



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

DANIEL FARIAS DE OLIVEIRA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE PLANTAS DE DOIS
CULTIVARES DE FEIJÃO DE CORDA INOCULADOS COM *BRADYRHIZOBIUM*
SP. SOB ESTRESSE SALINO**

FORTALEZA

2013

DANIEL FARIAS DE OLIVEIRA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE PLANTAS DE DOIS
CULTIVARES DE FEIJÃO DE CORDA INOCULADOS COM *BRADYRHIZOBIUM*
SP. SOB ESTRESSE SALINO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- O46a Oliveira, Daniel Farias de.
Aspectos fisiológicos e bioquímicos de plantas de dois cultivares de feijão de corda inoculados com *Bradyrhizobium* sp. sob estresse salino / Daniel Farias de Oliveira. – 2013.
90 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2013.
- Orientação: Prof. Dr. Eneas Gomes Filho.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
1. Estresse salino. 2. *Vigna unguiculata*. 3. Estresse oxidativo. 4. Bioquímica vegetal. I. Título.

DANIEL FARIAS DE OLIVEIRA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE PLANTAS DE DOIS
CULTIVARES DE FEIJÃO DE CORDA INOCULADOS COM *BRADYRHIZOBIUM*
SP. SOB ESTRESSE SALINO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

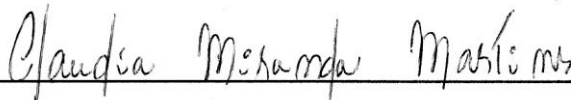
Aprovada em: 30 / 08 / 2013.

BANCA EXAMINADORA



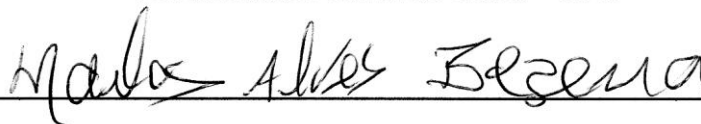
Prof. Dr. Enéas Gomes Filho (Orientador)

Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof.ª Dr.ª Claudia Miranda Martins

Universidade Federal do Ceará – UFC



Dr. Marlos Alves Bezerra

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA

FORTALEZA

2013

A Deus.

Aos meus pais, Francisco e Natércia.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Eneas Gomes, pela orientação durante os percalços dos experimentos, paciência nos momentos de aflição e confiança nas minhas ideias de projeto de dissertação;

Aos integrantes da banca examinadora, Prof^a. Dr^a Claudia Miranda Martins e Dr. Marlos Alves Bezerra pelas contribuições dadas para o melhoramento desta dissertação;

Aos amigos de laboratório, Michelle Andrade, Paulo André Freitas, Alexcyane Feijão, Elton Mrques, Valdineia Soares, Stelamaris Oliveira, Rafael Miranda, Nara Alencar, Thalita Montoril, Carlos Eduardo, Luckas Huriel, Tiago Augusto, Ian Valença, Viviane Rupenthal, Elaine Angelim, Lineker Lopes, Gyedre Araújo e Cibelle Gadelha pelas valorosas contribuições a este trabalho e pelos bons momentos que pude compartilhar junto a vocês em meio às agitações da vida acadêmica;

A todos os meus familiares que foram o meu apoio nos momentos mais difíceis, pois sem esse apoio, certamente não teria alcançado esta conquista;

O meu sincero muito obrigado a todos.

RESUMO

O uso de inoculantes, contendo bactérias fixadoras de nitrogênio, aumenta anualmente na cultura do feijão de corda nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos da simbiose com *Bradyrhizobium* sp. na fisiologia das plantas sob condições de estresse salino. Para isso, conduziu-se um experimento em condições de casa de vegetação, com os cultivares Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu 2331 (sensível à salinidade) inoculados com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium*. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com o seguinte arranjo fatorial: 2 (cultivares) x 2 (plantas inoculadas e não inoculadas) x 2 (níveis de estresse – 0 e 75 mM de NaCl). Para o tratamento com o rizóbio, as sementes foram semeadas em presença de 1 mL do caldo de cultura contendo o inóculo, sendo as plântulas mantidas por 12 dias nessa situação. Em seguida, as plantas inoculadas e não inoculadas foram submetidas ao tratamento salino, durante 15 dias. Os resultados mostraram que a estirpe em estudo apresentou eficiência reduzida na fixação biológica do nitrogênio do feijão de corda quando submetido ao tratamento salino em relação ao tratamento respectivo controle. O crescimento das plantas do feijão de corda foi inibido pelo estresse salino e a inoculação com o rizóbio não foi capaz de minimizar os efeitos deletérios da salinidade, principalmente no cultivar TVu, que teve sua biomassa mais afetada por esse estresse. Os teores de íons tóxicos (Na^+ e Cl^-) nas plantas inoculadas em relação às não inoculadas não apresentaram diferenças significativas, mas os teores de potássio, nitrogênio e fósforo tiveram incrementos nas plantas inoculadas submetidas à salinidade. Em relação aos níveis de solutos orgânicos nas plantas do grupo salino, pode-se destacar que: a inoculação com a bactéria aumentou os níveis de carboidratos somente na parte aérea de Pitiúba e nas raízes de TVu; a inoculação aumentou os teores de N-aminossolúveis em todas as partes de ambos os cultivares, exceto nas raízes de Pitiúba; os teores de prolina aumentaram na planta inteira, exceto nas raízes de TVu; o conteúdo de proteínas aumentou invariavelmente em todas as partes das plantas. A fotossíntese líquida, no Pitiúba, não foi alterada em nenhum dos tratamentos, mas no TVu os tratamentos inoculados provocaram aumentos nesse parâmetro em relação aos seus respectivos controles. O excesso de sal inibiu a condutância estomática em ambos os cultivares, porém o rendimento quântico máximo do PSII não sofreu alteração nos tratamentos salinos, comprovando que o aparato fotossintético do feijão de corda é tolerante à salinidade. Os teores de clorofila total aumentaram em resposta à salinidade, tanto nas plantas inoculadas como nas plantas não inoculadas. O estresse oxidativo induzido pela salinidade levou a um aumento na atividade

das enzimas peroxidase do ascorbato e peroxidase do guaiacol, nas folhas e raízes de ambos os cultivares das plantas noduladas. Por outro lado, a salinidade aumentou a atividade da enzima dismutase do superóxido nas raízes, apesar da inoculação ter elevado mais a atividade enzimática nas raízes de Pitiúba. O aumento das atividades dessas enzimas em condições salinas pode estar relacionado com a inoculação, visto que houve redução na peroxidação lipídica nas plantas dos dois cultivares inoculados e estressados. A salinidade afetou negativamente a produção de biomassa do feijão de corda devido aos efeitos causados pelo acúmulo de íons tóxicos. Embora a nodulação tenha elevado os níveis de osmoprotetores, aumentado a atividade das enzimas antioxidativas nas raízes e diminuído os danos oxidativos, não foi observado melhora significativa no crescimento das plantas dos dois cultivares estudados quando submetidos à salinidade.

Palavras-chave: estresse salino; *Vigna unguiculata*; *Bradyrhizobium*; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Physiological and biochemical aspects of two cowpea cultivars inoculated with *Bradyrhizobium* sp. under salt stress

The use of inoculants containing nitrogen-fixing bacteria, increases annually in cowpea crop in North, Northeast and Midwest regions of Brazil. This work was carried out to evaluate the effects of symbiosis with *Bradyrhizobium* sp. in plant physiology under salt stress conditions. For this purpose, an experiment was conducted in greenhouse, with two cultivars: Pitiúba (tolerant to salinity) and TVu 2331 (sensitive to salinity), both inoculated with the strain of *Bradyrhizobium* SEMIA 6461. The experimental design was completely randomized with the following factorial arrangement: 2 (cultivars) x 2 (inoculated and non-inoculated plants) x 2 (stress levels – 0 and 75 mM NaCl). For treatment with rhizobium, seeds were sown in the presence of 1 mL of the culture broth containing the inoculum, the seedlings being maintained for 12 days in this situation. After, inoculated and non-inoculated plants were subjected to salt treatment for 15 days. The results revealed that the bacteria strain reduced the efficiency in nitrogen fixation in cowpea subjected to salt treatment when compared to control treatment. The growth of c plants cowpea was inhibited by salt stress and inoculation with rhizobium was not able to minimize the deleterious effects of salinity, especially in cultivating TVu, which had its biomass most affected by this stress. The levels of toxic ions (Na^+ and Cl^-) in plants inoculated in relation to non-inoculated showed no significant differences, but the levels of potassium, nitrogen and phosphorus had increases in inoculated plants subjected to salinity. Regarding the levels of organic solutes in saline group plants, we can highlight that: inoculation with bacteria increased carbohydrate levels only in shoots of Pitiúba and roots of TVu; inoculation increased N-amino levels in all parts of both cultivars, except for the roots of Pitiúba; proline levels have increased in the whole plant, except the roots of TVu; protein content invariably increased in all parts of the plants. The net photosynthesis of Pitiúba were not altered in any treatment, but TVu inoculated treatments caused increases in this parameter compared to their respective controls. Excess salt inhibited stomatal conductance in both cultivars, but the maximum quantum yield of PSII did not change in saline treatments, proving that the photosynthetic apparatus of cowpea is tolerant to salinity. Total chlorophyll contents increased in response to salinity, both in inoculated plants as in non-inoculated plants. Oxidative stress induced by salinity led to an increase in the activity of peroxidase and ascorbate peroxidase guaiacol in leaves and roots of both cultivars of nodulated plants.

Furthermore, salinity increased activity of the enzyme superoxide dismutase in the roots, despite inoculation have higher enzyme activity in roots of Pitiúba. The increased activity of these enzymes in saline conditions may be related to the inoculation, whereas there was a reduction in lipid peroxidation in plants of both cultivars inoculated and stressed. The salinity negatively affected biomass production of cowpea due to effects caused by the accumulation of toxic ions. Although the nodulation has raised osmoprotectors levels, increased activity of antioxidant enzymes in roots and reduced oxidative damage, there was no significant improvement in growth of the plants of both cultivars studied when subjected to salinity.

Keywords: salt stress; *Vigna unguiculata*; *Bradyrhizobium*; oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Padrões de crescimento da estirpe SEMIA 6461 exposta a diferentes concentrações de NaCl em meio extrato de levedura-manitol. 26
- Figura 2** – Matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca das raízes (MSR) e relação MSPA/MSR de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium*, crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM. 28
- Figura 3** – Área foliar de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium*, crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM. 30
- Figura 4** – Fotossíntese, transpiração, condutância estomática e relação entre as concentrações internas e externas de CO₂ de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium*, crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM. 31
- Figura 5** – Relação entre a fluorescência variável e máxima, fluorescência inicial e fluorescência máxima de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium*, crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM. 33
- Figura 6** – Teor relativo de água de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium*, crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM. 35
- Figura 7** – Teor relativo de clorofila de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium*, crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM. 36
- Figura 8** – Teores de Na⁺ na parte aérea e nas raízes de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* (+R), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM. 37
- Figura 9** – Teores de Cl⁻ na parte aérea e nas raízes de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e 39

inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium*, crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM.

Figura 10 – Teores de K⁺ na parte aérea e nas raízes de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium*, crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM. 40

Figura 11 – Teores de N-total na parte aérea e nas raízes de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium*, crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM. 42

Figura 12 – Teores de fósforo na parte aérea e nas raízes de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium*, crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM. 43

Figura 13 – Teores de carboidratos na parte aérea e nas raízes de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium*, crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM. 45

Figura 14 – Teores de N-aminossolúveis na parte aérea e nas raízes de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium*, crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM. 46

Figura 15 – Teores de prolina na parte aérea e nas raízes de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium*, crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM. 47

Figura 16 – Teores de proteínas solúveis na parte aérea e nas raízes de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium*, crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM. 49

Figura 17 – Teores de malondialdeído na parte aérea e nas raízes de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas e 50

inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium*, crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM.

Figura 18 – Atividade da catalase na parte aérea e nas raízes de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium*, crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM. 52

Figura 19 – Atividade da dismutase do superóxido na parte aérea e nas raízes de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium*, crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM. 53

Figura 20 – Atividade da peroxidase do ascorbato na parte aérea e nas raízes de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium*, crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM. 54

Figura 21 – Atividade da peroxidase do guaiacol na parte aérea e nas raízes de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium*, crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM. 55

Figura 22 – Teores de leghemoglobina nos nódulos de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVU (sensível à salinidade), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM. 56

Figura 23 – Atividade da sintetase da glutamina (GS) nos nódulos de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 e 75 mM. 58

Figura 24 – Fotomicrografias de secções de nódulos radiculares de plantas de Pitiúba. 59

Figura 25 – Fotomicrografias de secções de nódulos das raízes de plantas de TVu. 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise da concentração do complexo de troca catiônica, da matéria orgânica e de C, N e P do solo utilizado no estudo. 14

Tabela 2 – Concentração em mM dos macronutrientes nas soluções nutritivas para os tratamentos com fonte de N ou sem fonte de N. 15

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Justificativa	1
1.2. Objetivos	2
1.2.1. Objetivo geral	2
1.2.2. Objetivos específicos	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. O problema da salinização dos solos	3
2.2. Efeito da salinidade sobre as plantas	4
2.3. Estresse oxidativo.....	6
2.4. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas	8
2.5. Rizóbios, fixação biológica do nitrogênio e a formação dos nódulos	8
2.6. O feijão-de-corda e sua simbiose com <i>Bradyrhizobium</i>	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Tolerância de <i>Bradyrhizobium</i> sp. a salinidade <i>in vitro</i>	13
3.2. Condições de cultivo e tratamentos	13
3.3. Coleta e análise do crescimento	15
3.4. Teor relativo de água	15
3.5. Teor relativo de clorofila	16
3.6. Parâmetros fotossintéticos e fluorescência da clorofila <i>a</i>	16
3.7. Determinação dos elementos inorgânicos	16
3.7.1. Determinação de Na ⁺ , K ⁺ e Cl ⁻ ..	16
3.7.2. Determinação de fósforo	17
3.7.3. Determinação de nitrogênio total	17
3.8. Solutos orgânicos	18
3.8.1. Carboidratos solúveis	18
3.8.2. N-aminossolúveis	19

3.8.3. Prolina	19
3.9. Atividade das enzimas antioxidativas e proteínas solúveis	20
3.9.1. Preparo dos extratos	20
3.9.2. Dismutase do superóxido (SOD)	20
3.9.3. Catalase (CAT)	20
3.9.4. Peroxidase do ascorbato (APX)	21
3.9.5. Peroxidase do guaiacol (GPX)	21
3.9.6. Proteínas solúveis	21
3.10. Determinação da peroxidação de lipídios	22
3.11. Determinação de leghemoglobina nos nódulos	22
3.12. Sintetase da glutamina (GS) nos nódulos	23
3.13. Análise histológica dos nódulos	24
3.14. Delineamento experimental e análise estatística	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1. Tolerância de <i>Bradyrhizobium</i> sp. à salinidade	25
4.2. Crescimento vegetativo	27
4.3. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i>	29
4.4. Teor relativo de água	34
4.5. Teor relativo de clorofila	34
4.6. Teores de sódio, cloreto e potássio	34
4.7. Teores de nitrogênio total e de fósforo	41
4.8. Solutos orgânicos	44
4.9. Teores de proteínas solúveis	48
4.10. Peroxidação de lipídios	48
4.11. Enzimas do sistema antioxidativo	51
4.12. Metabolismo do nitrogênio nos nódulos	51
4.13. Histologia dos nódulos	57
5. CONCLUSÕES	61

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
--	-----------

1. INTRODUÇÃO

1.1. Justificativa

Em condições naturais as plantas estão sujeitas a estresses ambientais que afetam o seu desenvolvimento. O semiárido do Nordeste é caracterizado por pouca precipitação pluviométrica e alta evapotranspiração. Além disso, o uso de água de baixa qualidade para irrigação e o uso excessivo de fertilizantes têm aumentado a salinidade dos solos (DIAS; BLANCO, 2010). Nessa região, algumas espécies de plantas produzem rendimentos aceitáveis em condições salinas devido ao ajustamento osmótico, o que permite maior capacidade de absorção de água, mesmo em potenciais osmóticos muito baixos (FLOWERS, 2004).

O feijão de corda é cultivado em todo o Brasil, sendo intensivamente cultivado no semiárido nordestino, constituindo-se em um dos principais alimentos da sua população. A cultura do feijão de corda pode ser moderadamente tolerante ao estresse salino (AYERS; WESTCOT, 1999). Entretanto, pesquisas têm mostrado que a tolerância do feijão de corda ao estresse salino varia entre os genótipos (DANTAS *et al.*, 2002).

No Brasil, a produtividade média do feijão de corda é baixa (300 kg ha^{-1}), devido às tecnologias de cultivos adotadas (LEITE *et al.*, 2009). No entanto, a produtividade dessa cultura pode ser superior a 1.000 kg ha^{-1} . Atualmente a região Nordeste possui a maior área cultivada de feijão de corda em todo o país e é a região com menor produtividade. O avanço da cultura na região Nordeste pode contribuir para o aumento da produtividade média brasileira, fazendo-se uso de tecnologias adequadas. A produtividade desta cultura pode ser aumentada pelo uso de inoculantes de rizóbios eficientes, que podem suprir as necessidades de nitrogênio da planta (ZILLI, 2001), inclusive sob condições de salinidade encontradas no semiárido nordestino.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da salinidade em plantas de feijão de corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6461), visando determinar os efeitos dessa simbiose na fisiologia das plantas.

1.2.2. Objetivos específicos

1. Analisar o efeito da salinidade no crescimento e na fotossíntese de plantas de feijão de corda inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6461);
2. Investigar o efeito do estresse salino e da inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6461) no acúmulo e na distribuição de íons (Na^+ , Cl^- , K^+), de nitrogênio total e de fósforo na parte aérea e raízes de plantas de feijão de corda;
3. Estudar o efeito do NaCl e da inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6461) no acúmulo de solutos orgânicos (carboidratos solúveis, N-aminossolúveis e prolina) e proteínas solúveis na parte aérea e nas raízes das plantas de feijão de corda;
4. Avaliar a peroxidação de lipídios na parte aérea e nas raízes das plantas de feijão de corda inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6461);
5. Analisar a atividade das enzimas do sistema antioxidativo na parte aérea e nas raízes das plantas de feijão de corda inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6461);
6. Estudar o efeito da salinidade no metabolismo do nitrogênio dos nódulos das plantas de feijão de corda;
7. Avaliar os efeitos da salinidade na histologia dos nódulos das plantas de feijão de corda.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O problema da salinização dos solos

A salinização é a acumulação de sais solúveis no solo que causam impactos sobre o meio ambiente, a produção agrícola e a economia. Os sais ocorrem em todos os solos e em todas as condições climáticas. No entanto, a sua distribuição é mais extensa nas regiões áridas e semi-áridas em comparação com as regiões úmidas (ABROL; YADAV; MASSOUD, 1988).

A salinização é um processo complexo que envolve o movimento de sais e água no solo durante os ciclos sazonais e interações com as águas subterrâneas (RIBEIRO, 2010), além da contribuição dos sais dissolvidos na água de irrigação. A natureza e as propriedades destes solos são diversas, requerendo abordagens específicas para a sua recuperação e para manter o seu uso a longo prazo, sem perdas na produtividade agrícola. Existem diversas técnicas empregadas na recuperação de solos salinos, sendo as principais a lavagem do solo e o melhoramento químico (CAVALCANTE, 2010). Enquanto as chuvas, o intemperismo e os sais armazenados no solo são as fontes de sais, as águas superficiais e subterrâneas também podem fornecer fontes adicionais. Os sais de sódio predominam em muitos solos salinos do mundo, enquanto os sais de outros cátions, tais como os de cálcio, magnésio e ferro são encontrados apenas em locais específicos (BOLT; BRUGGENWERT, 1976).

Um solo é considerado salino quando a condutividade elétrica do seu extrato de saturação (EC_e) é igual ou maior que 4 dS m^{-1} (US Salinity Laboratory Staff, 1954). No entanto, o valor limiar acima do qual ocorrem efeitos deletérios pode variar dependendo de vários fatores, incluindo a espécie vegetal, as condições climáticas e o regime pluviométrico (MAAS, 1985).

A salinidade em terras cultiváveis é um problema crescente e limita o bom desenvolvimento das plantas, culminando em perda de produtividade. Com base nos dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) sobre os solos mundiais, a área total de solos salinos é de 397 milhões hectares, o que corresponde a 3,1% da área terrestre (FAO, 2005). Além disso, as projeções futuras das mudanças climáticas e o aumento da população humana sugerem que a extensão de solos salinos vai aumentar (RENGASAMY, 2008).

O aumento da salinidade do solo pode induzir vários efeitos de estresse salino primários e secundários em plantas cultivadas. O estresse salino é a causa da redução na

produção de alimentos, mas também pode resultar em danos ecológicos. De modo similar ao que acontece com as plantas, a salinidade também afeta os micro-organismos, reduzindo a atividade metabólica e alterando a composição da comunidade microbiana (ONDRASEK; RENGEL; VERES, 2011; CHOWDHURY; MARSCHNER; BURNS, 2011). Essas mudanças têm implicações para a decomposição da matéria orgânica do solo e nas interações ecológicas que acontecem entre as raízes das plantas e a sua microbiota associada.

2.2. Efeito da salinidade sobre as plantas

Os efeitos do sal sobre o desenvolvimento das plantas pode ocasionar um estresse, que, do ponto de vista fisiológico, é uma alteração das condições de equilíbrio. As características genéticas da planta, órgão ou tecido e estágio de desenvolvimento são fatores que têm influência na resposta ao estresse (GASPAR *et al.*, 2002).

O efeito da salinidade sobre as plantas é consequência de dois componentes do estresse salino: o componente osmótico e o componente iônico (MUNNS; TESTER, 2008). O componente osmótico procede da alta concentração de solutos na solução do solo, provocando um déficit hídrico pela redução do potencial osmótico. O componente iônico, por sua vez, decorre dos elevados teores de Na^+ e Cl^- e dos efeitos causados pela alteração da relação K^+/Na^+ .

Os efeitos osmóticos causados pela salinidade acarretam em diminuição da disponibilidade de água e nutrientes para as plantas e o fechamento dos estômatos, o que causa diminuição na fotossíntese líquida (GREENWAY; MUNNS, 1980; SHANNON; GRIEVE, 1999). Como a absorção de água pelas plantas é dificultada, a pressão de turgescência nas células fica comprometida, ocasionando impedimento da expansão celular, que é imprescindível ao crescimento, além de inibir a divisão celular (ZHU, 2002). A célula vegetal, diante do estresse hídrico, reage sintetizando solutos compatíveis também chamados de osmólitos como, por exemplo, açúcares (glicose, frutose, sacarose), poliálcoois (manitol, sorbitol, inositol), compostos derivados de aminoácidos (prolina, glicina-betaína, prolina-betaína), aminas terciárias (ectoína) que têm a função de protegê-la dos efeitos osmóticos negativos, diminuindo o seu potencial osmótico e aumentando a absorção de água (FLOWERS; COLMER, 2008). Além de colaborar no ajustamento osmótico, esses solutos desempenham o papel de estabilizar proteínas e outras estruturas celulares por remover os radicais livres formados pela indução do estresse oxidativo (YANCEY *et al.*, 1982; BOHNERT; NELSON; JENSEN, 1995).

Assim como o crescimento celular, a fotossíntese é um dos primeiros processos fisiológicos da planta a ser afetado pela salinidade (MUNNS; JAMES; LÄUCHLI, 2006). Os efeitos podem ser causados por: 1. fechamento dos estômatos, diminuindo a concentração interna de CO₂ nas células do mesofilo, levando a alterações no metabolismo da fotossíntese, principalmente na assimilação do carbono e no uso da energia (FLEXAS *et al.*, 2008; LAWLOR; CORNIC, 2002); 2. mudanças na ultraestrutura das organelas; e 3. redução dos pigmentos fotossintéticos (ASHRAF; HARRIS, 2013).

