de Leonard de 500ml em triplicata, contendo solo esterilizado e plantas iscas de Feijão-Caupí.

Durante a condução do ensaio, uma solução nutritiva esterilizada isenta de (N) conforme descrito por Norris e T' Mannelje (1964) foi aplicada uma vez por semana até a colheita do experimento. As plantas foram irrigadas com (ADE) e ceifadas 20 dias depois de inoculadas com as diluições de 10<sup>-5</sup>,

$10^{-6}$  e  $10^{-7}$  para serem avaliadas apenas nodulações.

#### Desenho experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado – DIC com 9 tratamentos: T1 (controle absoluto); T2 (controle nitrogenado); T3 (inoculação com BR3262); T4 (inoculação com BR3267); T5 (inoculação com *Azospirillum brasilense*); T6 (BR3262+ *A. brasilense*); T7 (BR3267 + *A. brasilense*); T8 (BR3262 + *A. brasilense* + 10kg ha<sup>-1</sup> de N até 15 dias após emergência); T9 (BR3267 + *A. brasilense* + 10kg ha<sup>-1</sup> de N até 15 dias após a emergência) e 5 repetições, totalizando em 45 unidades amostrais.

Exatamente aos 45 (DAE), as plantas foram colhidas e submetidas a análises de promoção de crescimento como comprimento e biomassas da parte aérea e raízes frescas e secas, número de nódulos, peso seco de nódulos e fisiológicas de índice de clorofila total (SPAD), atividade da enzima Redutase do Nitrato (RN) e teor de N da folha.

Após as análises, os dados foram rodados pelo Software Sisvar por meio do teste de agrupamento de médias *Scott-Knott* à 5% de probabilidade.

## Resultados e Discussão

### Promoção de crescimento vegetal

Houve diferenças significativas em todas as análises de promoção de crescimento avaliadas (Tabela 2).

A adição de nitrogênio mineral na co-inoculação apresentou resultados significativos para o comprimento de parte aérea (CPA). Nos tratamentos co-inoculados isento dos 10% de N, os dados mostraram que as plantas também obtiveram o mesmo comportamento. A estirpe recomendada, BR3262 mostrou promoção de crescimento da parte aérea tanto de forma isolada como combinada ao *A. brasilense*, quando comparada aos controles, BR3267 e (*A. brasilense*) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Médias obtidas a partir do teste de ANOVA, de comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CR), massa da raiz fresca (MRF), massa da parte aérea fresca (MPAF), massa da parte aérea seca (MPAS), massa da raiz seca (MRS) e peso de nódulos secos (PNS). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott* à 5% de probabilidade.

TRATAMENTOS	CPA	CR	MRF	MPAF	MPAS	MSR
Controle absoluto	47,2 c	45,3 b	12,85 c	10,24 b	4,41 b	4,05 c
Controle nitrogenado	50,2 c	45,6 b	15,9 c	10,44 b	3,99 b	4,77 c
Inoculação com BR 3262	64,8 a	46,1 b	21,11 c	18,65 a	8,03 a	6,06 c
Inoculação com BR3267	58,2 b	54 a	18,96 c	16,57 a	7,62 a	6,41 c
Inoculação com <i>A. brasilense</i>	55,7 b	51,8 a	20,53 c	16,33 a	7,91 a	6,71 c
Co-inoculação <i>A. brasilense</i> + BR3262	72 a	52,9 a	44,42 b	18,99 a	8,12 a	9,09 b
Co-inoculação <i>A. brasilense</i> + BR3267	59 b	46,5 b	58,83 b	15,15a	9,53 a	8,48 b
Co-inoculação <i>A. brasilense</i> + BR3262 + 10% N	72,9 a	47,2 b	76,83 a	17,7 a	9,53 a	12,53a
Co-inoculação <i>A. brasilense</i> + BR3267 + 10% de N	73,9 a	47,2 b	43,18b	17,7 a	8,52 a	9,01 a
CV (%)	11%	9%	21%	29%	21%	33%

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de *Scott-Knott* à 5% de probabilidade.