O cloreto de sódio (NaCl) é o sal predominante nos solos salinos, causando um desequilíbrio nutricional relacionado à absorção radicular deficiente de K⁺ e Ca²⁺ (NIU *et al.*, 1995; YOSHIDA, 2002; ZHU, 2001). Os teores de Na⁺ e Cl⁻ contribuem com as principais características ligadas a toxicidade do componente iônico do estresse e atuam à medida que os íons se acumulam no citosol das células vegetais, causando mudanças anatômicas e bioquímicas, como ocorre nas células do mesofilo, onde há mudanças no comprimento e diâmetro celular, além dos níveis de clorofila e carotenoides diminuírem (PARIDA; DAS, 2005). Os efeitos do NaCl se refletem nas relações Na⁺/K⁺, Na⁺/Ca²⁺, Na⁺/Mg²⁺, Cl⁻/N, Cl⁻/P e Cl⁻/S nos órgãos vegetais, alterando tais relações e ocasionando um desbalanço nutricional (GRATTAN; GRIEVE, 1999).

A capacidade de tolerância das plantas à salinidade é controlada pela absorção, transporte e exclusão dos íons Na⁺ e Cl⁻. As plantas tolerantes absorvem esses íons e os distribuem nas diferentes partes da planta, principalmente em compartimentos com menor metabolismo (GREENWAY; MUNNS, 1980). Entretanto, mesmo as espécies tolerantes apresentam diferenças nas respostas ao estresse salino.

As halófitas são plantas altamente evoluídas e com características morfológicas, anatômicas e fisiológicas adaptadas a completar o seu ciclo de vida num substrato rico em sais (LOKHANDE; SUPRASANNA, 2012). Existem diferentes mecanismos de tolerância ao estresse salino nas halófitas, que incluem a compartimentalização de íons, ajuste osmótico através da acumulação de osmólitos, succulência, transporte seletivo de íons, respostas antioxidante enzimática e não enzimática, manutenção do estado redox e enérgico e excreção de sal (FLOWERS; COLMER, 2008).

Por sua vez, as glicófitas não são capazes de se desenvolver plenamente em ambientes com elevadas concentrações de sais. Entretanto, as glicófitas podem apresentar certa tolerância ao estresse salino, possuindo estratégias similares às existentes nas halófitas (BOTELLA *et al.*, 2005).

Portanto, a sobrevivência das plantas a ambientes salinos depende da regulação da concentração iônica intracelular, de modo a manter o equilíbrio entre os processos fisiológicos que controlam o crescimento e o desenvolvimento vegetal. Consequentemente, os papéis metabólicos da compartimentalização dos íons no vacúolo e o controle do seu transporte para os tecidos de modo uniforme podem conferir tolerância aos sais (ASHRAF, 1994).

2.3. Estresse oxidativo

O estresse salino leva as plantas à superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em estresse oxidativo. As ROS compreendem tanto radicais livres (radical superóxido $\cdot\text{O}_2^-$; radical hidroxil $\cdot\text{OH}$; radicais hidróperóxido $\text{HO}\cdot$; e radicais alcóxi $\text{RO}\cdot$) quanto formas moleculares (peróxido de hidrogênio, H_2O_2 ; e oxigênio singlete, $^1\text{O}_2$) (GILL; TUTEJA, 2010). As ROS são produtos do metabolismo de células saudáveis, mas seus níveis podem aumentar temporária ou permanentemente nas células em condições de estresse.

Os principais sítios de produção das ROS em plantas submetidas ao estresse são os cloroplastos, os peroxissomos e as mitocôndrias. O O_2 produzido na fotossíntese pode captar os elétrons que são carreados na cadeia transportadora de elétrons (CTE) do cloroplasto, formando o $\cdot\text{O}_2^-$, o qual é rapidamente convertido a H_2O_2 (outra ROS) pela dismutase do superóxido (SOD) (GECHEV *et al.*, 2006).

Provavelmente, os peroxissomos são os principais sítios de formação de H_2O_2 . Existem pelo menos dois sítios de produção de H_2O_2 nos peroxissomos vegetais: 1. na matriz da organela pela oxidase da xantina (XOD), que catalisa a conversão da xantina ou hipoxantina em ácido úrico e $\cdot\text{O}_2^-$; e 2. na membrana do peroxissomo que apresenta uma pequena CTE composta por uma flavoproteína NADH e Cyt *b* (DEL RÍO *et al.*, 2002).

Assim como nos peroxissomos, as mitocôndrias também são grandes produtoras de H_2O_2 através da respiração (NOCTOR; DE PAEPE; FOYER, 2007). A CTE mitocondrial é a principal fonte de geração de ROS nessa organela e abriga elétrons com energia livre suficiente para reduzir diretamente o O_2 . Os complexos I e III da CTE mitocondrial são os locais de produção de $\cdot\text{O}_2^-$, o qual é reduzido a H_2O_2 pela SOD (RHOADS *et al.*, 2006). Pela reação de Fenton, esse H_2O_2 pode reagir na presença de Fe^{2+} ou Cu^{2+} , originando $\cdot\text{OH}$ que reage com os ácidos nucleicos e proteínas, tornando estas mais suscetíveis à proteólise, gerando danos às membranas celulares (GRENE, 2002; SHARMA *et al.*, 2012).

As ROS são altamente tóxicas e podem causar danos a todos os tipos de macromoléculas biológicas. Para se proteger dos efeitos tóxicos das ROS, as células e suas

organelas empregam uma defesa antioxidativa composta pelo sistema antioxidativo enzimático e o sistema oxidativo não-enzimático. O sistema enzimático é constituído pelas isoenzimas da SOD, catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase do guaiacol (GPX). A SOD consiste na primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos das ROS e é encontrada em todas as partes da célula propensas ao estresse oxidativo (RAYCHAUDHURI; DENG, 2000). É uma metaloenzima que é classificada de acordo com o cofator que usa: 1. o ferro (Fe-SOD), encontrada nos cloroplastos; 2. manganês (Mn-SOD), presente nos peroxissomos e mitocôndrias; e 3. o cobre ou o zinco (Cu/Zn-SOD), encontrada nos cloroplastos e no citosol (GILL; TUTEJA, 2010).

A CAT, que também possui isoenzimas, é formada por uma estrutura tetramérica capaz de converter diretamente o H_2O_2 em H_2O e O_2 . É indispensável na remoção de H_2O_2 produzido nos peroxissomos durante a β -oxidação dos ácidos graxos e também durante condições de estresse (RIZHSKY *et al.*, 2002).

A APX catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O , usando o ascorbato como doador de elétron. O ascorbato é recuperado no ciclo ascorbato-glutationa e a redutase do monodesidroascorbato (MDAR) está envolvida na sua redução, usando NAD(P)H como doador de elétron (NOCTOR; FOYER, 1998). A MDAR localiza-se em vários compartimentos celulares, tais como citosol, cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e glioxissomos (MITTOVA *et al.*, 2003; BOWDITCH; DONALDSON, 1990). A APX consiste em pelo menos cinco isoformas diferentes, incluindo a da mitocôndria (mtAPX), a encontrada no tilacoide (tAPX), a presente na membrana dos glioxissomos (gmAPX), a encontrada no estroma do cloroplasto (sAPX) e a isoforma citosólica (cAPX) (SHIGEOKA, 2002). Um outro tipo de peroxidase, a GPX, oxida um grande número de substâncias como os fenóis, entre eles o guaiacol, para reduzir o H_2O_2 a H_2O (SAKIHAMA *et al.*, 2002). A GPX é encontrada no citosol, vacúolos e apoplasto (YAMASAKI; SAKIHAMA; IKEHARA, 1997).

O sistema antioxidante não-enzimático inclui substâncias antioxidantes, como o ácido ascórbico, a glutatona (GSH), o α -tocoferol, os carotenoides e os flavonoides, que ocorrem em todas as células vegetais (GILL; TUTEJA, 2010). Os antioxidantes acumulam-se nas plantas submetidas ao estresse oxidativo, minimizando a formação das ROS ou dissipando o excesso de energia das clorofilas excitadas (ABOGADALLAH, 2010).

2.4. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas

Existe um grupo de bactérias benéficas para as plantas que habitam a rizosfera e que são chamadas de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP). Essas bactérias são potencialmente úteis para estimular o crescimento vegetal e a produtividade das culturas. Um número crescente de RPCP tem sido identificado nos últimos anos, como espécies dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Streptomyces* entre outras (KLOEPPER; LIFSHITZ; ZABLOTOWICZ, 1989; GLICK, 2012) e o uso desses micro-organismos como inoculantes para culturas de importância agrônômica também vem aumentando. Essas bactérias agem por pelo menos um dos seguintes mecanismos: 1. como biofertilizantes, aumentando a aquisição de nutrientes; 2. como bioprotetores, suprimindo o ataque de organismos patogênicos; 3. como bioestimulantes, aumentando a produção de reguladores do crescimento (AKHTAR *et al.*, 2012).

As RPCP fixadoras de nitrogênio são particularmente importantes por se associarem simbioticamente com as raízes das plantas e realizar a redução do nitrogênio atmosférico em amônia. A capacidade de fixar nitrogênio e enriquecer o solo com compostos nitrogenados é exclusiva de Bacteria e Archaea (YOUNG, 1992). Entre essas, destacam-se as espécies de rizóbios dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Ensifer*, que são simbiontes quase exclusivos de leguminosas (infectam raízes de *Parasponia* spp.), as espécies do gênero *Frankia*, que habitam as raízes das espécies actinorrízicas *Casuarina* e *Alnus*, e cianobactérias, como *Azospirillum* e *Azotobacter*, usadas como biofertilizantes em monocotiledôneas (BEATTIE, 2007; OP DEN CAMP *et al.*, 2012).

2.5. Rizóbios, fixação biológica do nitrogênio e a formação dos nódulos

Rizóbios são bactérias aeróbias não formadoras de esporos, quimiorganotróficas, em forma de bastonetes, gram-negativas, com comprimento que varia de 0,2 – 0,9 µm, possuindo um flagelo monotríqueo ou flagelos peritríqueos (SOMASEGARAM; HOBEN, 1994; MADIGAN *et al.*, 2010). Os rizóbios são bactérias do solo e têm a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico quando em associação simbiótica com espécies da família Leguminosae (DOYLE, 1998).

A fixação biológica do nitrogênio (FBN), processo que consiste na redução do nitrogênio atmosférico (N₂) em amônia (NH₃), é realizada por microorganismos chamados

diazotróficos. Embora a habilidade de reduzir o nitrogênio atmosférico à amônia esteja presente em vários gêneros procariontes (YOUNG, 1992), as condições fisiológicas necessárias para a FBN variam de espécie para espécie. Os rizóbios são as únicas bactérias diazotróficas capazes de fixar nitrogênio em uma relação de simbiose com plantas leguminosas. Além destes, existem ainda as bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre, as que se associam com raízes de plantas e algumas espécies de cianobactérias. Vários dos eventos que resultam na fixação do nitrogênio são muito complexos, envolvendo mudanças bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, tanto na bactéria quanto na planta hospedeira ou associada (LONG, 2001).

Embora os micro-organismos diazotróficos vivam em ambientes distintos e apresentem diferenças significativas quanto à morfologia, fisiologia e genética, todos compartilham de um mesmo mecanismo bioquímico para a fixação do nitrogênio atmosférico em amônia, o complexo enzimático denominado nitrogenase. Este complexo é formado por duas proteínas essenciais para a redução do nitrogênio. O componente maior, ou MoFe-proteína, um tetrâmero de massa molecular que varia de 180 a 235 kDa dependendo do organismo, consiste de dois pares de subunidades não idênticas. Por sua vez, o componente menor da nitrogenase, a Fe-proteína, é um dímero formado por duas subunidades idênticas de 30 a 72 kDa, dependendo da espécie bacteriana (TAIZ; ZEIGER, 2013).

No processo de fixação do nitrogênio, a Fe-proteína é primeiramente reduzida, sendo esta forma capaz de transferir elétrons para a MoFe-proteína, com consumo de ATP. Finalmente, a MoFe-proteína, que contém o sítio ativo para o substrato, efetua a redução do nitrogênio até amônia. A reação química de conversão do nitrogênio à amônia tem uma grande demanda energética (16 moléculas de ATP para cada molécula de N₂ reduzida). A amônia, assim produzida, é assimilada ao metabolismo das células vegetais que se encontram nos nódulos sob a forma de glutamato e glutamina a partir das reações catalisadas pela sintetase da glutamina (GS) e sintase do glutamato (GOGAT) (TAIZ; ZEIGER, 2013).

O complexo da nitrogenase é extremamente sensível ao oxigênio (O₂) e é inibido de modo irreversível. A sensibilidade da nitrogenase ao O₂ impõe limitações fisiológicas aos organismos diazotróficos, que protegem a enzima mantendo a tensão de O₂ no interior dos nódulos baixa devida à presença de leghemoglobina (DIXON; KAHN, 2004).

A bactéria de vida livre *Klebsiella pneumoniae* foi o primeiro micro-organismo diazotrófico a ter os genes envolvidos na FBN identificados e caracterizados, bem como foi nessa bactéria que o processo de FBN foi primeiramente estudado (ARNOLD *et al.*, 1988). Nela, os genes de fixação do nitrogênio encontram-se agrupados em uma região

cromossômica abrangendo 24.206 pares de base, onde estão dispostos 20 genes, denominados genes *nif* (do inglês, *nitrogen fixation*), organizados em 8 *operons*: *nifJ*, *nifHDKTY*, *nifENX*, *nifUSVWZ*, *nifM*, *nifF*, *nifLA* e *nifBQ*.

A organização dos genes de fixação de nitrogênio de *K. pneumoniae* em agrupamentos de *operons nif* consiste em um modelo estrutural que pode ser generalizado, até certo ponto, para os demais organismos diazotróficos, como os rizóbios, *Azotobacter* e *Azospirillum*. No entanto, a associação de bactérias fixadoras de nitrogênio com plantas mais estudada em nível molecular é a relação das leguminosas e os rizóbios (RHIJN; VANDERLEYDEN, 1995).

Os rizóbios diferenciam-se de outras bactérias diazotróficas devido à sua capacidade de nodulação. Durante a associação, a bactéria induz a planta a desenvolver um novo órgão, o nódulo. A formação dessa estrutura depende de um reconhecimento específico entre a bactéria e a planta hospedeira, ocasionando a invasão dos rizóbios no tecido vegetal. Embora o microssimbionte possa viver independente no solo, somente quando em simbiose com leguminosas é que a FBN é possível (SANDOWSKY *et al.*, 1995). Esse processo ocorre após as bactérias terem se diferenciado em bacteroides.

No solo ocorre uma troca de sinalizações moleculares entre a planta hospedeira e a bactéria, na qual compostos flavonóides liberados pela planta nos exudatos das raízes induzem nos rizóbios a expressão de genes da nodulação (*nod*, *nol*, e *noe*), os quais codificam enzimas que sintetizam oligossacarídeos de lipoquitina, conhecidos como fatores Nod, que são secretados e essenciais para o processo de nodulação (HEIDSTRA; BISSELING, 1996; GEURTS; BISSELING, 2002). Após a infecção, outras proteínas adicionais pertencentes ao sistema de secreção do tipo III (T3SS) são sintetizadas e secretadas, e estão envolvidas na nodulação de plantas específicas (VIPREY *et al.*, 1998; FAUVART; MICHIELS, 2008). Os genes de nodulação estão organizados em diversos *operons* localizados tanto no cromossomo como em plasmídios, e são positivamente regulados por NodD (CHEN *et al.*, 2007).

2.6. O feijão de corda e sua simbiose com *Bradyrhizobium*

O feijão de corda, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., é uma dicotiledônea originária da África, pertencente a família Leguminosae. Conhecida no Brasil por vários nomes populares tais como feijão de corda e feijão macássar na região Nordeste, feijão de praia e feijão de estrada na região Norte, feijão miúdo e feijão fradinho na região Sul e feijão caupi na região Sudeste (FREIRE FILHO; CARDOSO; ARAÚJO, 1983). É uma planta de hábito arbustivo, prostrado e trepador. Seu caule é formado por um eixo principal organizado por uma

sequência de nós e entre-nós. O primeiro nó constitui os cotilédones; o segundo corresponde à inserção das folhas primárias; do terceiro nó em diante, estão inseridas as folhas trifolioladas. O caule possui crescimento determinado ou indeterminado com inflorescências (PADULOSI; NG, 1997). Essa espécie apresenta ciclo de vida curto, baixa exigência hídrica e se desenvolve em solos de baixa fertilidade e, por meio da simbiose com rizóbios, tem a habilidade para fixar nitrogênio atmosférico (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2002).

De acordo com Andrade Júnior e colaboradores (2002) o feijão de corda possui alto valor nutritivo, com teor de proteína em média de 23 a 25%, contendo todos os aminoácidos essenciais, 62% de carboidratos, além de vitaminas, minerais, fibras e baixa quantidade de gordura (em média 2%). É cultivado principalmente para a produção de grãos para o consumo humano, como forragem verde, feno e farinha para a alimentação animal e, ainda, como adubação verde e proteção do solo (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2002).

Nas regiões onde o feijão de corda é cultivado, em geral, a cultura apresenta baixa produtividade média (300 kg ha⁻¹), o que é atribuído, entre outros fatores, à baixa disponibilidade de nutrientes no solo, principalmente, o nitrogênio (XAVIER *et al.*, 2007a). A cultura demanda uma grande quantidade de nitrogênio para o seu crescimento e desenvolvimento, requerendo uma quantidade de nitrogênio superior a 100 kg ha⁻¹ (FREIRE FILHO *et al.*, 2005). A adubação é uma das formas de aplicar nitrogênio ao solo e de elevar a disponibilidade desse nutriente às plantas. No entanto, a aplicação de nitrogênio nos solos tropicais pode às vezes se mostrar ineficiente pela perda de nitrogênio por lixiviação e volatilização (SORATTO *et al.*, 2003).

Por outro lado, o feijão de corda participa da simbiose com rizóbios, realizando a FBN. Quando o feijão de corda é bem nodulado a FBN é eficiente, podendo atingir altos níveis de produtividade (RUMJANEK *et al.*, 2005). Embora a cultura apresente grande capacidade de FBN, a nodulação e a FBN são influenciadas pela disponibilidade de nutrientes no solo que podem beneficiar ou prejudicar ambos os processos. Além disso, nem sempre as respostas observadas pelo uso de inoculantes são positivas, já que o inoculante pode apresentar pouca especificidade na nodulação (ZILLI; XAVIER; RUMJANEK, 2008). Os seguintes gêneros de rizóbios podem nodular o feijão de corda: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Ensifer* entre outros (WILLEMS, 2006; ZHANG *et al.*, 2007). Esta baixa especificidade da cultura em relação ao simbionte pode ser uma limitação da exploração biotecnológica da FBN, uma vez que os rizóbios autóctones do solo, além de serem competitivos e estarem em número elevado, apresentam eficiência variável na FBN (THIES; BOHLOOL; SINGLETON, 1991).

Além das características particulares inerentes do rizóbio, também há relatos de que determinados genótipos de feijão de corda apresentam maior capacidade de nodulação e eficiência na FBN (SANGINGA; LYASSE; SINGH, 2000; FALL *et al.*, 2003). Esse aspecto possibilita o estudo de cultivares eficientes no melhoramento da FBN e os benefícios que este processo pode trazer à cultura do feijão de corda em ambientes salinos. Para tanto, é preciso selecionar as estirpes de rizóbio tolerantes ao estresse salino, o que ampliaria as chances de sucesso na produtividade de grãos pelo estabelecimento da associação simbiótica com o feijão de corda nas regiões que são atingidas pela salinidade.

De acordo com a Instrução Normativa nº 10, de 21 de março de 2006, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, três estirpes de *Bradyrhizobium* são recomendadas para a cultura do feijão de corda: SEMIA 6461, SEMIA 6462 e SEMIA 6463.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Tolerância de *Bradyrhizobium* sp. à salinidade *in vitro*

A bactéria *Bradyrhizobium* sp. (estirpe SEMIA 6461) foi isolada a partir de um inoculante obtido comercialmente, indicado para a cultura de feijão de corda. Após isolamento pela técnica de esgotamento, em placas de Petri contendo meio de cultura extrato de levedura-manitol (EM), as bactérias foram cultivadas em caldo de EM, sob agitação constante, a 28 °C.

Para realizar o teste de tolerância da bactéria à salinidade, utilizou-se a metodologia descrita por Nóbrega *et al.* (2004), com pequenas alterações. No sexto dia, quando a cultura se encontrava na fase *log* de crescimento, alíquotas de 1,0 mL do meio foram centrifugadas a 5.000 x *g*, a 25 °C, por 5 min. O precipitado obtido foi ressuspenso em 1,0 mL de solução estéril de NaCl a 0,1 M e centrifugado nas condições anteriores por mais quatro vezes. Para analisar a tolerância dessa bactéria à salinidade, foi adicionado NaCl a 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 g L⁻¹ ao meio EM distribuído nas placas de Petri. As bactérias cresceram até atingir a fase *log* em meio líquido EM, sob agitação, a 28 °C. Uma alíquota de 1,0 mL do meio foi centrifugada e o *pellet* foi lavado e centrifugado três vezes com 1,0 mL de solução estéril de NaCl a 0,1 M. Alíquotas de 0,1 mL foram distribuídas sobre o meio EM e as placas foram incubadas a 28 °C, por 15 dias. Para avaliar os padrões de crescimento das bactérias nas diferentes concentrações de NaCl, foram atribuídos as seguintes referências: 0 – sem crescimento; 1 – pouco crescimento; 2 – crescimento razoável e com distribuição heterogênea na placa; 3 – crescimento máximo.

3.2. Condições de cultivo e tratamentos

Os experimentos foram conduzidos na casa de vegetação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará (UFC). As sementes de feijão de corda das cultivares Pitiúba e TVu 2331 foram desinfestadas com álcool a 70%, por 1 min, e, em seguida, com hipoclorito de sódio comercial, contendo 2% de cloro residual (diluído 1:3), durante 5 min. Posteriormente, as sementes foram lavadas com água destilada estéril por sete vezes, em condições assépticas, e semeadas em copos descartáveis (duas sementes por copo) contendo uma mistura 1:1 de areia e vermiculita esterilizada. O substrato utilizado, constituído por areia e vermiculita 2:1 (v/v) foi analisado no Laboratório de Solos –

UFC (Tabela 1). Cada semente foi inoculada com 1 mL de caldo EM na fase *log*, contendo aproximadamente 10^8 células. Decorridos sete dias, uma segunda inoculação foi feita nas mesmas condições e foram selecionadas as plântulas com base na uniformidade para serem transferidas para baldes de 5,0 L furados contendo substrato estéril.

Tabela 1 – Análise da concentração do complexo de troca catiônica, da matéria orgânica (M.O.) e de C, N e P do substrato utilizado no estudo.

cmol _c kg ⁻¹		g kg ⁻¹	
K ⁺	0,02	M.O.	1,66
Na ⁺	0,04	C	0,96
Ca ²⁺	0,60	N	0,08
Mg ²⁺	0,50	P	0,001
Al ³⁺	0,00		

Aos treze dias, as plantas foram submetidas à irrigação parcelada com NaCl a 25 mM, até atingir a concentração de 75 mM, a fim de evitar choque osmótico. Os tratamentos estudados foram constituídos por: 1. plantas não inoculadas irrigadas com água destilada (0 mM de NaCl) e supridas a cada 5 dias com solução nutritiva de Hoagland (com nitrogênio); 2. plantas não inoculadas irrigadas com solução de NaCl a 75 mM e supridas a cada 5 dias com solução nutritiva de Hoagland (com nitrogênio); 3. plantas inoculadas irrigadas com água destilada (0 mM de NaCl) e supridas a cada 5 dias com solução nutritiva de Hoagland modificada (sem nitrogênio); 4. plantas inoculadas irrigadas com solução de NaCl a 75 mM e supridas a cada 5 dias com solução nutritiva de Hoagland modificada (sem nitrogênio) (Tabela 2). A fração de lixiviação foi de 25%.

Os experimentos foram realizados durante o mês de novembro de 2012 e foram analisados os efeitos dos tratamentos no crescimento, nas trocas gasosas, nos teores de solutos inorgânicos e orgânicos, nas atividades das enzimas antioxidativas e das enzimas do metabolismo do nitrogênio. Durante o experimento, as medidas de temperatura e de umidade relativa do ar no interior da casa de vegetação foram monitoradas diariamente com um termohigrógrafo, sendo observados os valores médios, respectivamente, de $28,3 \pm 0,62$ °C e $75,8 \pm 1,95$ %.

Tabela 2 – Concentração em mM dos macronutrientes nas soluções nutritivas para os tratamentos com fonte de N ou sem fonte de N.

	Com N	Sem N
KNO ₃	6,0	—
Ca(NO ₃) ₂	2,0	—
NH ₄ H ₂ PO ₄	2,0	—
K ₂ SO ₄	—	3,0
CaCl ₂	—	2,0
KH ₂ PO ₄	—	2,0
MgSO ₄	1,0	1,0

3.3. Coleta e análise do crescimento

Aos quinze dias após o início dos tratamentos, antes de haver o floramento, as plantas foram coletadas. Durante a coleta, as plantas foram divididas em parte aérea, raízes e nódulos. Logo em seguida, foram feitas as medidas de matéria fresca (das raízes e parte aérea) e a área foliar (LI-3100, Area Meter, Li-Cor., Inc. Lincoln, Nebraska, USA). Parte do material coletado foi congelado em nitrogênio líquido, e a outra parte foi seca a 70 °C, por 72 h, em estufa com circulação e renovação de ar, para determinação da matéria seca e de solutos inorgânicos. Uma parcela do material congelado foi mantida em *ultrafreezer* para determinação das atividades enzimáticas e o restante foi liofilizado, para determinação de solutos orgânicos.

3.4. Teor relativo de água

Aos quinze dias de tratamento, antes das plantas serem coletadas, foram retirados da segunda folha completamente expandida, contada a partir do ápice, 10 discos foliares de 1 cm de diâmetro. Após a obtenção da massa fresca (MF) dos discos, eles foram transferidos para recipientes contendo água desionizada, onde permaneceram por 4 h até atingirem a massa túrgida (MT). Em seguida, os discos foram levados à estufa a 70 °C, por 72 h, e pesados para obtenção da massa seca (MS). O TRA foi calculado pela fórmula $TRA (\%) = [(MF - MS) \cdot (MT - MS)^{-1}] \times 100$ (ČATSKÝ, 1960).

3.5. Teor relativo de clorofila

O teor relativo de clorofila (índice SPAD) foi determinado na primeira folha completamente expandida, contada a partir do ápice, utilizando-se um medidor de clorofila SPAD 502 (Minolta, Osaka, Japan) diretamente. Os resultados dessa análise representam a média de três medidas por planta.

3.6. Parâmetros fotossintéticos e fluorescência da clorofila *a*

As medidas de fotossíntese líquida (A), transpiração (E), condutância estomática (g_s), relação entre as concentrações interna e externa de CO_2 (C_i/C_e) e fluorescência da clorofila *a* foram realizadas no período da manhã (entre 8h e 30 min e 11 h e 30 min do 15º dia) na porção mediana da primeira folha completamente expandida, a partir do ápice. Para as determinações de A , E , g_s e C_i/C_e , utilizou-se um analisador de gás no infravermelho (IRGA, mod. LCI, ADC, Hoddesdon, UK), acoplado a uma fonte de radiação artificial (PSU, ADC, Hoddesdon, UK), com intensidade de aproximadamente $1.200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As medidas de fluorescência da clorofila *a* foram feitas com um fluorímetro (Hansatech, King's Lynn, Norfolk, UK). A emissão de fluorescência foi acompanhada pela emissão de luz em 650 nm, com intensidade luminosa de $1.500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.7. Determinação dos elementos inorgânicos

3.7.1. Determinação de Na^+ , K^+ e Cl^-

Os extratos brutos para determinação de Na^+ , K^+ e Cl^- foram preparados de acordo com Cataldo *et al.* (1975), com algumas modificações. Para a obtenção do extrato bruto, pesaram-se 100 mg do material seco em estufa e adicionaram-se 4,0 mL de água em tubos de ensaio. As amostras foram agitadas vigorosamente e incubadas em banho-maria a 45 °C, por 60 min, sendo os tubos agitados a cada 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x g , por 10 min. O sobrenadante de cada amostra foi coletado e filtrado em papel de filtro qualitativo e armazenado em frascos a -20 °C.

Os teores de Na^+ e de K^+ foram determinados por fotometria de chama (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1989), sendo realizada uma leitura para cada extrato. Os teores de Cl^- foram determinados segundo o método de Gaines, Parker e Gascho (1984). A

3,0 mL do extrato convenientemente diluído, foram adicionados 0,5 mL da mistura de $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ a 3,2 mM, em metanol, e $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ a 20,2%, em água desionizada, na proporção de 4:1. Os tubos foram agitados e, após 15 min, os teores de Cl^- foram avaliados através das leituras de absorvância a 460 nm, utilizando-se NaCl como padrão.

Cada repetição para determinação dos íons constou da dosagem em duplicata de cada extrato. Os teores dos íons foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS e representam a média de quatro repetições.

3.7.2. Determinação de fósforo

Os teores de fósforo (P) foram determinados segundo o método de Braga e Defelipo (1974), com adaptações. O extrato foi preparado através da homogeneização de 100 mg da amostra seca com 5,0 mL de HNO_3 a 1,0 M. O homogenato foi mantido sob agitação por 60 min, a 25 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x g, por 15 min, filtradas, e o volume foi aferido para 10 mL. Em tubos de ensaio contendo 1,0 mL de extrato convenientemente diluído, foram adicionados 2,0 mL de uma solução composta por molibdato de amônio $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ a 2% e subcarbonato de bismuto $(\text{BiO})_2\text{CO}_3$ a 3,93 mM. Em seguida, foram adicionados 10 mg de ácido ascórbico, e os tubos foram vigorosamente agitados e deixados em repouso por 30 min. Os teores de P foram determinados por meio de leituras de absorvância a 660 nm, utilizando-se uma curva padrão com concentrações crescentes de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4). Os resultados foram expressos em mg g^{-1} MS e representam a média de quatro repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

3.7.3. Determinação de nitrogênio total

A concentração de nitrogênio total foi determinada segundo o método descrito por Baethgen e Alley (1989). Pesaram-se 50 mg das amostras em tubos digestores, nos quais foram adicionados 1,10 g da mistura catalisadora (composição: sulfato de potássio, sulfato de cobre e selênio, na proporção de 100:10:1) e 2,0 mL de H_2SO_4 concentrado. Logo depois, os tubos foram colocados em um bloco digestor [Marconi[®], modelo MA 4025 (Piracicaba, São Paulo, Brasil)], no qual a temperatura foi aumentada até atingir 350 °C, com o objetivo de mineralizar as amostras. Ao final desse processo, quando as amostras apresentavam-se como uma solução de cor verde e sem resíduos de material não digerido, o conteúdo de cada tubo

digestor foi ressuspenso com água desionizada e o volume aferido para 25 mL, em um balão volumétrico. Em tubos de ensaio, foi adicionado 1,0 mL da amostra digerida, convenientemente diluída, com a solução diluente (22 g da mistura catalisadora em 1,0 L de H₂SO₄ a 1,1 M). Em seguida, foram adicionados 5,5 mL de uma solução composta por fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) a 0,1 M, tartarato de sódio e potássio a 5% e hidróxido de sódio (NaOH) a 5,4%, 4,0 mL de uma solução de salicilato de sódio a 15%, contendo nitroprussiato de sódio a 0,03%, e 2,0 mL de hipoclorito de sódio a 0,31%. Os tubos foram agitados à medida que cada reagente foi adicionado, e, ao final, mantidos em banho-maria a 37 °C, por 15 min. Os teores de nitrogênio total foram estimados através de leituras de absorvância a 650 nm, com base em uma curva padrão com concentrações crescentes de (NH₄)₂SO₄. Os resultados foram expressos em mg g⁻¹ MS e representam a média de quatro repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

3.8. Solutos orgânicos

3.8.1. Carboidratos solúveis

Para a determinação de carboidratos solúveis, foram preparados extratos contendo 50 mg da amostra liofilizada com 5,0 mL de etanol a 80% em tubos de ensaio. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 75 °C, por 60 min, sendo agitados a cada 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x g, por 10 min, sendo o sobrenadante coletado, filtrado em papel de filtro e aferido em balão volumétrico para 25 mL, com etanol a 80%. Os frascos contendo os extratos foram armazenados a -20 °C.

Os carboidratos solúveis foram determinados de acordo com Dubois *et al.* (1956). A mistura reacional foi formada por 0,5 mL do extrato convenientemente diluído, 0,5 mL de fenol a 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi agitada e permaneceu em repouso até atingir a temperatura ambiente. A quantificação dos carboidratos foi feita através de leituras de absorvância em 490 nm e utilizando uma curva padrão feita com D(+) glicose anidra. Os teores de carboidratos solúveis foram expressos em µmol g⁻¹ MS e representam a média de quatro repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

3.8.2. N-aminossolúveis

Os extratos utilizados para a determinação de N-aminossolúveis foram os mesmos utilizados para a determinação de carboidratos solúveis. Os teores de N-aminossolúveis foram determinados segundo o método de Yemm e Cocking (1955). A mistura reacional foi formada por 0,5 mL do extrato convenientemente diluído, 0,25 mL de tampão citrato de sódio a 0,2 M (pH 5,0), 0,5 mL de cianeto de potássio (KCN) a 0,2 mM, em metilcelosolve a 100% e 0,1 mL de ninhidrina a 5%, em metilcelosolve a 100%. Os tubos foram fechados, agitados em vortex e levados ao banho-maria a 95 °C, por 15 min. A reação foi interrompida em banho de gelo, quando então se adicionou 0,65 mL de etanol a 60% em cada tubo. Os teores de N-aminossolúveis foram estimados através de leituras de absorbância em 570 nm, com base em uma curva padrão com concentrações crescentes de glicina. Os resultados dos teores de N-aminossolúveis foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$ e os resultados representam a média de quatro repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

3.8.3. Prolina

Para a obtenção do extrato bruto para a determinação de prolina, pesou-se 50 mg do material liofilizado e adicionaram-se 4,0 mL de água deionizada em tubos de ensaio. As amostras foram então agitadas e incubadas em banho-maria a 75 °C, por 60 min, sendo os tubos agitados a cada 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x g, por 10 min. O sobrenadante de cada amostra foi coletado, filtrado em papel de filtro e o volume aferido em balão volumétrico para 10 mL com água desionizada. Os extratos foram armazenados a -20 °C até sua utilização. Os teores de prolina foram determinados segundo o método de Bates *et al.* (1973). Foram adicionados em tubos de ensaio 1,0 mL de extrato, 1,0 mL de ninhidrina ácida (composição: 1,25g de ninhidrina em 30mL de ácido acético glacial e 20mL de ácido fosfórico 6M) e 1,0 mL de ácido acético glacial. A mistura foi mantida em banho-maria a 95 °C, por 60 min. A reação foi interrompida colocando os tubos em banho de gelo, por 10 min, seguindo-se da adição de 2,0 mL de tolueno. Os tubos foram agitados vigorosamente e deixados em repouso até ocorrer a formação de uma mistura bifásica. Em seguida, retirou-se a fase superior da mistura bifásica com uma pipeta Pasteur para quantificação da prolina por meio de leituras de absorbância em 520 nm e utilizando-se uma curva padrão feita com L-prolina. Os resultados dos teores de prolina foram expressos em

$\mu\text{mol g}^{-1}$ MS, e os resultados expressam a média de quatro repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

3.9. Atividade das enzimas antioxidativas e proteínas solúveis

3.9.1. Preparo dos extratos

Os extratos para determinação da atividade das enzimas antioxidativas e dos teores de proteínas solúveis foram preparados a partir da maceração de 1,0 g de material fresco da parte aérea e de raízes em nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em 4,0 mL de tampão fosfato de potássio a 0,1 M (pH 7,0), contendo EDTA a 0,1 mM. O homogenato foi centrifugado a 12.000 x g, por 15 min, a 4 °C. O sobrenadante foi armazenado a -25 °C até o momento da análise

3.9.2. Dismutase do superóxido (SOD)

A atividade da SOD foi determinada de acordo com a metodologia de Beauchamp e Fridovich (1971). A mistura reacional foi composta por tampão fosfato de potássio a 50 mM (pH 7,8), EDTA a 0,1 mM, metionina a 19,5 mM, *nitroblue tetrazolium* (NBT) a 75 μM , riboflavina a 10 μM e 50 μL do extrato bruto, em um volume final de 1,5 mL. A reação foi conduzida a 25 °C em uma câmara de reação iluminada com lâmpadas fluorescentes de 20 W por 15 min. A atividade enzimática foi expressa através do aumento da absorbância em 560 nm, que ocorre devido a formação de azul de formazana a partir da fotorredução do NBT. Os resultados foram expressos em unidade de atividade enzimática (quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da fotorredução do NBT em 15 min) por grama de matéria fresca (UA g^{-1}), e representam a média de quatro repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

3.9.3. Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada segundo o método descrito por Havir e McHale (1987). O meio de reação foi constituído por tampão fosfato de potássio a 0,1 M (pH 7,0), EDTA a 0,1 mM, H_2O_2 a 0,5 M e 150 μL de extrato bruto convenientemente diluído, em um volume final de 1,5 mL. A atividade foi determinada pelo decréscimo na absorbância em 240

nm, devido ao consumo de H_2O_2 . Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$, usando-se o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 ($36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), e representam a média de quatro repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

3.9.4. Peroxidase do ascorbato (APX)

A atividade da APX foi realizada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981). O meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio a 50 mM (pH 6,0), EDTA a 50 mM, ascorbato a 15 mM, H_2O_2 a 30 mM e 300 μL de extrato bruto convenientemente diluído, em um volume final de 1,5 mL. A atividade da APX foi determinada pela oxidação do ascorbato, que é medida pelo decréscimo na absorvância em 290 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$, usando o coeficiente de extinção molar do ascorbato ($2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e levando-se em conta a estequiometria da reação (dois moles de ascorbato para um mol de H_2O_2), e representam a média de quatro repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

3.9.5. Peroxidase do guaiacol (GPX)

A atividade da GPX foi determinada segundo o método de Kar e Mishra (1976), o qual consiste em um meio de reação formado por tampão fosfato de potássio a 0,1 M (pH 6,0), EDTA a 0,1 mM, guaiacol a 20 mM, H_2O_2 a 60 mM e 50 μL do extrato bruto convenientemente diluído, em um volume final de 2,0 mL. A reação foi monitorada pelo aumento na absorvância em 420 nm, que ocorre devido à formação do tetraguaiacol. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$, usando-se o coeficiente de extinção molar do tetraguaiacol ($26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e levando-se em conta a estequiometria da reação (um mol de tetraguaiacol para quatro moles de H_2O_2), e representam a média de quatro repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

3.9.6. Proteínas solúveis

As proteínas solúveis foram determinadas de acordo com o método descrito por Bradford (1976), utilizando-se o reagente azul de coomassie. Para 1,0 L deste reagente, dissolveram-se 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Chemical Company) em 50 mL de etanol a 95%, acrescidos de 100 mL de ácido fosfórico a 85%. O volume final da

solução foi completado com água deionizada. A uma alíquota de 0,1 mL do extrato convenientemente diluído, foi adicionado 1,0 mL do reagente de coomassie. A mistura foi deixada em repouso por 15 min, sendo então submetidas à leitura de absorvância em 595 nm. Como padrão, foi utilizada a albumina de soro bovina. Os resultados dos teores de proteínas solúveis foram expressos em mg g^{-1} MF. Os resultados representaram a média de quatro repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

3.10. Determinação da peroxidação de lipídios

Os extratos para a determinação da peroxidação de lipídios foram feitos a partir da homogeneização de 0,5 g de material fresco com 5,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5%, seguido de centrifugação a $12.000 \times g$, por 15 min, a 4°C . Os danos provocados pela salinidade nas membranas biológicas foram estimados pela determinação de malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação dos lipídios, segundo a metodologia de Heath e Parcker (1968). O material foi homogeneizado com uma solução composta por ácido tiobarbitúrico a 0,5% (p/v) e TCA a 20% (v/v). A mistura foi mantida em banho-maria a 95°C , por 30 min, e resfriada em banho de gelo. Logo em seguida, centrifugou-se a mistura a $3.000 \times g$, por 10 min. Os resultados foram expressos em $\text{mmol de MDA g}^{-1}$ MF, usando-se as leituras de absorvâncias em 532 nm (reação do TBA com o MDA) e 600 nm (reação do TBA com outras substâncias), o coeficiente de extinção molar do MDA ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e a equação $(A_{532} - A_{600})/\epsilon$. Os resultados representam a média de quatro repetições e cada extrato foi dosado em duplicata.

3.11. Determinação de leghemoglobina nos nódulos

Os nódulos para a determinação dos teores de leghemoglobina e da atividade da sintetase da glutamina (GS) foram coletados aos 15 dias após o início dos tratamentos e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos em *ultrafreezer*.

Os extratos para a determinação dos teores de leghemoglobina foram preparados de acordo com Seebauer *et al.* (2004), com pequenas modificações. Amostras de 100 mg de nódulos foram macerados em almofariz em 3,0 mL de tampão imidazole a 50 mM (pH 7,2), contendo MgSO_4 a 20 mM, EDTA a 1 mM, DTT a 5 mM, PVP a 1% (p/v) e β -mercaptoetanol a 1% (v/v). O homogenato foi centrifugado a $12.000 \times g$, durante 30 min, a 4°C , e o sobrenadante obtido, utilizado nas análises.

Os teores de leghemoglobina foram estimados seguindo o método de Wilson e Reisenauer (1963), com modificações. A uma alíquota de 0,5 mL do extrato convenientemente diluído, foi adicionado 1,0 mL da solução de Drabkin, constituída por cianeto de potássio (KCN) a 0,8 M, ferricianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$) a 0,6 M e bicarbonato de sódio a 0,01 M. A mistura foi deixada em repouso por 15 min, sendo então submetida à leitura de absorvância em 540 nm. Como padrão, foi utilizada a cianometahemoglobina, que é produzida pela oxidação do ferro da hemoglobina pelo ferricianeto de potássio formando metahemoglobina, a qual é convertida em cianometahemoglobina pelo cianeto de potássio. Os resultados dos teores de leghemoglobina foram expressos em $mg\ g^{-1}$ MF. Os resultados representam a média de quatro repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

3.12. Sintetase da glutamina (GS) nos nódulos

Os extratos para a determinação da atividade da GS foram os mesmos da determinação de leghemoglobina. A atividade da GS foi determinada de acordo com o método descrito por Rhodes, Rendon e Stewart (1975), através da formação de γ -glutamil hidroxamato (reação de “sintetase”) a partir do glutamato e hidroxilamina (em substituição ao amônio, o substrato fisiológico). O meio de reação (volume final de 1,0 mL) consistiu de tampão imidazole a 100 mM (pH 7,2), glutamato a 45 mM (neutralizado com imidazole), ATP a 4,5 mM, $MgCl_2$ a 50 mM e 100 μ L do extrato, sendo a reação iniciada pela adição de 100 μ L de hidroxilamina a 30 mM. Os tubos de ensaio contendo a mistura de reação foram incubados a 30 °C, em banho-maria, por 45 min. Após esse período, a reação enzimática foi parada pela adição de 250 μ L de uma solução contendo $FeCl_3$ a 0,37 M, HCl a 0,67 N e TCA a 0,2 M. Estabelecida a cor da reação (após cerca de 10 min), as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, por 10 min. A quantidade de γ -glutamil hidroxamato sintetizada foi determinada colorimetricamente pela leitura de absorvância em 540 nm, tendo como base uma curva padrão feita com concentrações crescentes de γ -glutamil monohidroxamato (GMH). O branco da reação constou da mesma mistura de reação, exceto pela adição de 100 μ L do tampão de extração em substituição do extrato. Os resultados foram expressos em $nmol\ GMH\ min^{-1}\ mg^{-1}$ proteína e representam a média de quatro repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

3.13. Análise histológica dos nódulos

Os nódulos da análise histológica foram coletados no 15º dia após o início dos tratamentos e foram imediatamente fixados em solução de Karnovsky durante 48 h. Após a fixação, as amostras foram lavadas com tampão fosfato de sódio (pH 7,2) e desidratadas em série etanólica de concentração crescente. As amostras foram pré-infiltradas em uma mistura de etanol e solução de infiltração (Leica HistoResin) na proporção 1:1 (v/v), por 24 h. Em seguida, os nódulos foram mantidos imersos durante 96 h em solução de infiltração, sob vácuo. Os nódulos foram emblocados em resina Leica HistoResin e seccionados em micrótomo (6 µm). Os cortes foram montados em lâminas permanentes e corados com azul de toluidina e fucsina básica ou com lugol. As imagens foram obtidas com o microscópio OLYMPUS UC30 Photomicroscope.

3.14. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 (ausência e presença de NaCl a 75 mM) x 2 (não inoculado e inoculado), com quatro repetições para cada um dos cultivares. Os resultados foram expressos pela média ± erro padrão das repetições de cada tratamento. Os dados foram examinados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA). Foi utilizado o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para comparar as médias entre os tratamentos controle e salino e entre os tratamentos não inoculado e inoculado para cada um dos cultivares. O programa utilizado para as análises estatísticas foi o Sisvar e os gráficos foram construídos utilizando o software SigmaPlot 11.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Tolerância de *Bradyrhizobium* sp. à salinidade

Nas concentrações de 1, 2, 3 e 5 g L⁻¹ de NaCl, as bactérias tiveram crescimento máximo, enquanto que na concentração de 10 g L⁻¹ de NaCl, as bactérias apresentaram crescimento razoável, com distribuição heterogênea na placa (Figura 1). Nas concentrações de 20, 30 e 40 g L⁻¹ de NaCl, houve pouco crescimento, e na concentração de 50 g L⁻¹ de NaCl, as bactérias não apresentaram crescimento (Figura 1). Esses resultados estão de acordo com os apresentados por Nóbrega *et al.* (2004), os quais demonstraram que as concentrações máximas de NaCl toleradas variaram de 2 a 30 g L⁻¹, em doze estirpes de *Bradyrhizobium* estudadas. Em outro estudo, avaliou-se a tolerância à salinidade em 76 estirpes de rizóbio obtidas de nódulos de feijão de corda coletados na região Nordeste, nas concentrações de 1%, 2% e 3% de NaCl, e, à medida que a concentração desse sal aumentou, houve uma redução de estirpes tolerantes, sendo que apenas 12% das estirpes testadas foram capazes de crescer em meio contendo 3% de NaCl (XAVIER *et al.*, 2007).

Em regiões semiáridas, o acúmulo de sais é um problema que leva à degradação do solo e, geralmente solos salinos contêm pouco nitrogênio, o que os torna inadequados para o cultivo da maioria das plantas. Uma solução para esse problema é o cultivo de plantas capazes de fixar nitrogênio através da simbiose rizóbio-leguminosa, entretanto a maioria das plantas e dos rizóbios é sensível à salinidade (SINGLETON *et al.*, 1986). A seleção de rizóbios com características de tolerância ao estresse salino tem mostrado grande diversidade nas populações deste micro-organismo nos solos (MARTINS; NEVES; RUMJANEK, 1997).