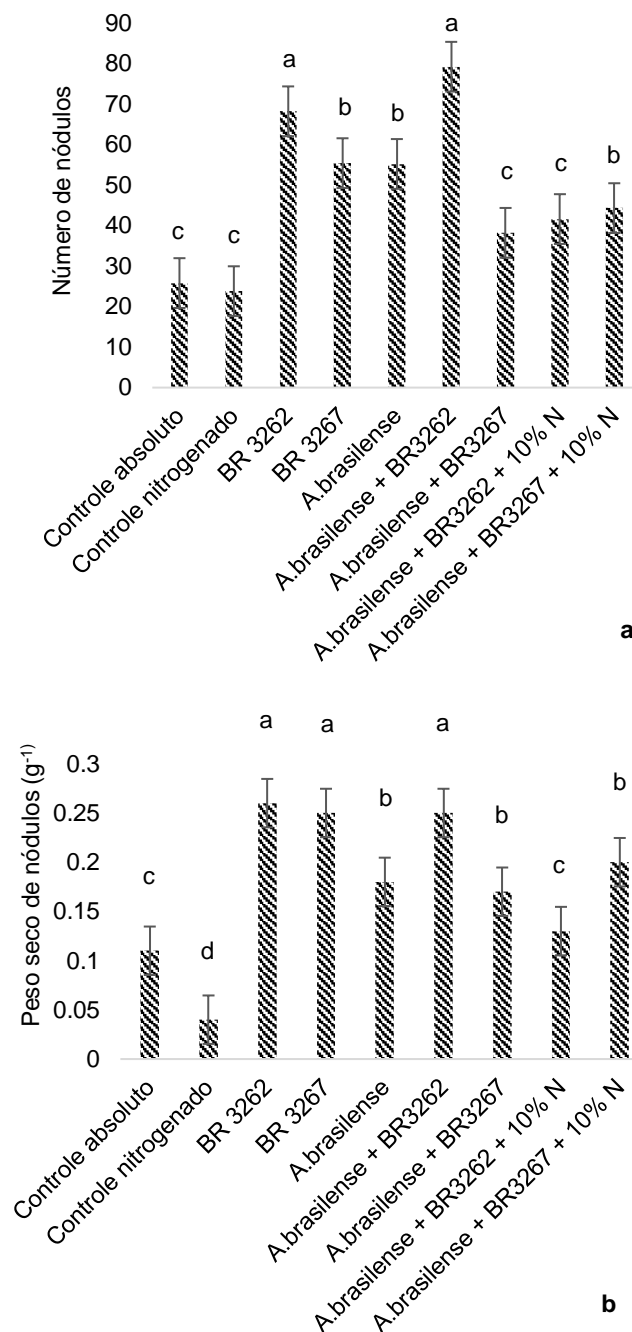
O comprimento de raiz (CR) se mostrou significativo aos tratamentos que receberam inoculação com BR3267, *A. brasilense* e BR3262 + *A. brasilense* se mantendo estatisticamente iguais entre si. Além disso, os mesmos tratamentos foram superiores aos controles absolutos, BR3262, BR3267 + *A. brasilense* e ambas as co-inoculações com adição de N (Tabela 2).

Os tratamentos quando submetidos a inoculação e co-inoculação apresentaram incremento nas variáveis de massa fresca de parte aérea (MFPA) e massa seca de parte aérea (MSPA). Para a massa fresca de raiz (MFR) e massa seca de raiz (MSR), os 10% da dose de N associado à co-inoculação da BR3262 e (*A. brasilense*) proporcionou um maior acúmulo de biomassa, mostrando um

comportamento discrepante entre os tratamentos (Tabela 2).

No experimento para obtenção de Número Mais Provável – NMP que se encontrava sendo instalado paralelo ao da casa de vegetação, revelou que a estimativa do número de células rizobianas nativas do solo foi baixa. O número de nódulos mostrou variações significativas entre os tratamentos que envolveram a inoculação com a cepa BR3262 e as co-inoculações desta com (*A. brasilense*) (Figura 1a).

Essa discrepância também se refletiu no peso seco dos nódulos, já que a inoculação com a cepa BR3267 relatou um comportamento que se compara ao da BR3262, assim como a combinação desta com (*A. brasilense*) (Figura 1b).



**Figura 1.** Médias comparadas a partir de análises de número (a) e peso seco de nódulos (b) submetidas à um teste de *Scott-Knott* com 5% de probabilidade.

#### Parâmetros fisiológicos

O Índice SPAD não apresentou diferenças significativas para todos os tratamentos. A inoculação e co-inoculação não se mostraram promissoras para os 3 estádios de avaliação (Figura 2).

A atividade da enzima *Redutase do Nitrato* (RN) revelou comportamento significativo entre os tratamentos para as leituras realizadas aos 15 e 30 DAE. Aos 15 dias, a enzima se mostrou mais ativa para o controle nitrogenado, inoculação com (*A. brasilense*) e as co-inoculações isoladas e

combinadas com a dose de 10% de N. Para os 30 dias, apenas a estirpe BR3262 se diferenciou de todos os outros tratamentos e aos 45 dias, nenhum dos inóculos apresentaram significância entre si (Figura 3).

O teor de N da folha foi totalmente influenciado pela inoculação e co-inoculação. Outrossim, o controle com adubação nitrogenada mostrou comportamento semelhante ao da estirpe BR3267, e a co-inoculação desta com (*A. brasilense*) (Figura 4).