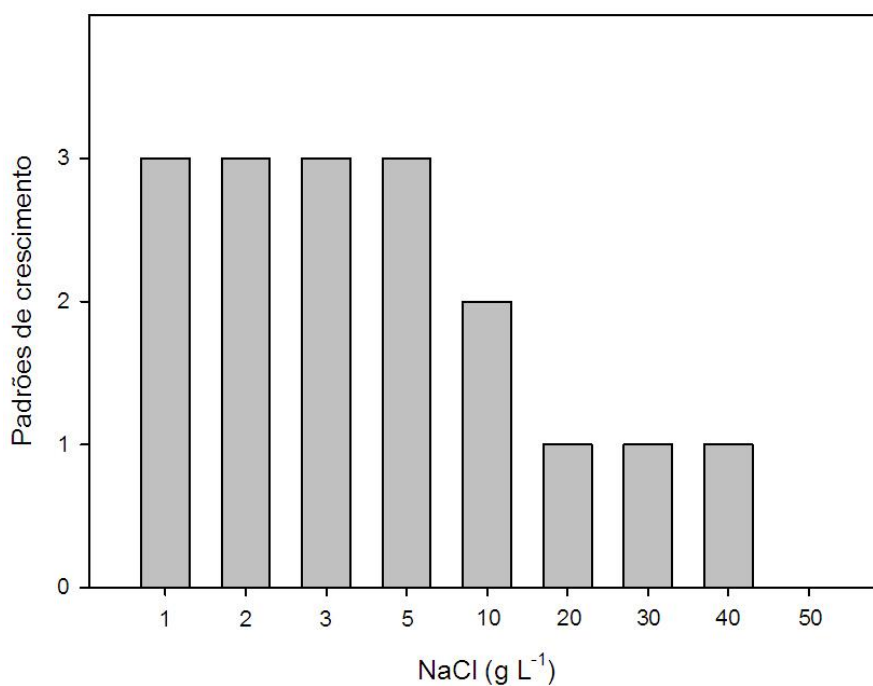


Figura 1 – Padrões de crescimento da estirpe SEMIA 6461 exposta a diferentes concentrações de NaCl (g L⁻¹) em meio extrato de levedura-manitol. 0 = sem crescimento; 1 = pouco crescimento; 2 = crescimento razoável, com distribuição heterogênea na placa; 3 = crescimento máximo, com distribuição uniforme por toda a placa, não diferindo do crescimento no meio com sua composição original.

4.2. Crescimento vegetativo

A fim de verificar o efeito da inoculação com o rizóbio no crescimento de plantas de feijão de corda submetidas à salinidade, foram determinadas as massas secas da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR) e a relação entre a matéria seca da parte aérea e a matéria seca das raízes (MSPA/MSR). A salinidade, bem como a inoculação, afetaram todos os parâmetros analisados. Em Pitiúba, não houve diferença significativa na MSPA em função da inoculação, e o estresse salino reduziu essa variável em 53,5%, em média (Figura 2A). Já em TVu, a inoculação reduziu a MSPA das plantas em ambos os tratamentos salinos, enquanto que a salinidade diminuiu em 55,4% e 60% a MSPA das plantas não inoculadas e inoculadas, respectivamente, em comparação aos seus controles (Figura 2A).

A salinidade reduziu significativamente a MSR das plantas de Pitiúba e de TVu, em ambas as condições de inoculação (Figura 2B). Em Pitiúba, a redução na MSR das plantas não inoculadas, causada pela salinidade, foi de 67%, a qual foi ainda maior nas plantas inoculadas, nas quais essa variável reduziu 77% (Figura 2B). Em TVu, o crescimento das raízes reduziu 51%, em média, em função da salinidade, e a inoculação das plantas resultou em uma menor MSR, em ambas as condições de salinidade (Figura 2B).

A relação MSPA/MSR nas plantas em condições salinas teve efeitos diferentes nos dois cultivares quando inoculados com o rizóbio (Figura 2C). As plantas de Pitiúba submetidas à salinidade apresentaram um aumento na relação MSPA/MSR, uma vez que a raiz cresceu menos que a parte aérea nas plantas sob estresse; a inoculação com o rizóbio também aumentou essa variável, e isso foi mais evidente nas plantas em condições salinas (Figura 2C). Em contrapartida, a relação MSPA/MSR em TVu foi reduzida pelo estresse salino em ambos os tratamentos de inoculação, em comparação às condições controle. As plantas do tratamento inoculado salino apresentaram redução de 10,5% na MSPA/MSR, enquanto que nas plantas não inoculadas e estressadas, o valor da MSPA/MSR foi de 15,9% inferior.

Medeiros *et al.* (2008) relataram decréscimos no valor de MSPA em feijão de corda inoculado com a estirpe BR2001 de *Bradyrhizobium*, outrora recomendada como inoculante, à medida que os níveis de salinidade da água de irrigação aumentaram. Resultados semelhantes foram obtidos nos genótipos Jemalong e TN6.18 de *Medicago truncatula* submetidos a estresse com NaCl a 75 mM e inoculados com a estirpe tolerante à salinidade *Sinorhizobium* 2001, apresentando redução na biomassa de 28% para Jemalong e 56% para TN6.18 (AYDI; SASSI; ABDELLY, 2008).

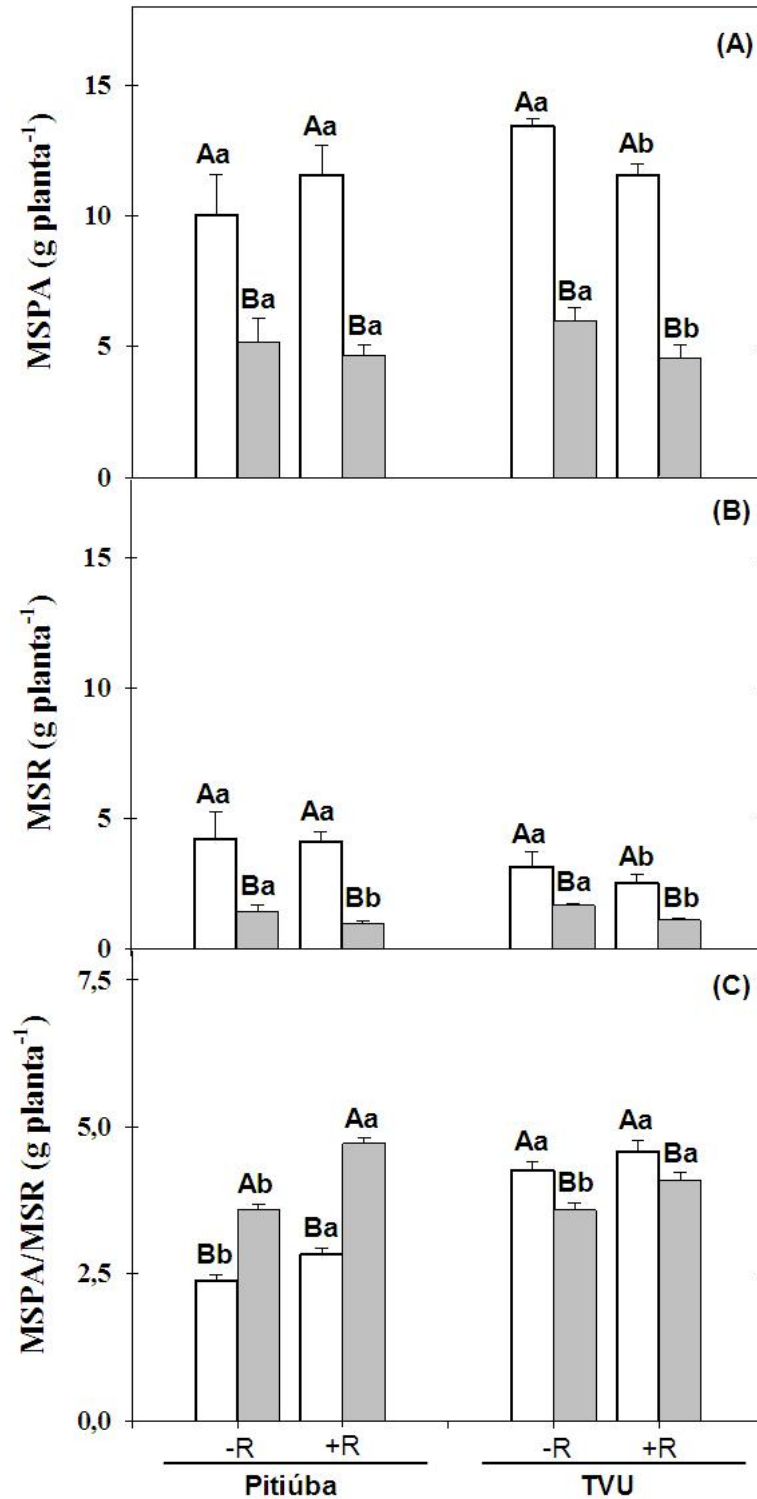


Figura 2 – Matéria seca da parte aérea (MSPA, A), matéria seca das raízes (MSR, B) e relação MSPA/MSR (C) de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVU (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* (+R), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 (□) e 75 mM (■). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas, dentro de cada tratamento de inoculação, ou seguidas das mesmas letras minúsculas, nos mesmos tratamentos salinos, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). As barras representam o erro da média.

De maneira geral, a área foliar (AF) das plantas de feijão de corda foi fortemente reduzida pela salinidade, em comparação com as plantas controle, e isso foi mais evidente nas plantas não inoculadas (Figura 3). Em média, a redução na AF das plantas de Pitiúba e TVu não inoculadas foi de 65,2%, enquanto que, nas plantas inoculadas, o valor médio dessa redução correspondeu a 50,8%. A área foliar tem sua importância por ser um parâmetro relacionado com a produção de biomassa, pois o processo fotossintético depende da interceptação da energia luminosa pelas folhas e sua conversão em energia química na forma de carboidratos (SEVERINO *et al.*, 2004). A diminuição da área foliar em plantas sob condições de estresse salino ocorre como mecanismo de defesa contra o déficit hídrico, pois uma área foliar menor diminui a transpiração, minimizando os efeitos da deficiência hídrica dos solos salinizados (DANTAS *et al.*, 2002). Embora a inoculação das plantas dos dois cultivares tenha atenuado os efeitos deletérios da salinidade na área foliar, isso não foi suficiente para minimizar tais efeitos negativos na biomassa das plantas de feijão de corda.

4.3. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

A fotossíntese líquida (A) não foi afetada significativamente em nenhum dos tratamentos estudados, para ambos os cultivares de feijão de corda (Figura 4A). Por outro lado, tanto a salinidade como a inoculação com rizóbio afetaram significativamente a transpiração (E), a condutância estomática (g_s) e a relação entre as concentrações interna e externa de CO_2 (C_i/C_a), mostrando que as plantas apresentaram respostas diferentes ante os tratamentos.

A salinidade não afetou a E das plantas não inoculadas do cultivar Pitiúba, enquanto que, nas plantas inoculadas, esse estresse causou uma redução de 38,5%, em relação ao respectivo controle (Figura 4B). Além disso, na ausência de NaCl, as plantas inoculadas apresentaram maiores valores de E , em relação àquelas não inoculadas (Figura 4B). Em TVu, a salinidade também não afetou a E das plantas não inoculadas, enquanto que, nas plantas inoculadas, o estresse salino reduziu a E em 19%, em relação ao seu controle (Figura 4B). Quando as plantas não estão submetidas à restrição de água, a transpiração é aumentada nos períodos de maiores temperaturas e condições de iluminação (MONTERO; MÚÑOZ; LORENZO, 2001). A redução na transpiração envolve o fechamento dos estômatos e esta esposta pode levar à diminuição na assimilação de CO_2 , com perda na produção de biomassa (MUGNAI *et al.*, 2009).

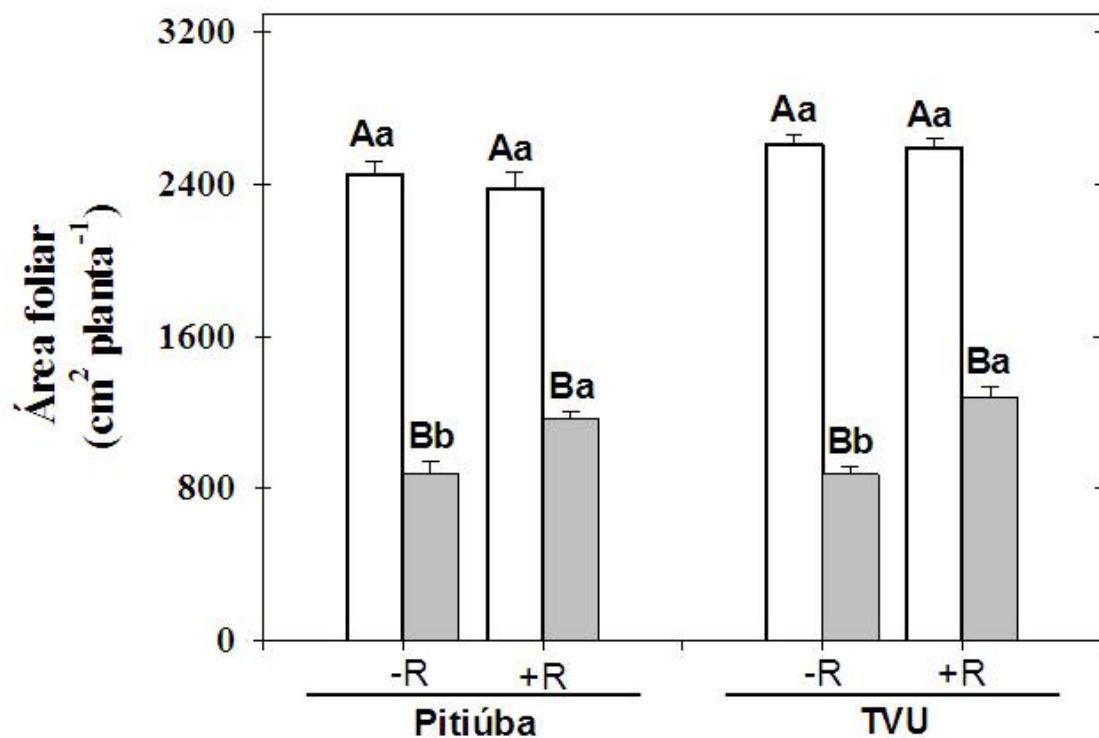


Figura 3 – Área foliar (AF) de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVU (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* (+R), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 (□) e 75 mM (■). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas, dentro de cada tratamento de inoculação, ou seguidas das mesmas letras minúsculas, nos mesmos tratamentos salinos, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). As barras representam o erro da média.

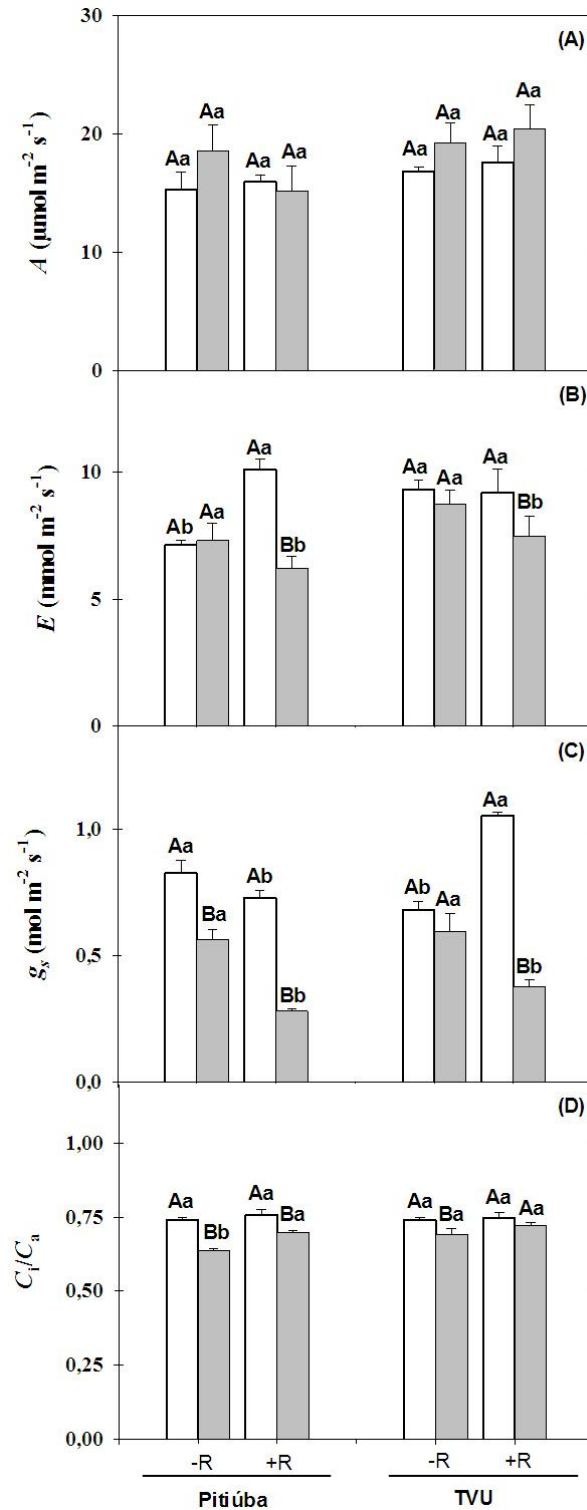


Figura 4 – Fotossíntese (A, A), transpiração (E, B), condutância estomática (g_s , C) e relação entre as concentrações internas e externas de CO_2 (C_i/C_a , D) de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVU (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* (+R), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 (□) e 75 mM (■). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas, dentro de cada tratamento de inoculação, ou seguidas das mesmas letras minúsculas, nos mesmos tratamentos salinos, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). As barras representam o erro da média.

A g_s foi afetada pela salinidade nas plantas de Pitiúba, e esse efeito foi intensificado pela inoculação com o rizóbio (Figura 4C). As plantas não inoculadas tiveram redução de 32,5% nessa variável, em função da salinidade, enquanto que, nas plantas inoculadas, essa redução foi de 61,6%, em comparação com seus respectivos controle (Figura 4C). Em TVu, a g_s foi afetada pela salinidade apenas nas plantas inoculadas, nas quais houve redução de 63,8%, em relação ao seu respectivo controle (Figura 4C). As reduções na abertura estomática pode inibir parcialmente a atividade fotossintética das plantas em ambiente salino, mas também protegem-nas dos efeitos da desidratação, o que induziria a ativação de moléculas sinalizadoras de estresse, com resultados adicionais de inibição no crescimento das plantas (MAGGIO *et al.*, 2002). Entretanto, os resultados indicam que a redução da g_s não foi suficiente para diminuir a fotossíntese e a transpiração, embora o crescimento tenha sido severamente afetado pela salinidade.

A relação C_i/C_a foi afetada pela salinidade em Pitiúba. As plantas não inoculadas submetidas à salinidade tiveram redução de 13,5% na C_i/C_a , em relação às plantas controle, enquanto que as plantas inoculadas apresentaram redução de apenas 7,9% (Figura 4D). Além disso, a inoculação com o rizóbio aumentou a relação C_i/C_a nas plantas de Pitiúba sob estresse salino (Figura 4D). Em TVu, a salinidade não afetou a C_i/C_a das plantas inoculadas, enquanto que, nas plantas não inoculadas, esse estresse causou uma redução de 6,8%, em relação ao seu controle (Figura 4D). O decréscimo na relação C_i/C_a deve-se ao fechamento estomático como uma resposta inicial do estresse salino, que acarreta redução da g_s . Entretanto, os baixos valores no decréscimo da relação C_i/C_a não acompanharam as elevadas reduções da g_s observadas neste trabalho.

Não foi observada qualquer diferença significativa em relação ao rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m) entre as plantas controle e estressadas, de ambos os cultivares (Figura 5A). O declínio da relação F_v/F_m é um bom indicador do dano ao aparato fotossintético quando plantas estão sujeitas a estresses ambientais, incluindo frio (BAKER; EAST; LONG, 1983) e estresse hídrico (ÖGREN; ÖQUIST, 1985). Portes e Magalhães (1993), trabalhando com 12 genótipos de feijão submetidos a estresse salino, não observaram diferenças significativas para a atividade fotoquímica das plantas. Entretanto, espécies como sorgo, cevada e tomate apresentam redução em F_v/F_m quando submetidas à salinidade (SHARMA; HALL, 1991; ZRIBI *et al.*, 2009).

Não houve efeito do estresse salino na fluorescência inicial (F_0) e na fluorescência máxima (F_m) em ambos os cultivares (Figura 5B e 5C). Um aumento na F_0 pode ser devido a danos no centro de reação do PSII ou à redução da capacidade de transferência da energia de

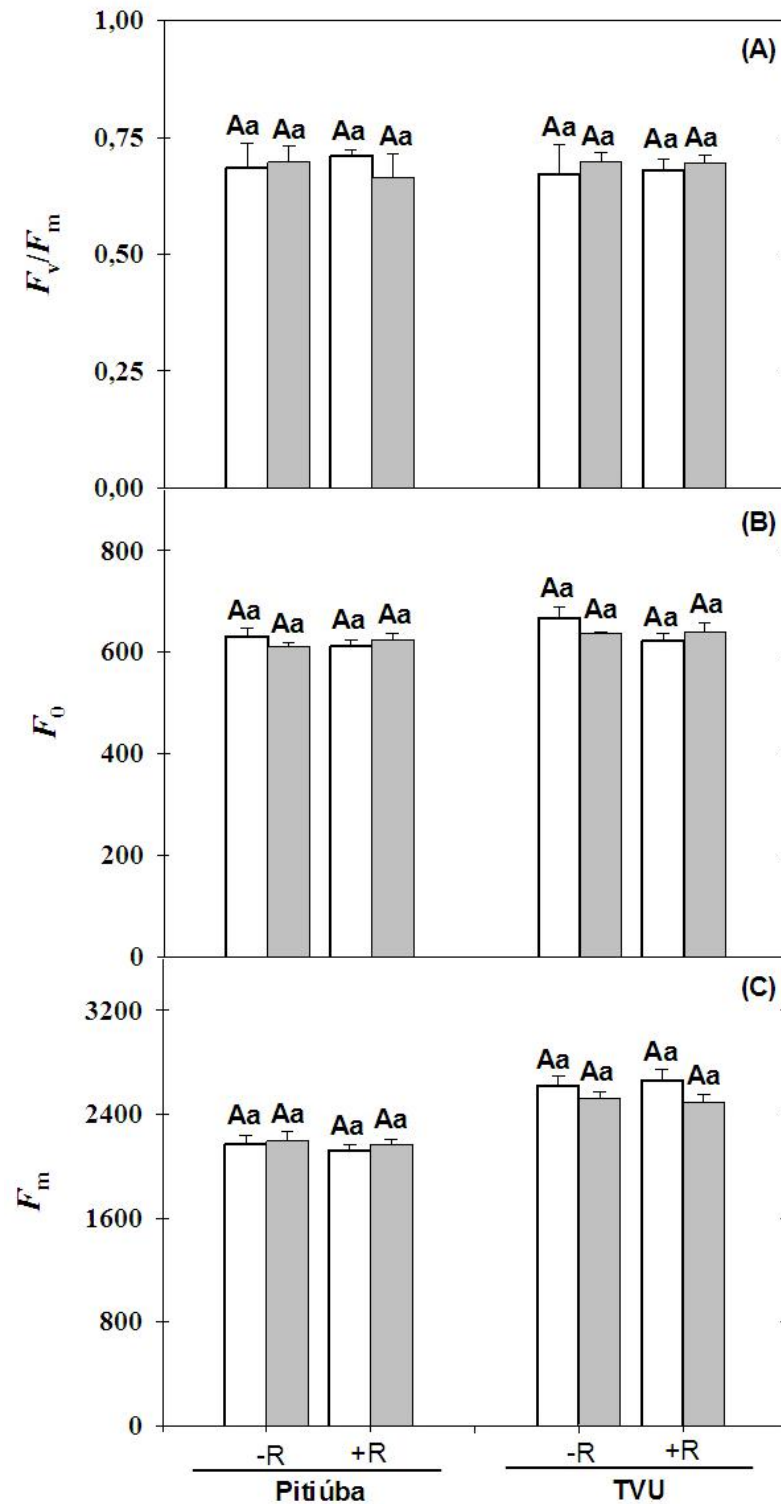


Figura 5 – Relação entre a fluorescência variável e máxima (F_v/F_m , A), fluorescência inicial (F_0 , B) e fluorescência máxima (F_m , C) de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVU (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* (+R), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 (□) e 75 mM (■). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas, dentro de cada tratamento de inoculação, ou seguidas das mesmas letras minúsculas, nos mesmos tratamentos salinos, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). As barras representam o erro da média.

excitação do complexo antena para o centro de reação (BAKER; HARBINSON; KRAMER, 2008). Esses resultados corroboram os dados de Praxedes (2008) sobre a fluorescência da clorofila *a* nos cultivares Pitiúba e TVu, que não observou nenhuma mudança significativa nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, indicando que a função do aparelho fotossintético não é afetada pelo estresse salino.