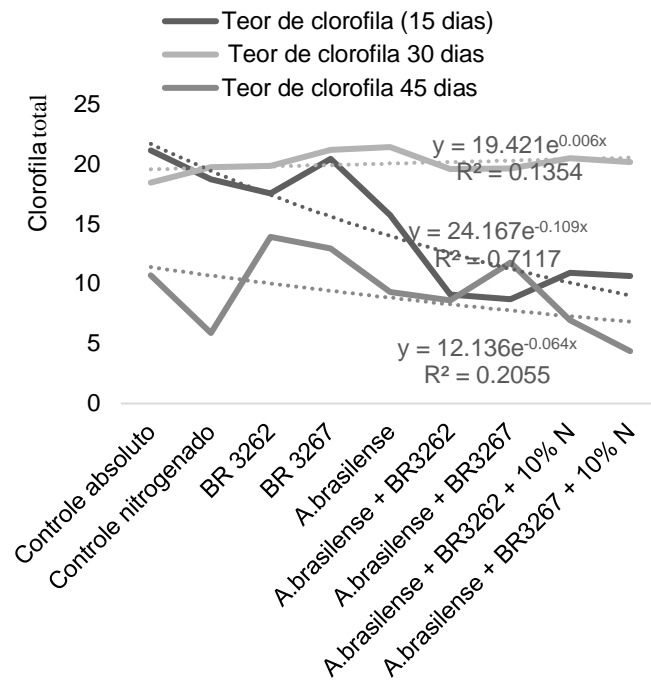


Figura 2. Médias dos valores obtidos para índice SPAD nos respectivos 15, 30 e 45 DAE após serem submetidos à um teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade

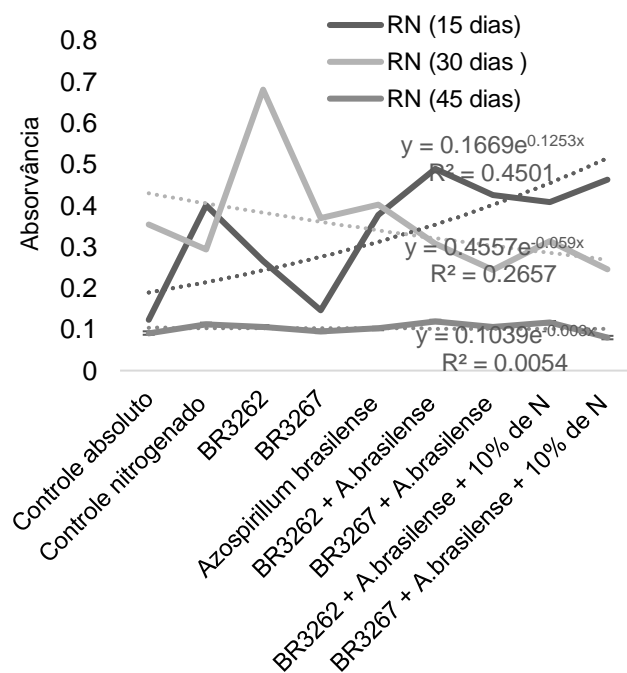


Figura 3. Médias obtidas a partir de análises realizadas entre 15, 30 e 45 DAE para obtenção da atividade da enzima redutase do nitrato (RN).