4.4. Teor relativo de água

O teor relativo de água (TRA) sofreu influência do estresse salino e da inoculação de maneira semelhante nos dois cultivares. As plantas estressadas e não inoculadas tiveram seu TRA reduzido em relação às plantas controle não inoculadas, enquanto que as plantas estressadas e inoculadas atingiram um TRA equivalente às plantas não estressadas, indicando que a inoculação alterou o status hídrico dessas plantas (Figura 6). Geralmente as plantas apresentam redução nos valores de TRA quando submetidas à salinidade (GADALLAH, 1999; SAIRAM; SRIVASTAVA, 2002).

4.5. Teor relativo de clorofila

A salinidade aumentou o teor relativo de clorofila (índice SPAD) nos dois cultivares de feijão de corda (Figura 7). Em Pitiúba, esse aumento foi de 54%, nas plantas não inoculadas, e de apenas 14%, nas plantas inoculadas. Além disso, nas plantas sob condições controle, a inoculação aumentou o índice SPAD, entretanto, nas plantas sob estresse salino, houve uma redução desse índice, em função da inoculação com o rizóbio (Figura 7). Em TVu, o índice SPAD não foi afetado pela inoculação, sendo aumentado em 43%, em média, em decorrência do estresse salino (Figura 7). Resultados semelhantes foram relatados por Lima *et al.* (2004), em estudos com arroz. Praxedes (2008) também observou aumentos nos teores de clorofila nas plantas do cultivar Pitiúba submetidas à salinidade, entretanto, as plantas de TVu nessas mesmas condições não apresentaram alterações significativas nessa variável, quando comparadas com as plantas controle.

4.6. Teores de sódio, cloreto e potássio

Os teores de Na^+ foram aumentados consideravelmente pela salinidade tanto na parte aérea como nas raízes das plantas dos dois cultivares (Figura 8). Além disso, não houve

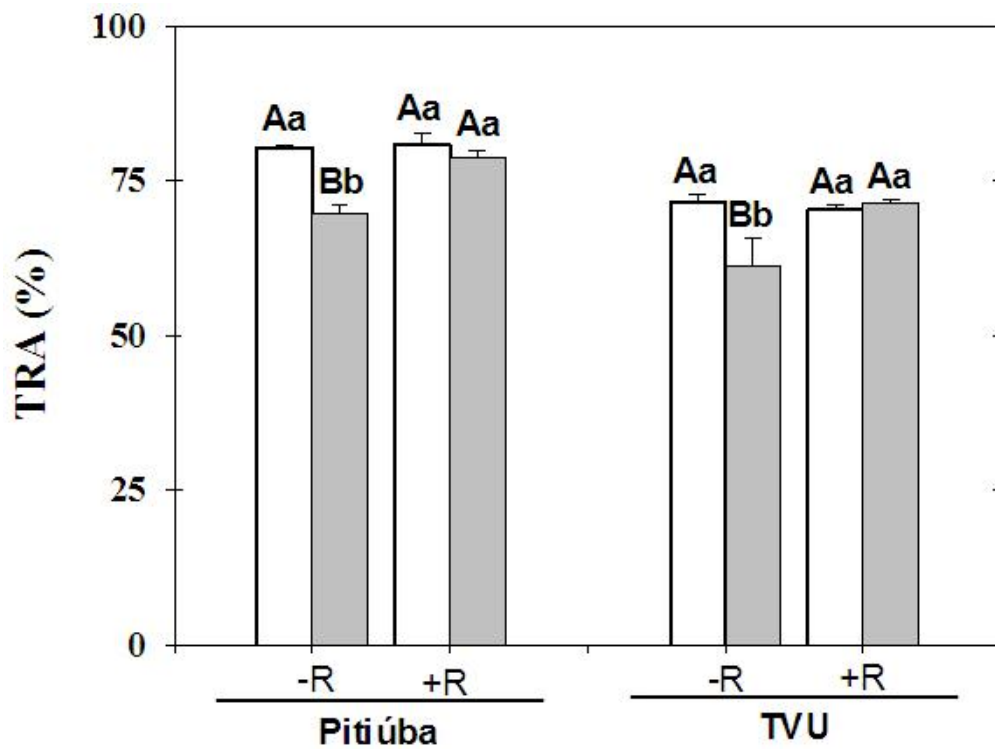


Figura 6 – Teor relativo de água (TRA) de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* (+R), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 (□) e 75 mM (■). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas, dentro de cada tratamento de inoculação, ou seguidas das mesmas letras minúsculas nos mesmos tratamentos salinos não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). As barras representam o erro da média.

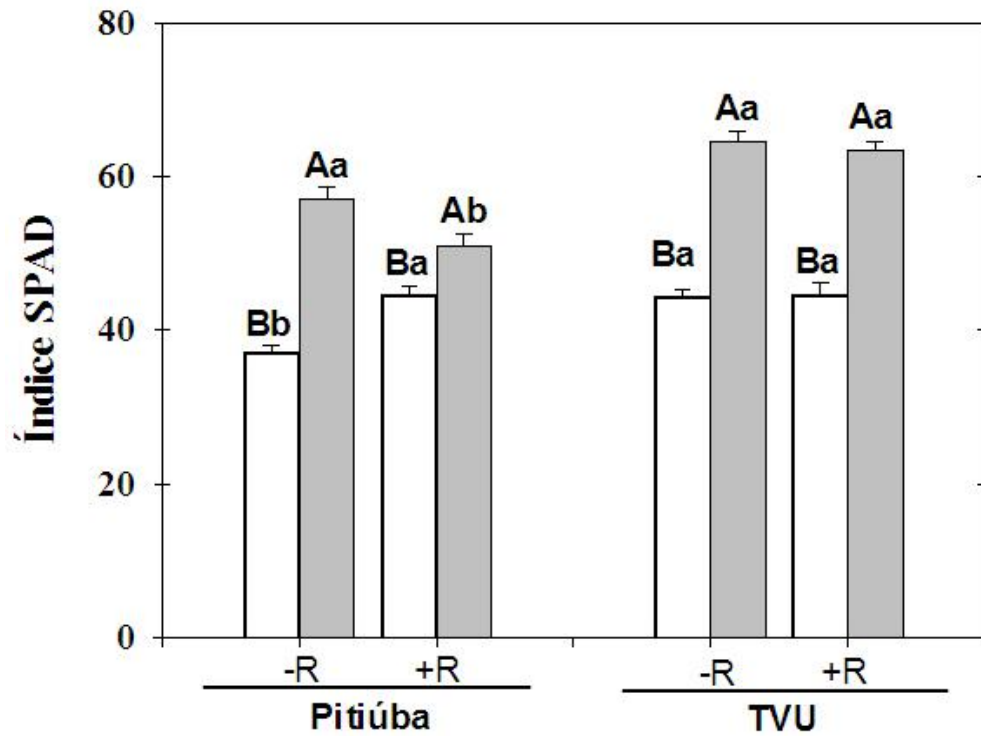


Figura 7 – Teor relativo de clorofila (índice SPAD) de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* (+R), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 (□) e 75 mM (■). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas, dentro de cada tratamento de inoculação, ou seguidas das mesmas letras minúsculas, nos mesmos tratamentos salinos, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). As barras representam o erro da média.

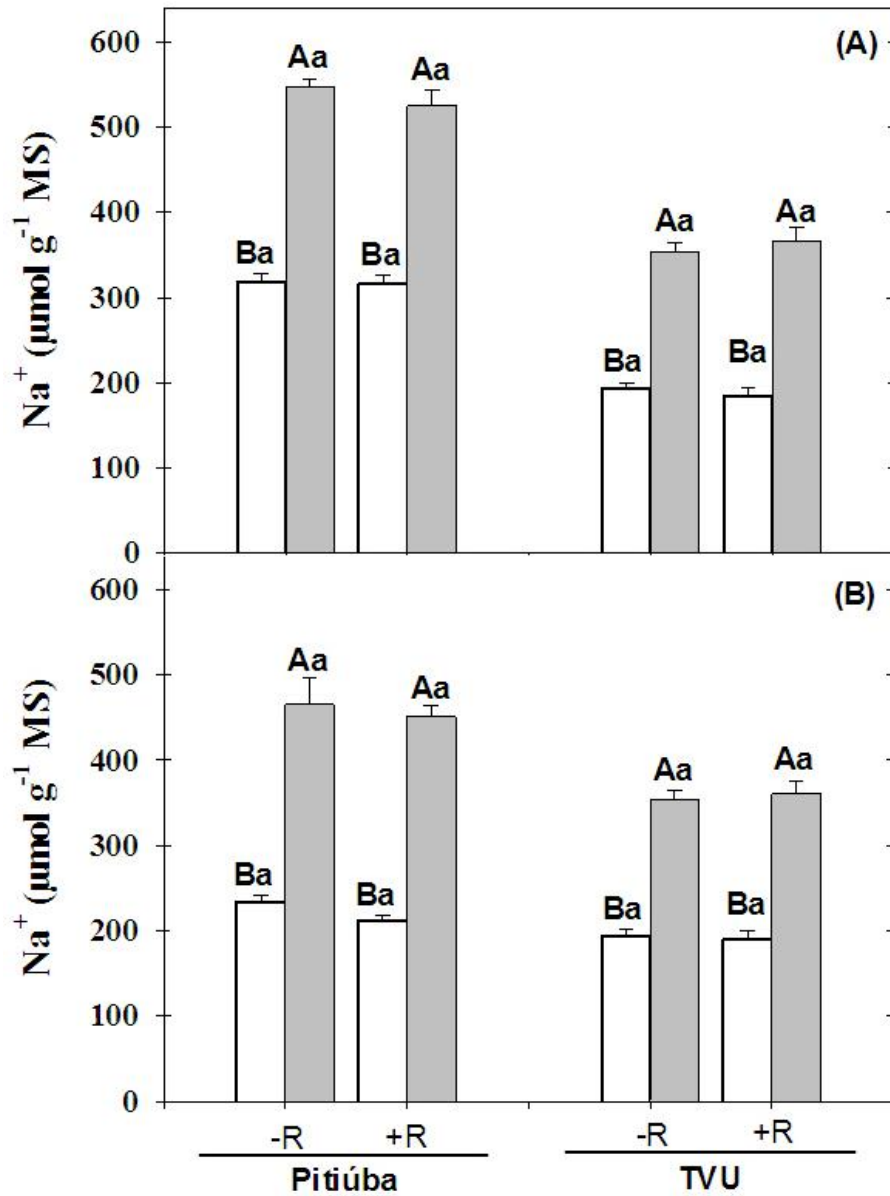


Figura 8 – Teores de Na⁺ na parte aérea (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* (+R), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 (□) e 75 mM (■). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas, dentro de cada tratamento de inoculação, ou seguidas das mesmas letras minúsculas nos mesmos tratamentos salinos não diferem significativamente entre si (p > 0,05). As barras representam o erro da média.

interação significativa entre a salinidade e a inoculação das plantas com o rizóbio, em ambos os cultivares. Em Pitiúba, os teores de Na^+ das plantas sob estresse aumentaram 68%, em média, na parte aérea, e 110%, em média, nas raízes, enquanto que, em TVu, houve um aumento de 91% nos teores de Na^+ da parte aérea e de 85%, no das raízes (Figura 8). Isso mostra que o cultivar Pitiúba foi mais eficiente que o TVu em acumular Na^+ preferencialmente nas raízes, evitando assim o acúmulo excessivo desse íon tóxico na parte aérea das plantas.

Os teores de Cl^- na parte aérea e nas raízes também aumentaram nas plantas estressadas de ambos os cultivares, e essa variável, semelhantemente aos teores de Na^+ , não foi influenciada pela inoculação das plantas (Figura 9). De modo geral, houve um maior acúmulo de Cl^- na parte aérea (aumento médio de 193%, em Pitiúba, e 148%, em TVu) que nas raízes (aumento médio de 86%, em Pitiúba, e 127%, em TVu) das plantas sob estresse salino (Figura 9). Os resultados obtidos sugerem não ter havido mecanismos de exclusão do íon Cl^- após o processo de absorção, resultando em maior acúmulo dele na parte aérea, que possivelmente contribuiu, juntamente como o sódio, para as reduções na MS e na área foliar das plantas, nas condições de estresse salino.

Os teores de K^+ foram influenciados tanto pela salinidade quanto pela inoculação com o rizóbio, em ambas as partes das plantas. De modo geral, a salinidade reduziu os teores de K^+ tanto na parte aérea como nas raízes, em comparação aos seus respectivos controles (Figura 10). Entretanto, nas plantas submetidas ao estresse salino, a inoculação com o rizóbio aumentou significativamente os teores de K^+ , em comparação às plantas estressadas não inoculadas (Figura 10). Os teores de K^+ podem ter sido reduzidos pelas altas concentrações de sódio nas plantas estressadas, já que existe um antagonismo entre esses dois íons, além da existência de sistemas de absorção existentes nas raízes com seletividades diferentes para Na^+ e K^+ (CHEN *et al.*, 2007; ZEPEDA-JAZO *et al.*, 2008).

Para suportar o estresse salino, as plantas têm mecanismos que contribuem para a adaptação aos estresses osmótico e iônico, e entre eles está o acúmulo de íons, sendo um processo que colabora no ajustamento osmótico. O ajustamento osmótico é o acúmulo intracelular de solutos osmoticamente ativos em resposta às condições estressantes de baixa disponibilidade de água e de alta salinidade, que contribui para a continuidade dos processos fisiológicos, ainda que o metabolismo celular possa ser alterado pelo excesso desses íons (YOKOI S.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, 2002; VERSLUES; BRAY, 2004).

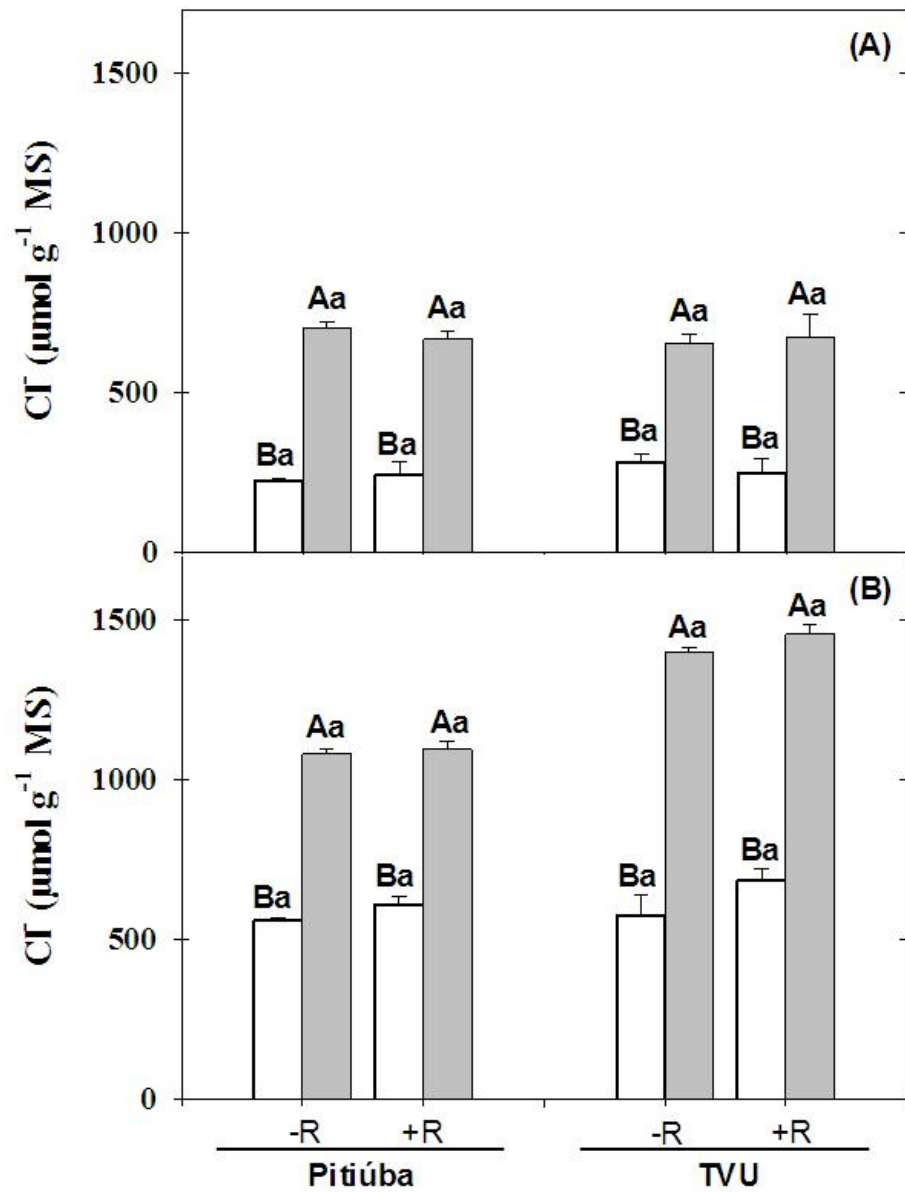


Figura 9 – Teores de Cl⁻ na parte aérea (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* (+R), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 (□) e 75 mM (■). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas, dentro de cada tratamento de inoculação, ou seguidas das mesmas letras minúsculas, nos mesmos tratamentos salinos, não diferem significativamente entre si (p > 0,05). As barras representam o erro da média.

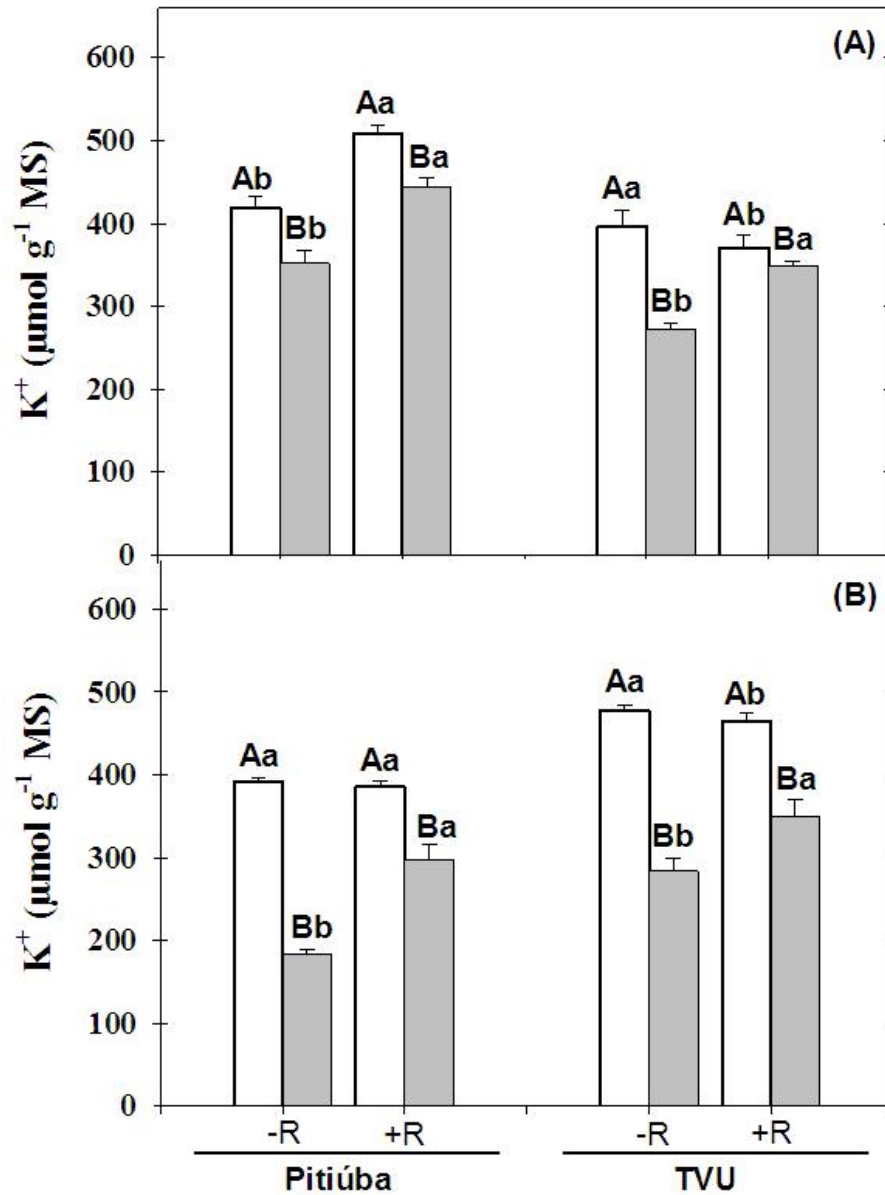


Figura 10 – Teores de K^+ na parte aérea (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVU (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* (+R), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 (□) e 75 mM (■). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas, dentro de cada tratamento de inoculação, ou seguidas das mesmas letras minúsculas, nos mesmos tratamentos salinos, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). As barras representam o erro da média.

4.7. Teores de nitrogênio total e de fósforo

Os teores de nitrogênio total (N-total) na parte aérea das plantas de Pitiúba foram reduzidos pela salinidade, e esse efeito ocorreu independentemente da inoculação das plantas, apesar de as plantas inoculadas terem apresentado maiores teores de N-total que as não inoculadas (Figura 11A). Em TVu, os teores de N-total na parte aérea foram reduzidos pela salinidade nas plantas não inoculadas, mas esse quadro foi revertido quando as plantas foram inoculadas com o rizóbio (Figura 11A). Nas raízes, a redução dos teores de N-total em Pitiúba, causada pela salinidade, também foi revertida pela inoculação com o rizóbio, mas em TVu não houve qualquer efeito benéfico da inoculação das plantas frente à salinidade (Figura 11B), embora as plantas inoculadas tenham apresentado maiores teores de N-total, independentemente do tratamento salino.

As espécies de rizóbio variam na sua resposta ao estresse salino. Estirpes de rizóbio de *Acacia*, *Prosopis* e *Leucaena* foram relatadas ser tolerantes à NaCl em concentrações variando de 500 a 850 mM (ZHANG *et al.*, 1991; ZAHNAN *et al.*, 1994; LAL; KHANNA, 1995). A tolerância de determinadas estirpes de rizóbio a estresses abióticos pode conferir às espécies hospedeiras de leguminosas maior capacidade de fixar nitrogênio nessas condições adversas. Embora a salinidade tenha diminuído o teor de N-total no presente estudo, a quantidade de nitrogênio nas plantas inoculadas foi mantida ao nível nutricional das plantas não inoculadas (controle). Contudo, apesar de os teores de N-total terem aumentados nas plantas inoculadas, esse efeito não foi suficiente para o desenvolvimento adequado das plantas submetidas ao estresse salino, como indica os resultados de matéria seca. Além disso, é provável que a nodulação ainda não pudesse proporcionar ganhos significativos de matéria seca nas plantas dos tratamentos salinos, certamente por terem transcorrido apenas 28 dias de inoculação até a data da coleta.