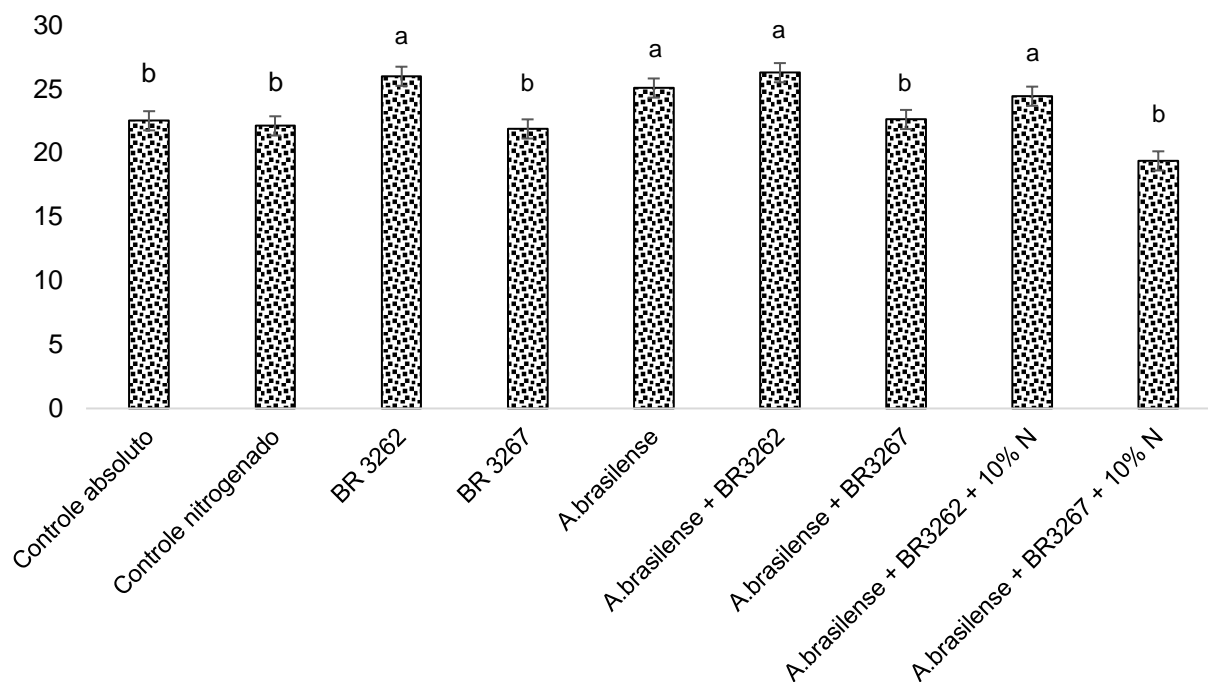


Figura 4. Médias dos valores obtidos para o teor de N da folha submetidos a um teste de Scott-Knott com 5% de probabilidade

O solo abriga uma extensa diversidade de microrganismos que se relacionam diretamente com a manutenção e saúde dos agroecossistemas. A presença de bactérias promotoras de crescimento vegetal – BPCV desempenham mecanismos essenciais na fertilidade dos solos, ciclagem de nutrientes e produção de fitohormônios (RAMAKRISHNA et al. 2019). Estudos apontam que as BPCV propiciam meios que potencializa a simbiose rizóbio e leguminosa, em função da redução dos níveis de etileno, liberação de auxinas, giberelinas, citocininas, excreção de sideróforos e solubilização de fosfato (CASSÁN et al., 2020).

Neste experimento aos 40DAE, foram observados comportamentos que podem estar relacionados com a promoção de crescimento promovida pela produção de fitohormônios. Cerca de 22% das plantas co-inoculadas com (*Bradyrhizobium spp.*) e (*A.brasilense*) já possuíam vagens definidas, comportamento considerado precoce para a cultivar plantada, visto que a primeira colheita é estimada em torno de 70 dias.

Estudos que foram lançados recentemente, afirmam que além do crescimento da planta, a inoculação com (*A.brasilense*) aumentou consideravelmente o rendimento de grãos em diversas leguminosas (CASSÁN et al., 2016). O uso desta tecnologia além de promover aumento da produtividade, consegue garantir mais conforto as plantas quando estão submetidas a estresses. Lopes et al., (2022) mostrou que mesmo após o incremento de estresse salino, o feijão-fava, co-inoculado com BR 3262 e (*A.brasilense*) foi capaz de marcar de maior taxa absoluta de altura de parte aérea em relação ao controle não inoculado.

O Ácido Indol-Acético – AIA é considerada uma das auxinas mais importantes, pois está envolvida em processos de regulação do desenvolvimento vegetal, indução de resistência, sinalização célula-célula, respostas a estímulos e formação de raízes laterais (BARNAWAL et al., 2019). Por meio da síntese desta substância, as BPCV podem instigar na arquitetura radicular das culturas. A formação de pelos radiculares e a diferenciação na estrutura celular das raízes, garante maior flexibilidade aos vegetais na busca de água e nutrientes no solo (LIN et al., 2015).

Quando se trata do estudo com (*A.brasilense*) associado à plantas, vários pesquisadores se concentram em avaliar o comportamento do sistema radicular. Dessa forma, muitos resultados encontram que a junção desta bactéria com linhagens de rizóbios aumenta consideravelmente a formação de raízes em soja e feijoeiro (CHIBEBA et al., 2015; HUNGRIA et al., 2019; FAGOTTI et al., 2018).

Não houve diferenças significativas para a produção de biomassa de parte aérea quando foi comparado a inoculação e co-inoculação. Resultados semelhantes foram encontrados por Galindo et al., (2022). Os 10% de N associados à co-inoculação com a BR3262, mostrou comportamento discrepante para as massas frescas e secas de raízes. A adição dessa porcentagem de adubo fornecido é recomendada para trabalhos envolvendo FBN, visto que, as plantas até iniciarem a simbiose com 15DAE, sofrem um déficit desse nutriente em seu metabolismo. No milho, a inoculação com cepas Ab-V5 e Ab-V6 junto a pequenas doses de N, foram responsáveis por

umentar o crescimento e produtividade da safra em relação à quantidades mais altas, mostrando que há compatibilidade da bactéria com fertilizantes nitrogenados, aplicados em pequenas quantidades (MARCOLINI et al., 2022).

A capacidade da planta em fixar N<sub>2</sub> é aumentada e seu potencial para maior produtividade é potencializado, devido à produção de maior área superficial de raízes produzidos por (*A. brasilense*) (PRANDO et al., 2019). A adição de adubos nitrogenados aos tratamentos co-inoculados não foi capaz de proporcionar crescimento de raiz. Este nosso resultado, corroborou com Galindo et al., (2022), onde plantas de Feijão-Caupí co-inoculadas sem adição de N obtiveram aumento de 15% no sistema radicular, tornando nítido o efeito inibitório do N industrial aos parâmetros de crescimento das leguminosas (CIAMPITTI et al., 2018).

Como esperado, o número e peso seco de nódulos foi totalmente influenciado pela presença de N mineral. As plantas que receberam adubação, possuíram menor nodulação. Podendo ser explicado ao fato, que esses tratamentos não receberam inoculação padrão e que o fornecimento de adubos nitrogenados para leguminosas é dispensável (ZILLI et al., 2006). Além disso, a população de rizóbios nativa no solo foi baixa, fator que pode ter influenciado em um maior sinergismo entre as estirpes inoculadas e as plantas, uma vez que o substrato era pertencente de pastagem degradada, sem cultivos antecedentes e possivelmente não apresenta outras espécies rizobianas competitivas.

O teor de N da parte aérea, se mostrou positivo para a inoculação e co-inoculação envolvendo a BR3262 e inoculação solteira com (*A. brasilense*). Resultados em casa de vegetação e campo, com cultivo de soja, puderam mostrar que a inoculação mista, envolvendo (*A. brasilense*) pode aumentar o teor de N da folha, devido a formação de nódulos precoces (CHIBEBA et al., 2015). O fato do tratamento com inoculação de (*A. brasilense*), ter apresentado teor de N semelhante ao co-inoculado, pode ser explicado pela razão desta bactéria ter interagido positivamente com outros microrganismos existentes no solo, ou pelos seus mecanismos diretos de ação como a liberação de hormônios que impulsionam o crescimento vegetal. Embora, tenha apresentado esses resultados, a estirpe BR3267, também se mostrou promissora, uma vez que o acúmulo de N total foi semelhante ao controle adubado. Martins et al., (2003), observou esse mesmo comportamento para produtividade, uma vez que a inoculação com esta estirpe conseguiu atingir níveis produtivos semelhantes aos tratamentos que receberam 50% de N em solos cultivados com Caupí no Semiárido Pernambucano.

A leitura do índice SPAD está relacionada com o estado de nutrição da planta, isso porque a presença de N nas folhas interage positivamente com esta análise (CASTAÑEDA et al., 2018; PINZÓN et al., 2022). Essa afirmação, corrobora

com os nossos resultados obtidos, uma vez que o teor de N da folha e o índice de clorofila foliar se manteve linear e positivo aos 30 DAE, onde as plantas conseguiram apresentar maiores leituras da clorofila para os tratamentos inoculados e co-inoculados com BR3262 e *Azospirillum*.

A clorofila, que contém N em sua composição molecular, exerce maior influência no processo fotossintético à medida que a presença desse elemento químico aumenta. Além disso, Silva et al., (2011), demonstram que um aumento no índice SPAD está diretamente relacionado à intensidade da cor verde das plantas, o que indica uma maior absorção de N. Isso pode resultar em um rendimento potencial na produtividade da lavoura. A estirpe BR3267 manifestou o mesmo comportamento em experimento com condições controladas realizado por Santos et al., (2014), a linhagem promoveu SPAD total semelhante ao controle nitrogenado, corroborando a eficiência da FBN que está bactéria promove ao feijão-caupí.

A atividade enzimática da *Redutase do Nitrato* é indispensável para o funcionamento das plantas, pois é a primeira via de redução do nitrogênio, levando a produção de amônia (NH<sub>3</sub>). Tendo em vista, na fixação de N, o N<sub>2</sub> atmosférico é diretamente reduzido a amônia por meio da nitrogenase bacteriana, fator que questiona o papel da redutase do nitrato na simbiose rizóbio-leguminosa. Todavia, a RN é considerada como a principal fonte sintetizadora de óxido nítrico (NO) em plantas, e sabe-se que o NO é produzido diretamente pela FBN (BERGER et al., 2020).

Elgawad et al., (2020), realizando experimento com inoculação de actinomicetos em diferentes leguminosas como feijão, soja, grão-de-bico, lentilha e ervilha puderam notar que as amostras tratadas com estes microrganismos, puderam aumentar a atividade da enzima RN consideravelmente em brotos e raízes quando comparadas com as testemunhas que não foram inoculadas. Embora em menores quantidades, este grupo de bactérias assim como os rizóbios também possuem capacidade de fixar N atmosférico em leguminosas (BHATTI et al., 2017).

Além disso, estudos trazidos por Martin et al., (2022), apontam que a inoculação com *A. brasilense* em trigo potencializaram a atuação da RN durante o período de florescimento e enchimento de grãos. Outrossim, também foi avaliado em amendoim que a inoculação com *Bradyrhizobium sp.* estimulou semelhança na atuação da enzima quando se comparou aos tratamentos que receberam nitrogênio químico (BELGOFF et al., 2013).