Os teores de fósforo (P) nas plantas de ambos os cultivares foram reduzidos pela salinidade, tanto na parte aérea como nas raízes, e apesar da inoculação com o rizóbio não ter influenciado o grau com que a salinidade afetou essa variável, ela acarretou um aumento significativo nos teores de P das plantas (Figura 12). Isso foi mais evidente em TVu, em cujas plantas inoculadas houve um aumento médio de 193% e 98%, nos teores de P da parte aérea e das raízes, respectivamente, em comparação às plantas não inoculadas (Figura 12). Gaing e Gaur (1991) relataram que em *Vigna radiata*, houve aumento na produção de grãos e na absorção de fósforo e nitrogênio devido à inoculação com uma estirpe de *Bacillus subtilis*,

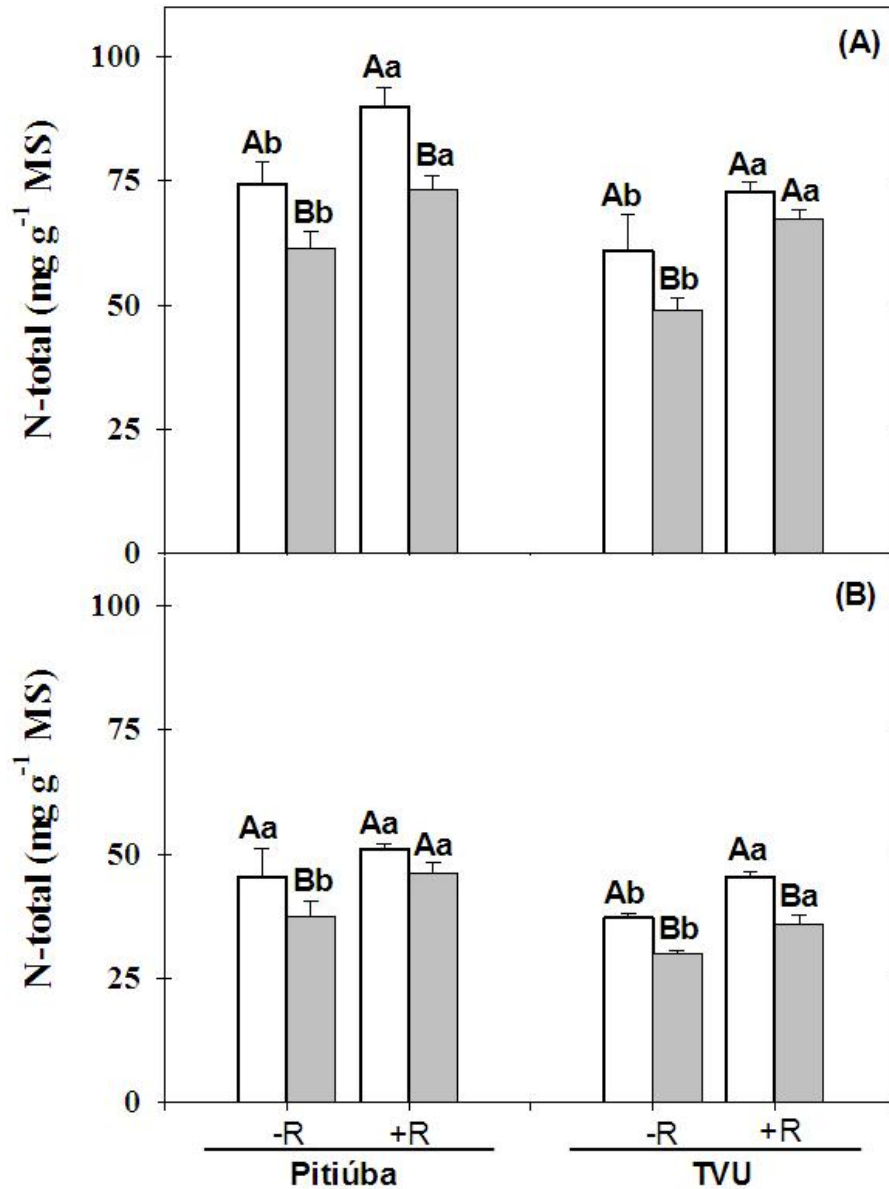


Figura 11 – Teores de N-total na parte aérea (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVU (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* (+R), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 (□) e 75 mM (■). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas, dentro de cada tratamento de inoculação, ou seguidas das mesmas letras minúsculas, nos mesmos tratamentos salinos, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). As barras representam o erro da média.

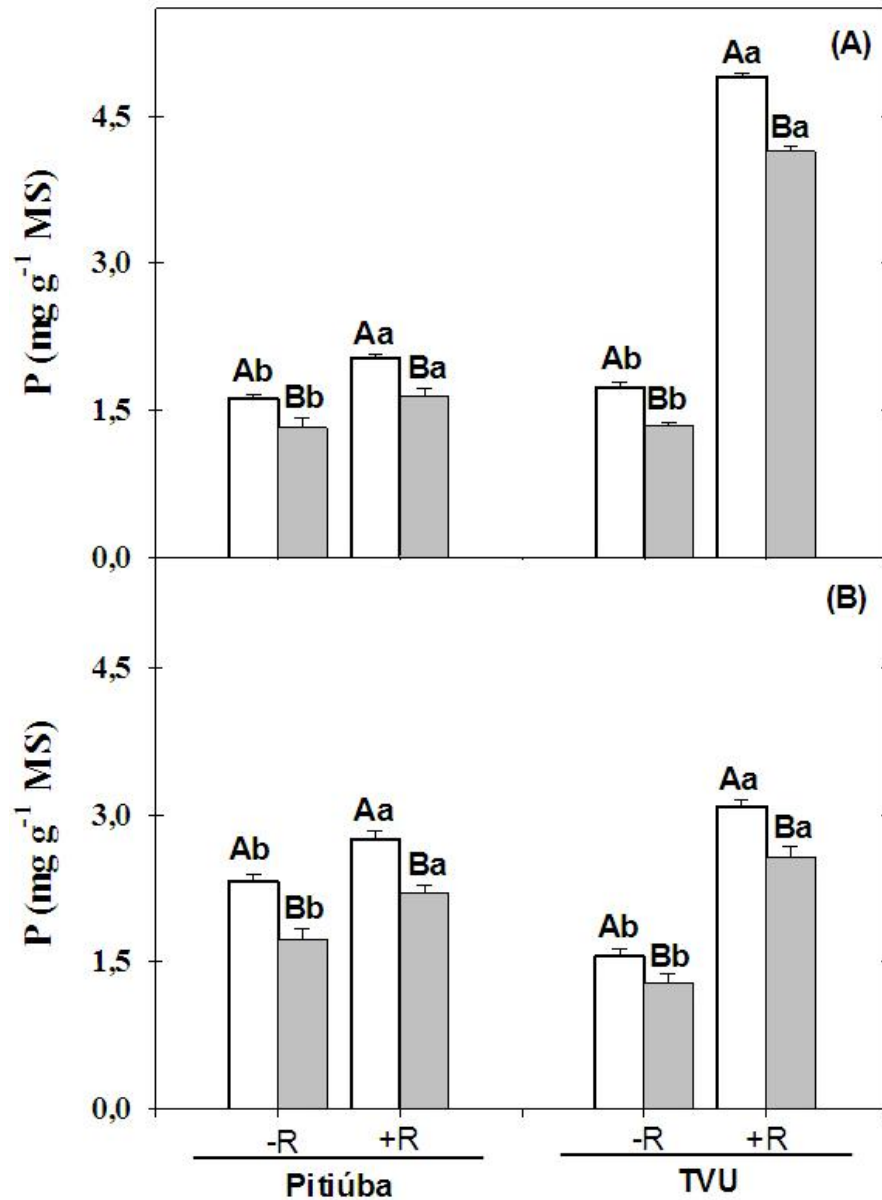


Figura 12 – Teores de fósforo na parte aérea (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVU (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* (+R), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 (□) e 75 mM (■). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas, dentro de cada tratamento de inoculação, ou seguidas das mesmas letras minúsculas, nos mesmos tratamentos salinos, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). As barras representam o erro da média.

indicando a capacidade de certas rizobactérias em solubilizar e facilitar a absorção de compostos fosfatados pelas raízes.

4.8. Solutos orgânicos

Os teores de solutos orgânicos foram alterados significativamente pela salinidade, e esse efeito dependeu das plantas de feijão de corda terem sido inoculadas ou não com o rizóbio. Em Pitiúba, houve alterações significativas nos teores de carboidratos solúveis somente na parte aérea das plantas, em que a inoculação foi capaz de reverter a redução causada pela salinidade nos teores de carboidratos solúveis (Figura 13). Em TVu, não houve qualquer alteração significativa nos teores de carboidratos solúveis da parte aérea (Figura 13A), mas nas raízes das plantas sob estresse, essa variável foi significativamente aumentada em razão da inoculação com o rizóbio (Figura 13B).

Os teores de N-aminossolúveis foram aumentados pela salinidade em todas as partes das plantas de Pitiúba e TVu, em comparação aos seus respectivos controles (Figura 14). No entanto, na parte aérea de Pitiúba e nas raízes de TVu, esses aumentos foram intensificados pela inoculação com o rizóbio (Figura 14).

De modo geral, os teores de prolina foram influenciados tanto pela salinidade quanto pela inoculação com o rizóbio. Todas as partes das plantas dos dois cultivares apresentaram teores de prolina aumentados quando submetidas a estresse salino, exceto nas raízes das plantas não inoculadas de Pitiúba. Além disso, a inoculação aumentou os teores de prolina da parte aérea de ambos os cultivares, mas nas raízes essa resposta dependeu do nível de salinidade imposto às plantas (Figura 15).

Em muitas halófitas, os solutos orgânicos compatíveis, como prolina e carboidratos, podem ocorrer em concentrações suficientemente elevadas nas folhas, contribuindo para a pressão osmótica nas células (FLOWERS; TROKE; YEO, 1977). Em glicófitas, entretanto, o acúmulo de solutos compatíveis não é tão elevado, mas pode gerar uma pressão osmótica significativa e funcionar como osmólitos. Em baixas concentrações, estes solutos provavelmente têm papel na estabilização da estrutura terciária de proteínas, funcionando como osmoprotetores (RHODES; NADOLSKA-ORCZYK; RICH, 2004). A síntese de solutos compatíveis tem um alto custo energético e, portanto, envolve prejuízo no crescimento, mas também pode permitir a sobrevivência de plantas em ambientes com elevadas concentrações de sais.

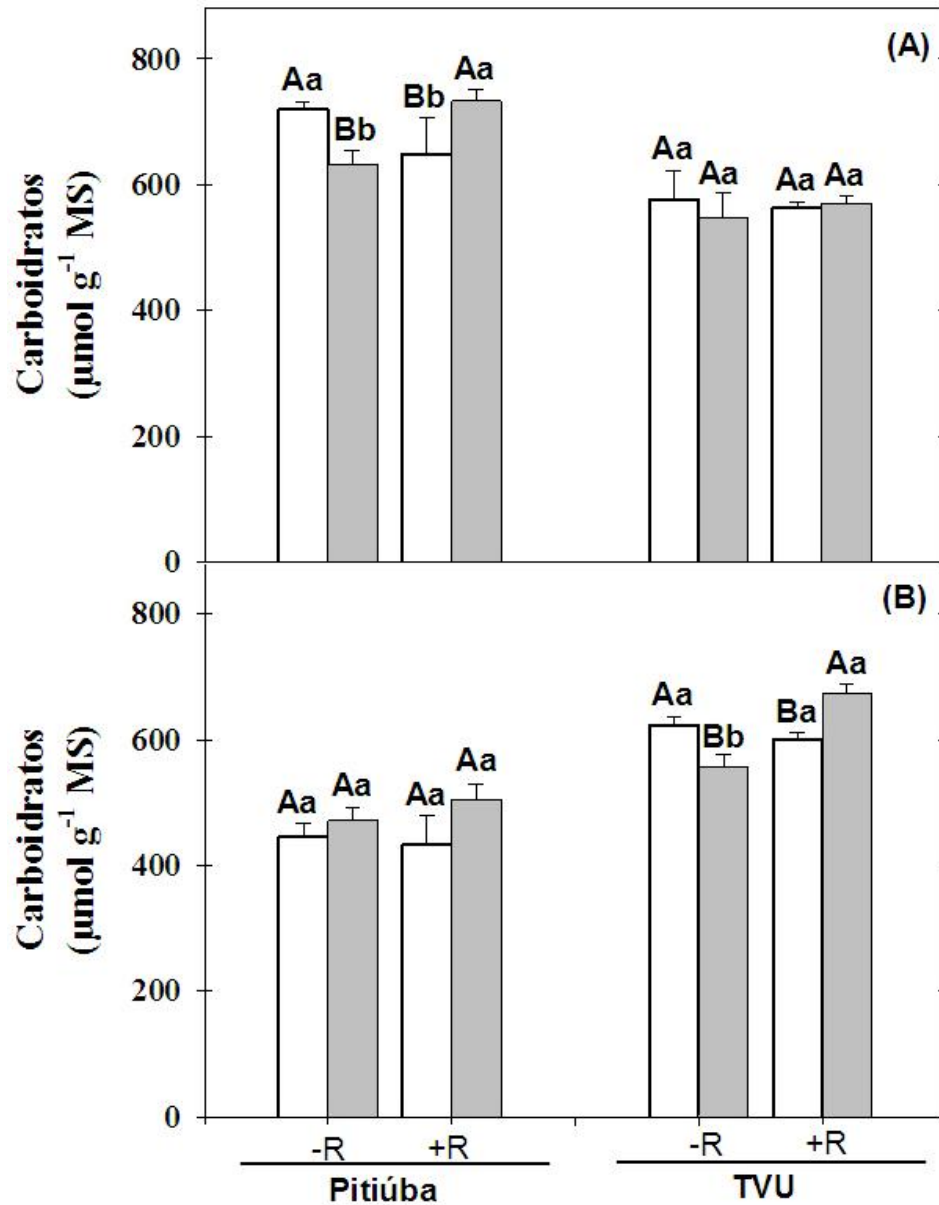


Figura 13 – Teores de carboidratos na parte aérea (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVU (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* (+R), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 (□) e 75 mM (■). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas, dentro de cada tratamento de inoculação, ou seguidas das mesmas letras minúsculas, nos mesmos tratamentos salinos, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). As barras representam o erro da média.

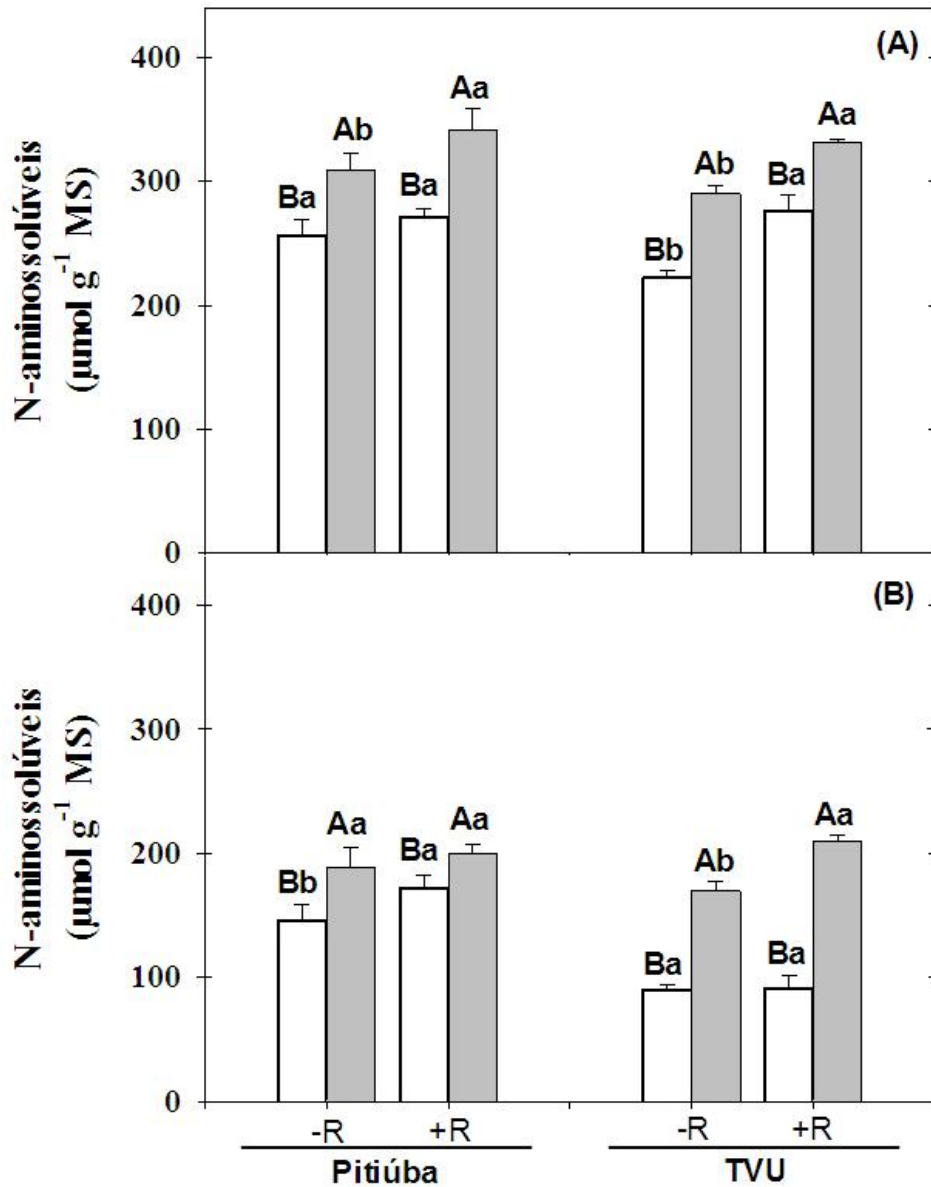


Figura 14 – Teores de N-aminossolúveis na parte aérea (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* (+R), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 (□) e 75 mM (■). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas, dentro de cada tratamento de inoculação, ou seguidas das mesmas letras minúsculas, nos mesmos tratamentos salinos, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). As barras representam o erro da média.

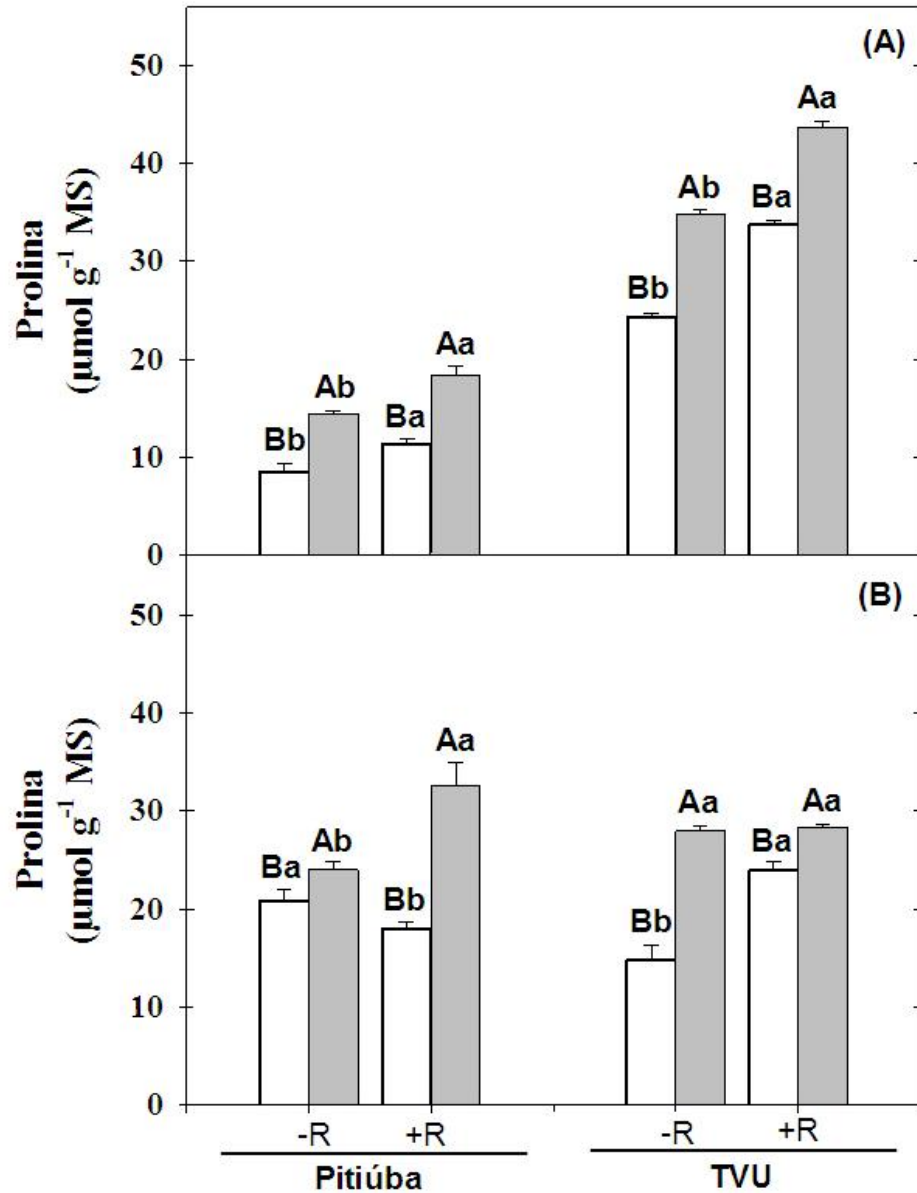


Figura 15 – Teores de prolina na parte aérea (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVU (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* (+R), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 (□) e 75 mM (■). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas, dentro de cada tratamento de inoculação, ou seguidas das mesmas letras minúsculas, nos mesmos tratamentos salinos, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). As barras representam o erro da média.

4.9. Teores de proteínas solúveis

A salinidade afetou os teores de proteínas solúveis em todas as partes das plantas estudadas, reduzindo essa variável em todos os cultivares, exceto na parte aérea das plantas de Pitiúba e TVu, em que a inoculação com o rizóbio reverteu esse efeito, resultando em teores de proteínas equivalentes àqueles das condições controle (Figura 16). De modo geral, a inoculação promoveu o aumento dos teores de proteínas solúveis em todas as partes das plantas submetidas à salinidade, em ambos os cultivares, em comparação com as plantas não inoculadas e sob estresse (Figura 16).

A síntese de proteínas geralmente diminui em condições de estresse salino, uma vez que o excesso de sais prejudica a síntese proteica, aumenta a proteólise e as células passam a sintetizar proteínas específicas sob condições de estresse (SILVEIRA *et al.*, 2003). Vários genes codificam enzimas envolvidas na síntese de solutos compatíveis e na proteção contra danos oxidativos ou codificam proteínas envolvidas no transporte de íons tóxicos para os vacúolos, aumentando assim os teores de proteínas totais em determinados casos (MANSOUR, 2000; PARIDA; DAS, 2005).

4.10. Peroxidação de lipídios

O malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica, tem sido considerado indicador de danos oxidativos às células. Nas plantas não inoculadas de ambos os cultivares, os teores de MDA aumentaram em função da salinidade, em todas as partes das plantas, quando comparados com os seus respectivos controles (Figura 17). A inoculação com o rizóbio, por sua vez, reduziu os teores de MDA em todas as partes das plantas sob estresse, em ambos os cultivares, em comparação com as plantas não inoculadas (Figura 17). Plantas de feijão de corda normalmente apresentam níveis elevados de MDA sob estresse salino, e isso invariavelmente está relacionado à inibição da atividade das enzimas do sistema antioxidativo (ABOGADALLAH, 2010). Porém, no presente trabalho, a inoculação reduziu os níveis de MDA nas plantas sob estresse devido ao aumento da atividade de algumas enzimas antioxidativas.