## Conclusões

A co-inoculação pode promover às plantas de Feijão-Caupí melhor crescimento quando comparado aos tratamentos não inoculados.

A combinação entre a estirpe BR3262 e *A. brasilense* se mostrou promissoras para o cultivo dessa cultura no Semiárido Baiano.



## Referências

- ARMENDARIZ, A. L.; TALANO, M. A.; NICOTRA, M. F.; ESCUDERO, L.; BRESER, M. L.; PORPORATTO, C.; AGOSTINI, E. Impacto double inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* E109 and *Azospirillum brasilense* Az39 on soybean plants grown under arsenic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. v.138, n.26, p.35, maio. 2019. DOI: 10.1016/j.plaphy.2019.02.018.
- ARORA, N. K.; VERMA, M.; MISHRA, J. Rhizobial Bioformulations: Past, Present and Future. In: MEHNAZ S. (Ed.). *Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation*. Lucknow, Uttar Pradesh, Índia: PUBLISHING COMPANY: SINGAPURA: SPRINGER 2017, p.69-99.
- BARBOSA, J. Z.; HUNGRIA, M.; SENA, J. V.; POGGERE, G.; REIS, A. R.; CORRÊA, R. S. Meta-analysis reveals benefits of co-inoculation of soybean with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* spp. *Applied Soil Ecology*. v.163, p.193913, jun. 2021. DOI: 10.1016/j.apsoil.2021.103913.
- BARNAWAL, D.; SINGH, R.; SINGH, R. P. Role of plant growth promoting rhizobacteria in drought tolerance: regulating growth hormones and osmolytes. In: AJAY AKS (Ed.). *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture*. Kumar PKS: WOODHEAD PUBLISHING, 2019 p.107-128, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-815879-1.00006-9>.
- BELGOFF, C.; TORDABLÉ, M. D.; CASTRO, S. Influence of nitrate on nodule structure and nitrate reductase activity in a peanut cultivar. In: CARBONE K (Ed.). *Cultivars: Chemical Properties, Antioxidant Activities and Health Benefits*, New York: SCIENCE PUBLISHERS, 2013, p. 33-46.
- BERGER, A.; BOSCARI, A.; HORTA, A. N.; MAUCOURT, M.; HANCHI, M.; BERNILLON, S.; ROLIN, D.; PUPPO, A.; BROUQUISSE, R. Plant nitrate reductases regulate nitric oxide production and nitrogen-fixing metabolism during the *Medicago truncatula*—*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Frontiers in Plant Science*. v.11, p.1313, set. 2020. DOI: 10.3389/fpls.2020.01313.
- BHATTI, A. A.; HAQ, S.; BHAT. R. A. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial Pathogenesis*. 2017 Out v.111, p.458-467, Out. 2017. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.09.036.
- CARVALHO, M.; CASTRO, I.; MOUTINHO-PEREIRA, J.; CORREIA, C; EGEA-CORTINES, M.; MATOS, M.; ROSA, E.; CARNIDE, V.; LINO, NT. Evaluating stress responses in cowpea under drought stress, *Journal of Plant Physiology*. v.241, p.153001, Out. 2019. DOI: 10.1016/j.jplph.2019.153001.
- CASSÁN, F.; CONIGLIO, A.; LÓPEZ, G.; MOLINA, R.; NIEVAS, S.; CARLAN, C. N.; DONADIO, F.; TORRES, D.; ROSAS, S.; PEDROSA, F. O. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. *Biol. Fertil. Soils*, 2020 Mai v.56, p.461-479, Maio. 2020. DOI: 10.1007/s00374-020-01463-y
- CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biology and Biochemistry*. v.103, p.117-130, Dez. 2016. DOI: 10.1016/j.soilbio.2016.08.020.
- CASTAÑEDA, C.; ALMANZA-MERCHÁN, P.; PINZÓN-SANDOVAL, E.; CELY, G.; SERRANO P. Estimación de la concentración de clorofila mediante métodos no destructivos en vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Riesling Becker. *Rev. Colomb. Cienc. Hortícolas*, v.12, n.2, p.329–337, Maio. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2018v12i2.7566>.
- CHIBEBA, A. M.; GUIMARÃES, M. D. F.; BRITO, O. R.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA M. Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. *Am. J. Plant Sci*. v.6, n.10, p. 1641-1649, Jun. 2015. DOI: 10.4236/ajps.2015.610164
- CIAMPITTI, I. A.; SALVAGIOTTI F. New insights into soybean biological nitrogen fixation. *Agronomy Journal*. v.10, n.4, p. 1885-1196, Jul. 2018. DOI:10.2134/agronj2017.06.0348
- CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos Safra 2021/22. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/s/>> Acesso em: 12 abr 2023.
- DÖBEREINER J. Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. *Soil Biology and Biochemistry*. v.29, n.5, p.771-777, Jun. 1997. DOI: 10.1016/S0038-0717(96)00226-X.
- ELGAWAD, H.; ABUELSOUD, W.; MADANY, M. M. Y.; SELIM, S.; ZINTA, G.; MOUSA, A. S. M.; HOZZEIN, W. N. Actinomycetes Enrich Soil Rhizosphere and Improve Seed Quality as well as Productivity of Legumes by Boosting Nitrogen Availability and Metabolism. *Biomolecules*, v.10, n.12, p.1675, Dez. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10121675>.
- FAGOTTI, D. S.; ABRANTES, J. L. F.; CEREZINI, P.; FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; CERRO, P.; FERNÁNDEZ, R. V.; OLLERO, F. J.; MEGIAS, O. M. Quorum sensing communication: *Bradyrhizobium*-*Azospirillum* interaction via N-acyl-homoserine lactones in the promotion of soybean symbiosis. *Journal of Basic Microbiology*, v.59, n.1, p.38-53, Out. 2018. DOI: 10.1002/jobm.201800324.

- GALINDO, F. S.; FILHO, M. C. M. T.; SILVA, E. C.; BUZÉTTI, S.; FERNANDES, G. C.; RODRIGUES, W. Technical and economic viability of cowpea co-inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* spp. and nitrogen doses. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.24, n.5, p.304-311, Mai. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v24n5p304-311>.
- GALINDO, F. S.; PAGLIARI, P. H.; SILVA, E. C.; SILVA, V. M.; FERNANDES, G. C.; RODRIGUES, W. L.; CÉU, E. G. O.; LIMA, B. H.; JALAL, A.; MURAOKA, T.; BUZETTI, S.; LAVRES, J.; TEIXEIRA, M. C. M. Co-inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* sp. Improves Nitrogen Absorption and Yield in Field Grown Cowpeas and Did Not Change N-Fertilizer Recovery. Plants, v.11, n.2, p.1847. Jul. 2022. DOI: [10.3390/plants11141847](https://doi.org/10.3390/plants11141847)
- GOPALAKRISHNAN, S.; SATHYA, A.; VIJAYABHARATHI, R.; VARSHNEY, R. K.; GOWDA, C. L. L.; KRISHNAMURTHY, L. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. Biotech, v.5, p.355-377, Ago 2015. DOI: [10.1007/s13205-014-0241-x](https://doi.org/10.1007/s13205-014-0241-x)
- HUNGRIA M, NOGUEIRA MA. Tecnologias de inoculação da cultura da soja: mitos, verdades e desafios. In: KAPPES C (Ed.). Boletim de Pesquisa 2019/2020. Rondonópolis: FUNDAÇÃO MT, 2019. p. 50-62.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Inoculação do milho com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense*: redução na adubação nitrogenada de cobertura e mitigação na emissão de gases de efeito estufa. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1148186/1/Doc-450-OL.pdf> >.
- JAYATHILAKE, C.; VISVANATHAN, R.; DEEN, A.; BANGAMUWAGE, R.; JAYAWARDANA, B. C.; NAMMI, S.; LIYANAGE, R. J. Cowpea: An overview of its nutritional facts and health benefits. Journal of the Science of Food and Agriculture, v.98, n.13, p. 4793-4806, Abr. 2018. DOI: [10.1002/jsfa.9074](https://doi.org/10.1002/jsfa.9074).
- LEITE, J.; PASSOS, S. R.; SIMÕES, A. J. L.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; ZILLI, J. É. Genomic identification and characterization of the elite strains *Bradyrhizobium yuanmingense* BR 3267 and *Bradyrhizobium pachyrhizi* BR 3262 recommended for cowpea inoculation in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, v.49, n.4, p.1- 11, Dez 2018. DOI: [10.1616/j.bjm.2017.01.007](https://doi.org/10.1616/j.bjm.2017.01.007).
- LIN, S. Y.; HAMEED, A.; LIU, Y. C.; HSU, Y. H.; LAI, W. A.; SHEN, F. T.; YOUNG, C. C. *Azospirillum soli* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from agricultural soil. Int. J. Syst Evol. Microbiol. v.65, n.12, p. 4601-4607, Dez 2015. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000618>.
- LOPES, A. L. O.; SETUBAL, I. S.; COSTA, N. V. P.; ZILLI, J. E.; RODRIGUES, A. C.; BONIFÁCIO, A. Synergism of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum baldaniorum* improves growth and symbiotic performance in lima bean under salinity by positive modulations in leaf nitrogen compounds. Applied Soil Ecology, v.180, p.104603, Dez. 2022. DOI: [10.1016/j.apsoil.2022.104603](https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104603).
- MARCOLINI, B. P.; SANTOS, W. F.; DIAS, V. C.; AFFÉRI, F. S.; SOUZA, C. M.; PELÚZIO, J. M. Efeito do nitrogênio e *Azospirillum brasilense* em teores de proteína do milho na entressafra. Rev em Agronegócio e Meio Ambiente, v.15, n.2, p.88-92, Mar 2022. DOI: [10.17765/2176-9168.2022v15n2e8892](https://doi.org/10.17765/2176-9168.2022v15n2e8892).
- MARTIN, T. N.; BISON, P. M.; TABALDI, L. A.; LEIVAS, S. J. D.; DEAK, E.; MOTA, M. M.; GRUN, E.; VALDOVINO, V. Soil Acidity Conditioning the Productivity and Physiology of Wheat Inoculated with *Azospirillum brasilense*. Communications in Soil Science and Plant Analysis, v.53, p. 2082-2093, Abr 2022. DOI: [10.1080/00103624.2022.2070196](https://doi.org/10.1080/00103624.2022.2070196).
- MARTINS L. M.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. Biology and Fertility of Soils, v.38, p.333-339, Ago 2003. DOI: [10.1007/s00374-003-0668-4](https://doi.org/10.1007/s00374-003-0668-4).
- MORETTI, L. G.; LAZARINI, E.; BOSSOLANI, J. W.; PARENTE, T. L.; CAIONI, S.; ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. Can Additional Inoculations Increase Soybean Nodulation and Grain Yield? Soil Fertility and Crop Nutrition, 2018 Mar 110(2):715-721, doi: [10.2134/agronj2017.09.0540](https://doi.org/10.2134/agronj2017.09.0540).
- NORRIS, D. O.; E T'MANNETJE L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. in relation to their taxonomy and their agronomic use. East African Agricultural and Forestry Journal, v.29, n.3, p.214-35, Dez 1964. DOI: [10.1080/00128325.1964.11661928](https://doi.org/10.1080/00128325.1964.11661928).
- PÉREZ, J. J.; FRANCOIS, N. J.; MARONICHE, G. A.; BORRAJO, M. P.; PEREYRA, M. A.; CREUS, C. M. A novel green and low-cost chitosan starch hydrogel as a potential delivery system for plant growth-promoting bacteria. Carbohydrate Polymers, v.202, p.409-417, Dez 2018. DOI: [10.1016/j.carbpol.2018.07.084](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.084).
- PINZÓN, S. H. E.; ALMANZA, P. J.; CELY, R. G. E.; SERRANO, C. P. A.; AYALA, M. G. A. Correlation between SPAD and chlorophylls a, b and total in leaves from *Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi, Legacy and Victoria in the high tropics. Rev.