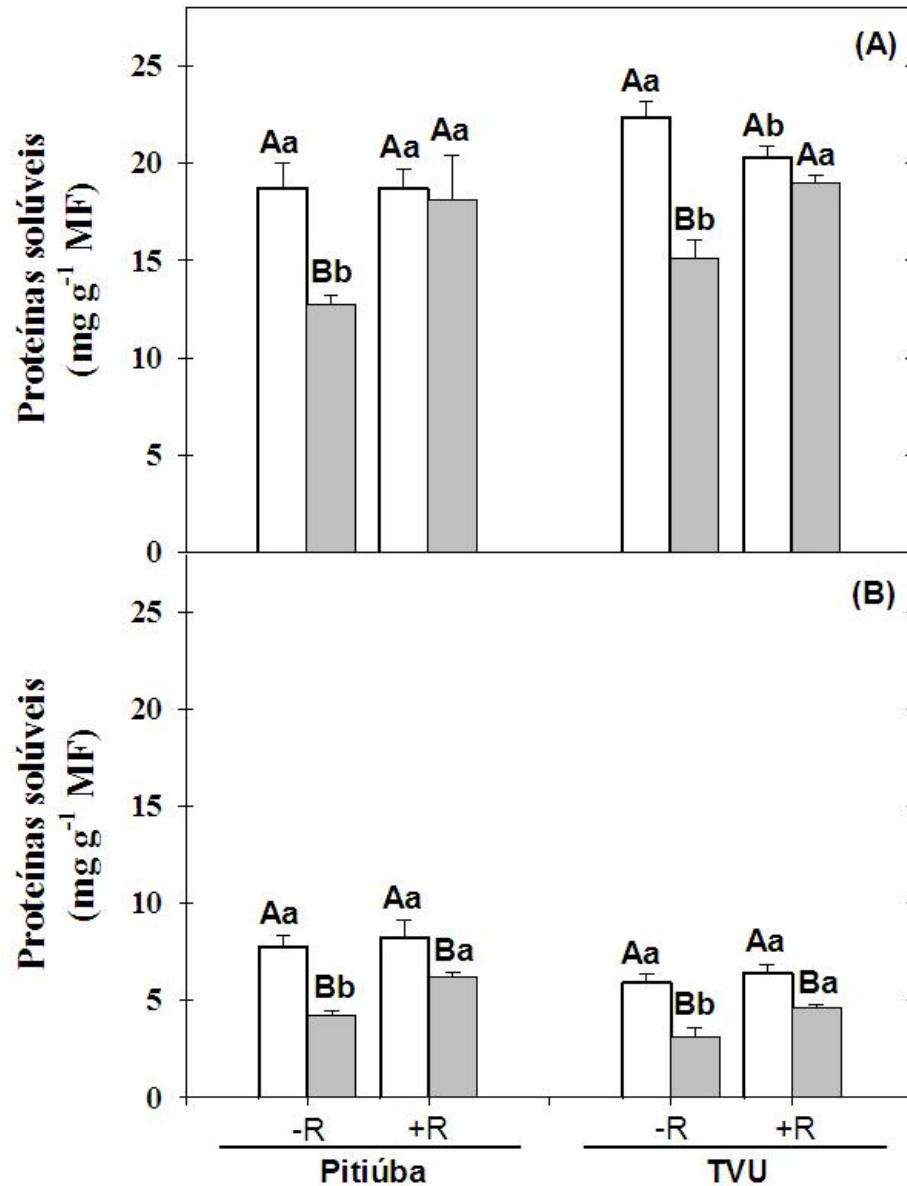


Figura 16 – Teores de proteínas solúveis na parte aérea (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVU (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* (+R), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 (□) e 75 mM (■). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas, dentro de cada tratamento de inoculação, ou seguidas das mesmas letras minúsculas nos mesmos tratamentos salinos não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). As barras representam o erro da média.

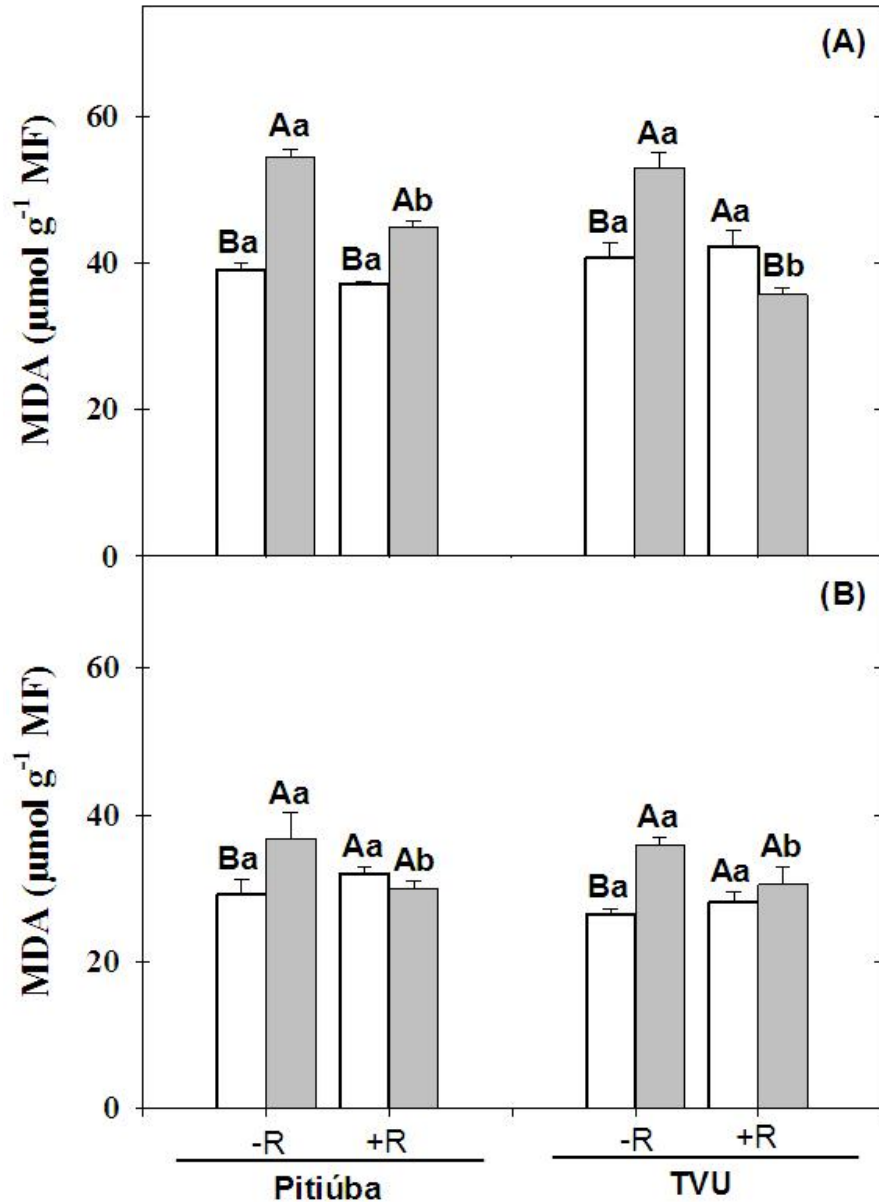


Figura 17 – Teores de malondialdeído (MDA) na parte aérea (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* (+R), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 (□) e 75 mM (■). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas, dentro de cada tratamento de inoculação, ou seguidas das mesmas letras minúsculas, nos mesmos tratamentos salinos, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). As barras representam o erro da média.

4.11. Enzimas do sistema antioxidativo

A salinidade induz o estresse oxidativo, levando à formação das espécies reativas de oxigênio (ROS). Com isso é ativado um sistema de eliminação das ROS por meio enzimático.

A atividade da CAT não apresentou diferença significativa, seja em razão da salinidade, seja da inoculação com o rizóbio (Figura 18). De maneira geral, as atividades das enzimas APX e GPX, na parte aérea e da SOD, APX e GPX, nas raízes, sofreram influência do estresse salino e da inoculação, em ambos os cultivares (Figuras 19, 20 e 21).

Na parte aérea das plantas de ambos os cultivares, a atividade da SOD não foi afetada pela salinidade, nem pela inoculação com o rizóbio (Figura 19A). Já nas raízes, o estresse salino aumentou significativamente a atividade da SOD, em ambos os cultivares, mas apenas em Pitiúba é que a inoculação intensificou esse aumento (Figura 19B).

A salinidade levou ao aumento da atividade da APX e da GPX, tanto na parte aérea como nas raízes das plantas de Pitiúba e TVu, quando comparada com seus controles (Figuras 20 e 21). Além disso, nas condições de salinidade, houve diferença significativa na atividade da APX e da GPX entre as plantas não inoculadas e inoculadas, em ambos os cultivares, sendo que estas últimas apresentaram maior atividade dessas enzimas que as primeiras (Figuras 20 e 21). Estes resultados, aliados aos dados da peroxidação de lipídios, indicam que os danos oxidativos induzidos pela salinidade foram minimizados pela inoculação das plantas com o rizóbio. A alta atividade antioxidante pode ser interpretada como maior tolerância ao estresse oxidativo. Um sistema de defesa antioxidativa eficiente é alcançado através da regulação positiva das enzimas antioxidantes, embora cada uma delas tenha uma função específica na eliminação das ROS (ABOGADALLAH, 2010).

4.12. Metabolismo do nitrogênio nos nódulos

O desenvolvimento das plantas tem relação com o suprimento de nitrogênio, principalmente porque esse nutriente atua como constituinte da clorofila, ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Verificou-se neste trabalho que o estresse salino afetou de maneira significativa o metabolismo do nitrogênio nos nódulos.

A fixação do nitrogênio está diretamente relacionada à concentração de leghemoglobina nos nódulos (REIS *et al.*, 2006), visto que essa proteína inibe os efeitos causados pelo O₂ na atividade da nitrogenase. A Figura 22 apresenta o efeito do estresse salino nos teores de leghemoglobina nos nódulos dos cultivares Pitiúba e TVu. Em Pitiúba, o

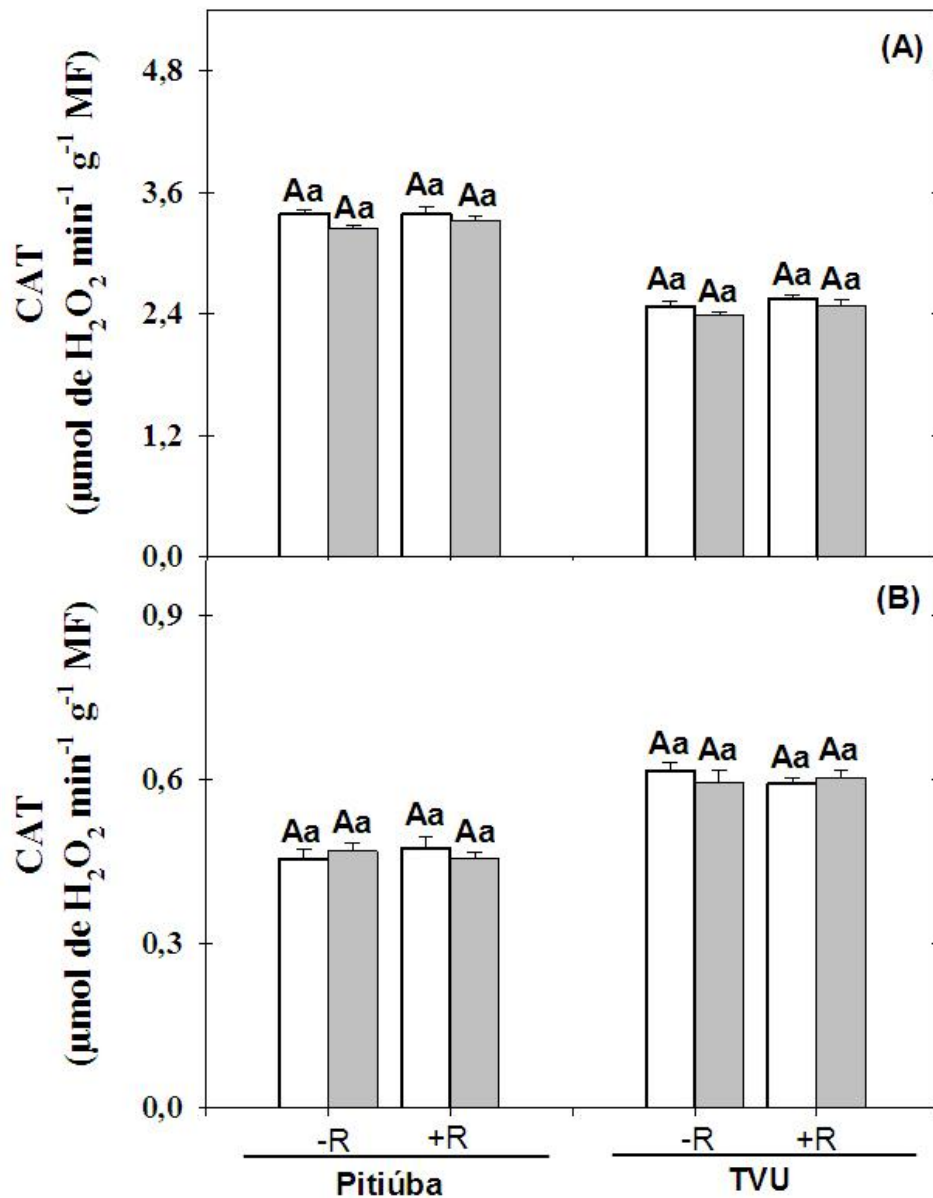


Figura 18 – Atividade da catalase (CAT) na parte aérea (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* (+R), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 \square) e 75 mM \blacksquare). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas, dentro de cada tratamento de inoculação, ou seguidas das mesmas letras minúsculas, nos mesmos tratamentos salinos, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). As barras representam o erro da média.

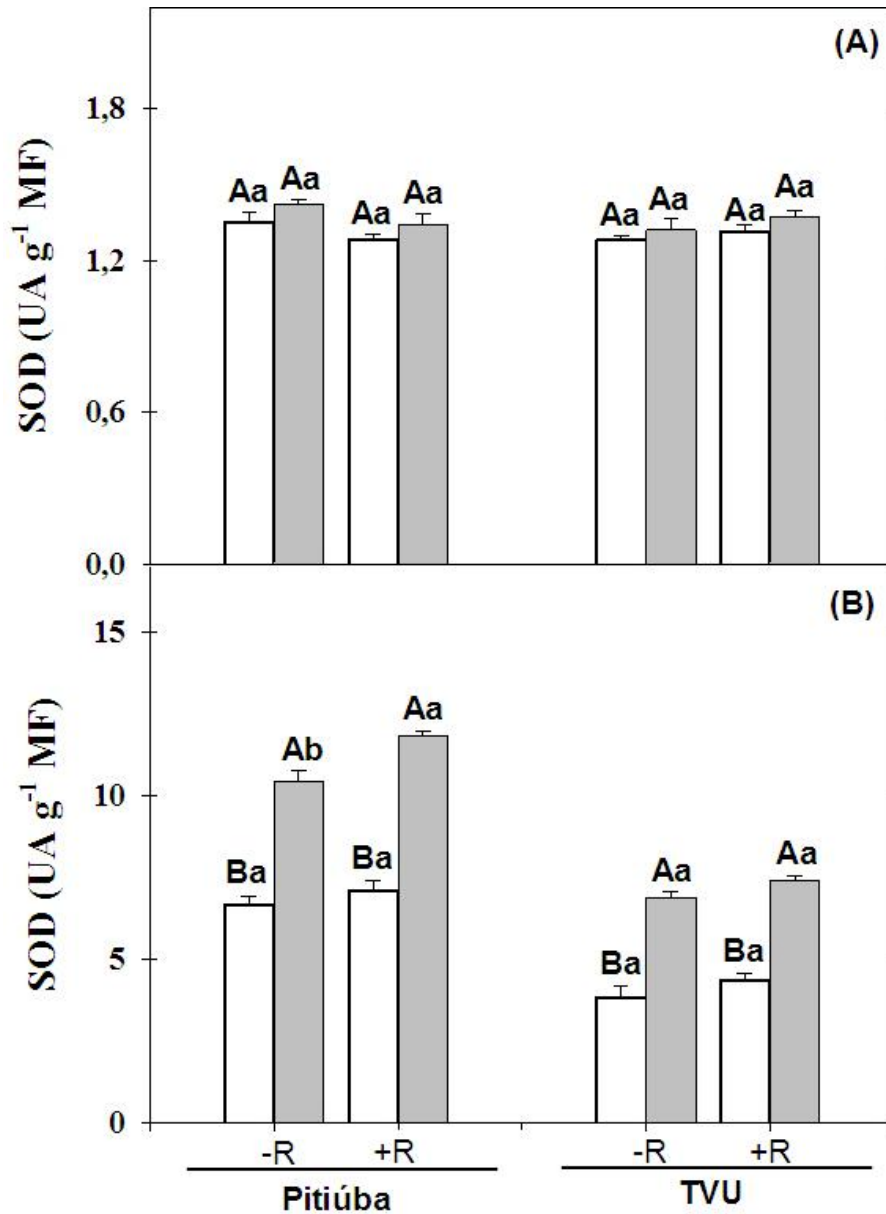


Figura 19 – Atividade da dismutase do superóxido (SOD) na parte aérea (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* (+R), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 (□) e 75 mM (■). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas, dentro de cada tratamento de inoculação, ou seguidas das mesmas letras minúsculas, nos mesmos tratamentos salinos, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). As barras representam o erro da média.

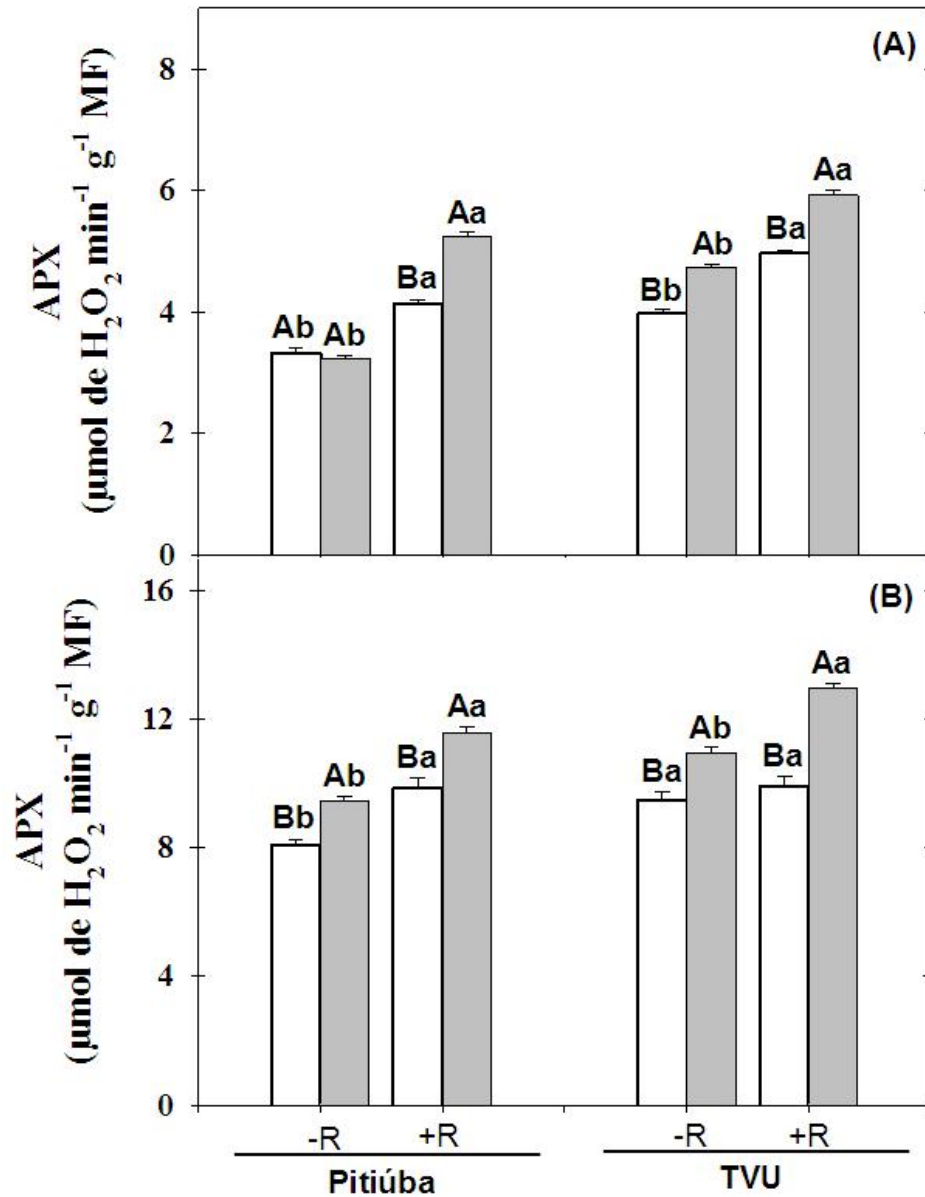


Figura 20 – Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) na parte aérea (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* (+R), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 (□) e 75 mM (■). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas, dentro de cada tratamento de inoculação, ou seguidas das mesmas letras minúsculas, nos mesmos tratamentos salinos, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). As barras representam o erro da média.

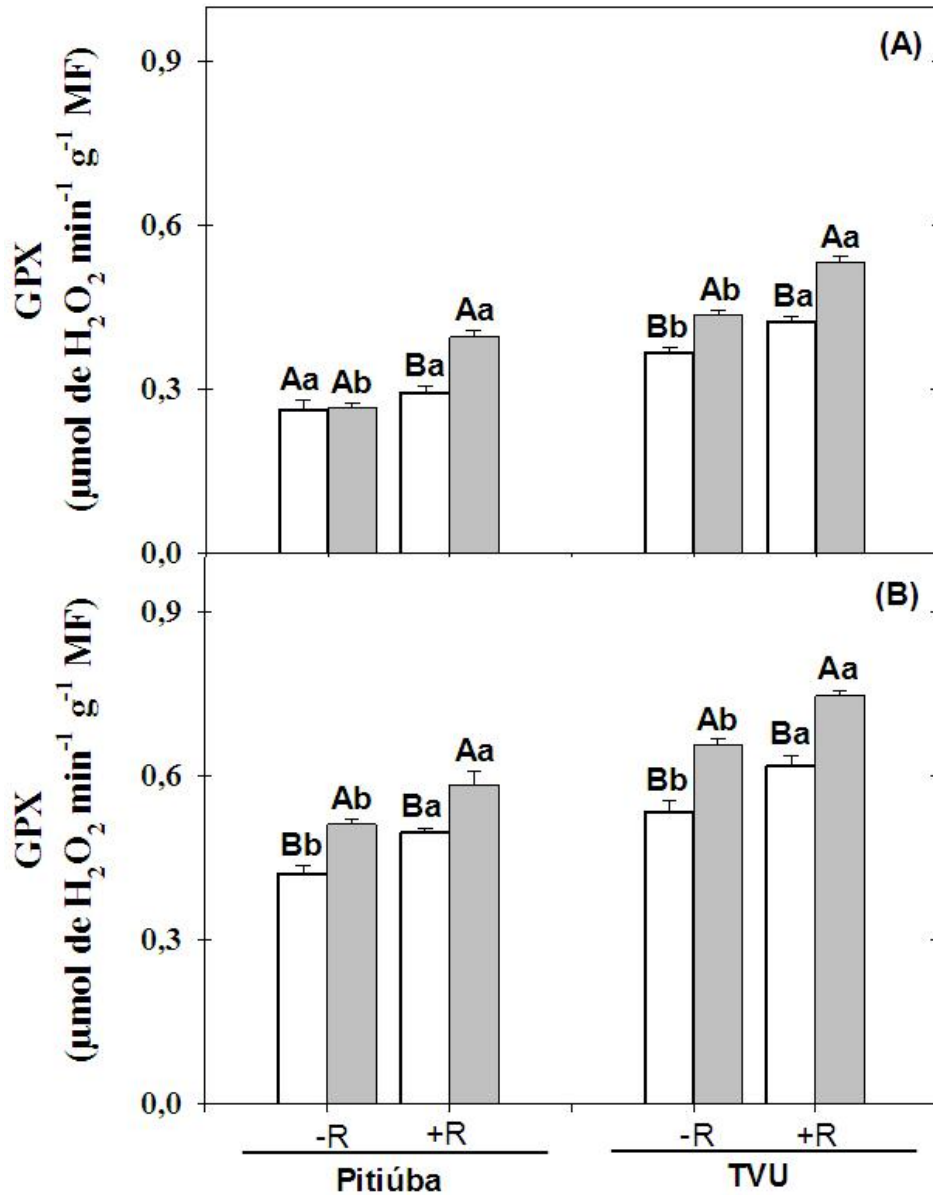


Figura 21 – Atividade da peroxidase do guaiacol (GPX) na parte aérea (A) e nas raízes (B) de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVU (sensível à salinidade), não inoculadas (-R) e inoculadas com a estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* (+R), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 (□) e 75 mM (■). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas, dentro de cada tratamento de inoculação, ou seguidas das mesmas letras minúsculas, nos mesmos tratamentos salinos, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). As barras representam o erro da média.