Colomb. Cienc. Hortícolas, v.16, n.2, p.14693, Mai 2022. DOI: 10.17584/rcch.2022v16i2.14693.

PRANDO, A. M.; OLIVEIRA, A. N.; LIMA, D. E.; POSSAMAI, E. J.; REIS, E. A.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M.; HARGER, N. CONTE, O. Coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na safra de 2018/2019 no Paraná. Circular técnica - Embrapa Soja, v.156, p.1-20, Nov 2019.

RAMAKRISHNA, W.; YADAV, R.; LI, K. Plant growth promoting bacteria in agriculture: two sides of a coin. Applied Soil Ecology, v.138, p.10-18, jun 2019. DOI: 10.1016/j.apsoil.2019.02.019.

SANTOS, R. S.; FERREIRA, J. S.; SCORRIZA, R. N. Isolamento e caracterização de estirpes de rizóbio na espécie *Pterogyne nitens* Tull. Revista de Ciências Ambientais, v.8, n.1, p. 71-76, Ago 2014.

SENA, P. T. S.; NASCIMENTO, T. R.; LINO, J. O. S.; OLIVEIRA, G. S.; FERREIRA, N.; ALVES, R.; FREITAS, A. D. S.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; MARTINS, L. M. V. Molecular, Physiological, and Symbiotic Characterization of Cowpea Rhizobia from Soils Under Different Agricultural Systems in the Semiarid Region of Brazil. Journal Of Soil Science and Plant Nutrition, v.1, p.1-10, Mar 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00203-3>

SIEBRECHT, N. Sustainable Agriculture and Its Implementation Gap—Overcoming Obstacles to Implementation. Sustainability, v.12, n.9, p.3853, Mai 2020. DOI: 10.3390/su12093853

SILVA, A. F.; CARVALHO, M. A. C.; SCHONINGER, E. L.; MONTEIRO, S.; CAIONE, G.; SANTOS, P. A. Doses de inoculante e nitrogênio na semeadura da soja em área de primeiro cultivo. Bioscience Journal, v.27, n.3, p.404-412, jul 2011.

ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; FREIRE, F. F. R.; NEVES, M. C. P. N. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. Pesquisa agropecuária Brasileira, v.41, n.5, p.811-818, Maio 2006. DOI: 10.1590/S0100-204X2006000500013