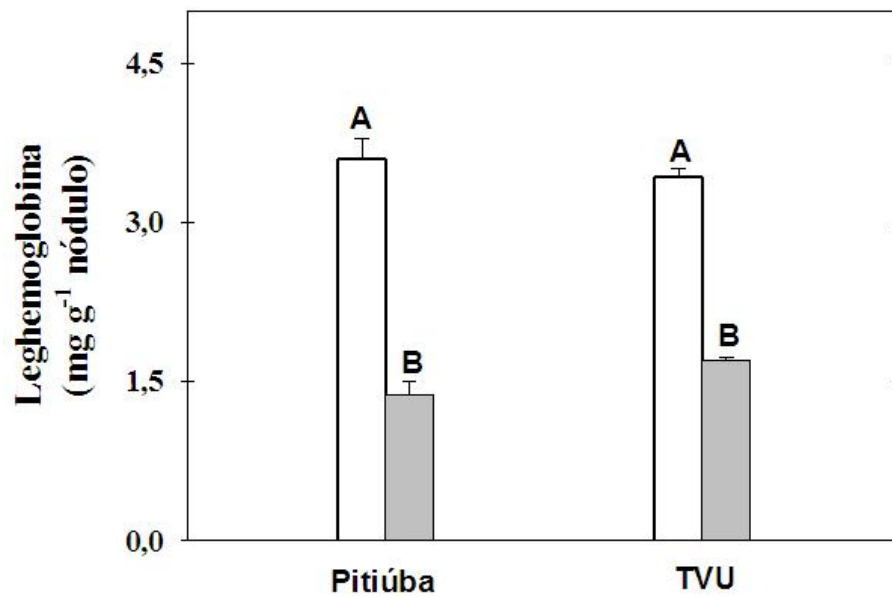


Figura 22 – Teores de leghemoglobina nos nódulos de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 (□) e 75 mM (■). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). As barras representam o erro da média.

estresse salino reduziu os teores de leghemoglobina em 61%, em relação às plantas controle. Já em TVu, houve uma redução de 50% nos teores de leghemoglobina, em comparação aos nódulos das plantas controle. Portanto, pode-se inferir que a fixação biológica do nitrogênio foi afetada pela salinidade em ambos os cultivares. De modo semelhante, López *et al.* (2008) relataram reduções dos níveis de leghemoglobina e na fixação do nitrogênio nos nódulos das plantas de *Lotus japonicus* e *Medicago truncatula* sob estresse salino.

O NH_4^+ formado na fixação do nitrogênio é retirado dos bacteroides, atingindo o citoplasma da célula vegetal, onde é assimilado em moléculas que não possuem efeito tóxico. A sintetase da glutamina (GS) catalisa a primeira reação de assimilação do NH_4^+ , convertendo glutamato em glutamina (SEGER *et al.*, 2009). A Figura 23 mostra a atividade da GS nos nódulos dos dois cultivares de feijão de corda sob condições de salinidade. Os nódulos apresentaram reduções de 23% e 33% na atividade da GS em Pitiúba e TVu, respectivamente, em função do estresse salino. Cordovilla, Ligeró e Lluch (1995) estudando o efeito do estresse salino em 15 cultivares de *Vicia faba* inoculados com *Rhizobium leguminosarum* (GRA 19), observaram reduções diferenciadas na atividade da GS, sendo que os cultivares mais tolerantes apresentaram menor redução na atividade da GS. Neste estudo, concordantemente, o cultivar Pitiúba foi o que apresentou a menor redução na atividade da GS, em função da salinidade.

4.13. Histologia dos nódulos

Os resultados indicam que não ocorreu qualquer alteração nas células vegetais que abrigam os bacteroides, em ambos os cultivares (Figura 24A e 24B; Figura 25A e 25B). Por outro lado, a salinidade alterou a quantidade de amido armazenado nos nódulos. Os resultados da coloração com azul de toluidina e fucsina indicam que não houve alteração morfológica nas células nodulares (Figuras 24A e 24B; 25A e 25B). Por outro lado, a coloração com lugol mostra que a salinidade alterou a quantidade de amido armazenado nos nódulos dos dois cultivares, mostrando que os nódulos apresentaram pouco ou nenhum amido quando submetidos ao estresse salino (Figuras 24C e 24D; 25C e 25D). Possivelmente, a carência de carboidratos no metabolismo bacteriano influenciou o seu desempenho bioquímico nas condições de salinidade, reduzindo, pelo menos em parte, os efeitos benéficos associados à sua simbiose com as plantas de feijão.

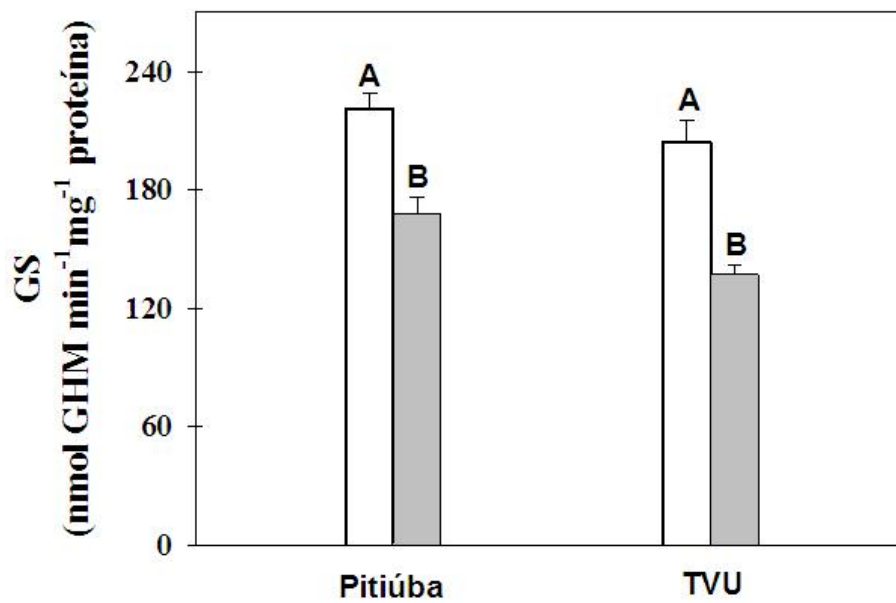


Figura 23 – Atividade da sintetase da glutamina (GS) nos nódulos de plantas de feijão de corda Pitiúba (tolerante à salinidade) e TVu (sensível à salinidade), e crescendo em meio contendo NaCl a 0 (□) e 75 mM (■). Para cada cultivar, as colunas seguidas das mesmas letras maiúsculas não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). As barras representam o erro da média.

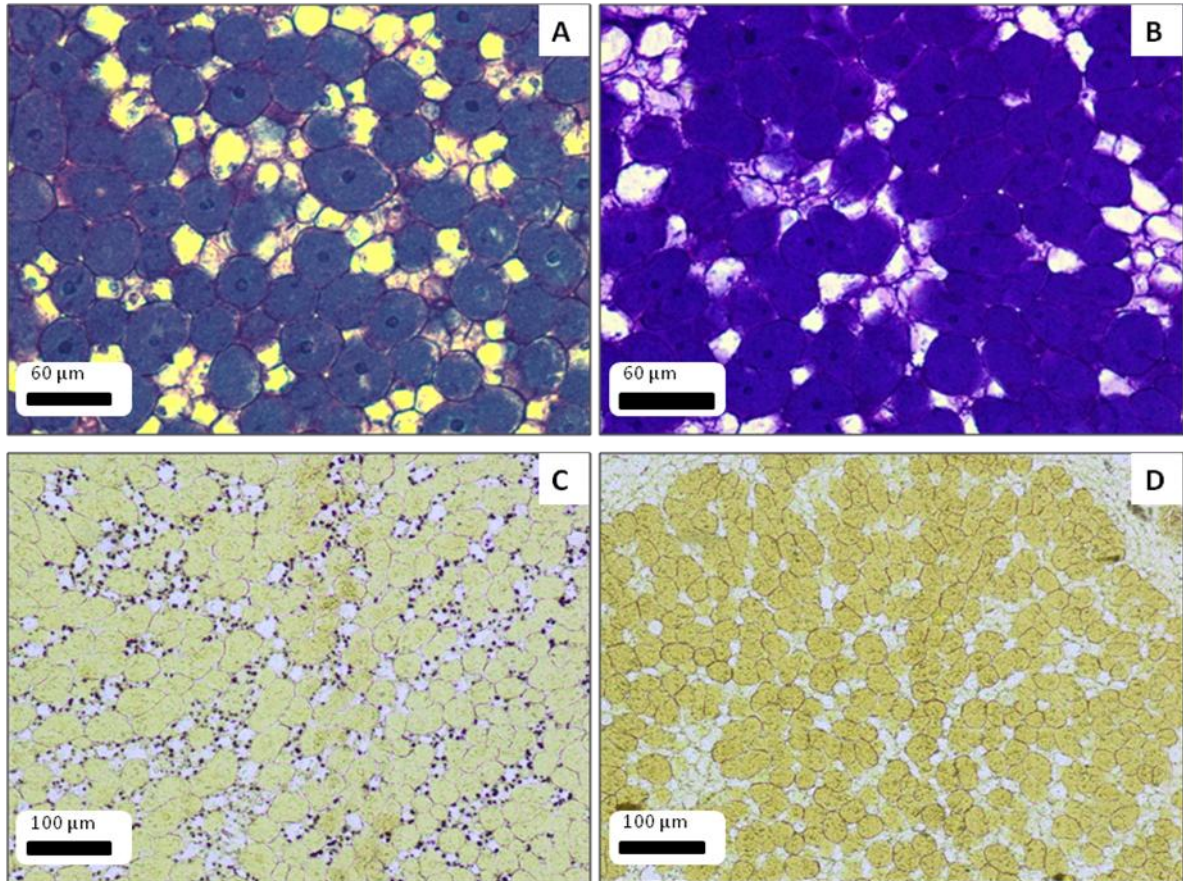


Figura 24 – Fotomicrografias de secções de nódulos radiculares de plantas de Pitiúba. (A) Nódulo de uma planta crescida em meio contendo 0 mM de NaCl e (B) nódulo de uma planta crescida em meio contendo 75 mM de NaCl, mostrando células vegetais infectadas pelos bacteroides, coradas com azul de toluidina e fucsina; (C) Nódulo de uma planta crescida em meio contendo 0 mM de NaCl e (D) nódulo de uma planta crescida em meio contendo 75mM de NaCl, mostrando células vegetais infectadas pelos bacteroides, coradas com lugol.

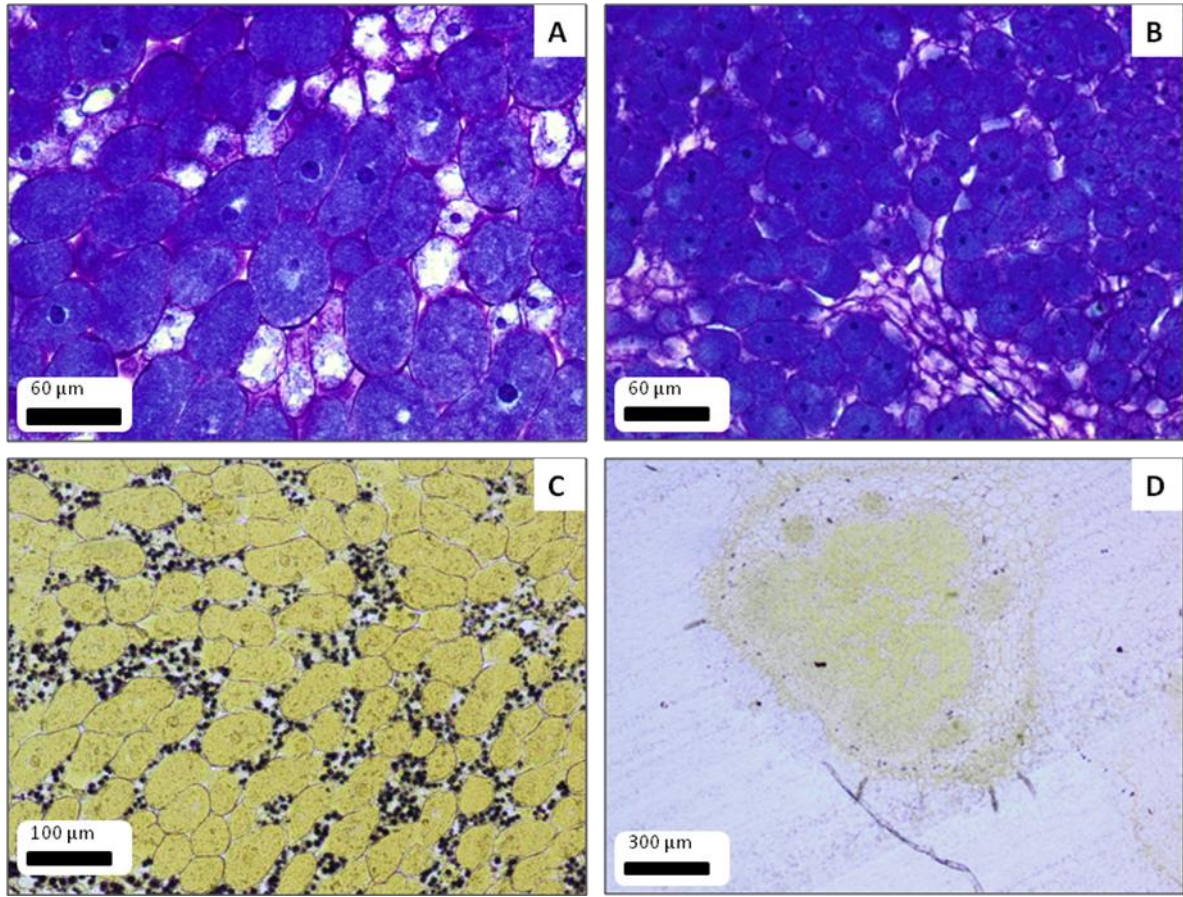


Figura 25 – Fotomicrografias de secções de nódulos das raízes de plantas de TVu. (A) Nódulo de uma planta crescida em meio contendo 0 mM de NaCl e (B) nódulo de uma planta crescida em meio contendo 75 mM de NaCl, mostrando células vegetais infectadas pelos bacteroides, coradas com azul de toluidina e fucsina; (C) Nódulo de uma planta crescida em meio contendo 0 mM de NaCl e (D) nódulo de uma planta crescida em meio contendo 75 mM de NaCl, mostrando células vegetais infectadas pelos bacteroides, coradas com lugol.

5. CONCLUSÕES

1. A estirpe SEMIA 6461 de *Bradyrhizobium* mostrou-se tolerante à salinidade, sob condições *in vitro*;
2. Em ambos os cultivares, a inoculação das plantas atenuou os efeitos deletérios da salinidade na área foliar, mas ela não resultou em quaisquer efeitos benéficos à produção de biomassa ou à fotossíntese líquida das plantas de feijão de corda sob estresse salino;
3. A inoculação não afetou os teores de Na^+ e Cl^- nas plantas sob estresse salino, entretanto foi capaz de aumentar os teores de K^+ , P e N, em ambos os cultivares;
4. Em ambos os cultivares, o acúmulo de N-aminossolúveis e prolina em resposta à salinidade foi mais evidente nas plantas inoculadas, e isso pode ter contribuído, em conjunto com a redução da transpiração e condutância estomática, para o aumento no teor relativo de água dessas plantas, melhorando, portanto, o *status* hídrico delas nas condições de estresse salino;
5. A peroxidação de lipídios nas condições de estresse salino foi reduzida nas plantas inoculadas de ambos os cultivares de feijão de corda, e isso se deveu, pelo menos em parte, ao aumento na atividade das enzimas APX e GPX;
6. A salinidade afetou o metabolismo do nitrogênio nos nódulos, através da redução nos teores de leghemoglobina e na atividade da GS, e isso provavelmente afetou as etapas de fixação e assimilação de nitrogênio, em ambos os cultivares;
7. As alterações induzidas pela salinidade nos nódulos não estiveram relacionadas a modificações na estrutura morfológica das células vegetais que abrigam os bacteroides, os quais, por sua vez, foram afetados por um menor acúmulo de amido nos nódulos das plantas sob estresse.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOGADALLAH, G. M. Antioxidative defense under salt stress. **Plant Signal Behav.**, v. 5, n. 4, p. 369–374, 2010.

ABROL, I. P.; YADAV, J. S. P.; MASSOUD, F. I. **Salt-affected soils and their management**, ed. 39, Rome, 1988.

AKHTAR, A. *et al.* Plant growth promoting Rhizobacteria: An overview. **J. Nat. Prod. Plant Resour.**, v. 2, n. 1, p. 19-31, 2012.

ANDRADE JÚNIOR, A. S. *et al.* **Cultivo do feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 108 p – (Embrapa Meio-Norte. Sistemas de Produção, 2), 2002.

ARNOLD W. *et al.* Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. **J Mol Biol**, v. 203, p.715–738, 1988.

ASHRAF, M. Breeding for salinity tolerance in plants. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 13, p. 17-42, 1994.

ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Photosynthesis under stressful environments: An overview. **Photosynthetica**, v. 51, n. 2, p. 163-190, 2013.

AYDI, S.; SASSI, S.; ABDELLY, C. Growth, nitrogen fixation and ion distribution in *Medicago truncatula* subjected to salt stress. **Plant and Soil November**, v. 312, n. 1-2, p. 59-67, 2008.

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. Campina Grande:UFPB, 218 p. 1999.

BAETHGEN, W.E.; ALLEY, M.M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 20, p. 961-969, 1989.

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

BAKER, N. R.; EAST, T. M.; LONG, S. P. Chilling damage to photosynthesis in young *Zea mays*. II. Photochemical function of thylakoids in vivo. **Journal of Experimental Botany**, v. 34, p. 189-97, 1983.

BAKER, N. R.; HARBINSON, J.; KRAMER, D. M. Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves. **Plant Cell Environ.**, v.30, n. 9, p.1107-25, 2007.

BEATTIE, G. A. Plant-Associated Bacteria. Gnanamanickam, Samuel S. (Ed.), VI, pp. 1-56. **Springer Netherlands**, 2007.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971.

BOHNERT, H. J.; NELSON, D. E.; JENSEN, R. G. Adaptations to environmental stresses. **Plant Cell**, v. 7, p. 1099–1111, 1995.

BOLT, G. H.; BRUGGENWERT, M. G. M. Soil Chemistry: Basic Elements, v. 5, part A, p. 1-281, 1976.

BOTELLA, M. A. *et al.* Plant adaptive responses to salinity stress. Plant adaptive responses to salinity stress. *In*: Jenks, M. A.; Hasegawa, P.M. (eds), **Plant Abiotic Stress**. **Blackwell Publishing**, Oxford, p. 37-70, 2005.

BOWDITCH, M. I.; DONALDSON, R. P. Ascorbate free-radical reduction by glyoxysomal membranes. **Plant Physiology**, v. 94, p. 531–537, 1990.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 246-254, 1976.

BRAGA, J. M.; DEFELIPO, B.V. Determinação espectrofotométrica do fósforo com extrato de solos e plantas. **Revista Ceres**, 41:73-85, 1974.

CATALDO, D. A. *et al.* Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 71-80, 1975.

CAVALCANTE, L. F. *et al.* Recuperação de solos afetados por sais. In: Hans Raj Gheyi; Nildo da Silva Dias; Claudivan Feitosa de Lacerda. (Org.). **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. Fortaleza, CE: INCT Sal, 2010, v. 1, p. 425-447.

CHEN, Z. *et al.* Root plasma membrane transporters controlling K^+/Na^+ homeostasis in salt-stressed barley. **Plant Physiology**, v. 145, p. 1714-1725, 2007.

CHOWDHURY, N.; MARSCHNER, P.; BURNS, R. Response of microbial activity and community structure to decreasing soil osmotic and matric potential. **Plant Soil**, v. 344, p. 241-254, 2011.

CORDOVILLA, M. P.; LIGERO, F.; LLUCH, C. Influence of host genotypes on growth, symbiotic performance and nitrogen assimilation in faba bean (*Vicia faba* L.) under salt stress. **Plant Soil**, v. 172, p. 289-297, 1995.

DANTAS, J. P. *et al.* Avaliação de genótipos de caupi sob salinidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 6, n. 3, p. 425-430, 2002.

DEL RÍO, L. A. *et al.* Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **J Exp Bot.** v. 53, n. 372, p. 1255-1272, 2002.

DIAS, N. D. ; BLANCO, F. F. Efeitos dos sais no solo e na planta. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e**

aplicados. Fortaleza: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade. p. 129-140, 2010.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 621-631, 2004.

DOYLE, J. J. Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 12, p. 473–478, 1998.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

FALL, L. *et al.* Genetic diversity in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] varieties determined by ARA and RAPD techniques. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 48-50, 2003.

FAO. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. Rome, Italy: **FAO Land and Plant Nutrition Management Service**; 2005.

FLEXAS, J. *et al.* Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. **Plant, Cell & Environment**. 2008; 31: 602–612.

FLOWERS, T. J.; COLMER, T. D. Salinity tolerance of halophytes. **New Phytol.**, v. 179, p. 945–963, 2008.

FLOWERS, T. J.; TROKE, P. F.; YEO, A. R. The mechanism of salt tolerance in halophytes. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v. 28, p. 89–121, 1977.

FAUVART, M.; MICHIELS, J. Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium–legume symbiosis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 285, n. 1, p. 1–9, 2008.

FREIBERG, C. *et al.* Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. **Nature**, v. 387, n. 6631, p. 394-401, 1997.

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. Feijão caupi: avanços tecnológicos. Brasília-DF, **Embrapa Informação Tecnológica**, 519p. 2005.

FREIRE FILHO, F. R.; CARDOSO, M. J.; ARAÚJO, A. G. Caupi: nomenclatura científica e nomes vulgares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 18, n. 12, p. 136-137, 1983.

GADALLAH, M. A. A. Effects of proline and glycinebetaine on *Vicia Faba* responses to salt stress. **Biologia Plantarum**, v.42, n. 2, p. 249-257, 1999.

GAIND, S.; GAUR, A. C. Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interaction with mung bean. **Plant and Soil**, v. 133, p. 141-149, 1991.

GAINES, T. P.; PARKER, M. B.; GASCHO, G. J. Automated determination of chlorides in soil and plant tissue by sodium nitrate. *Agron. J.* 76:371-374, 1984.

GASPAR, T. *et al.* Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, v. 37, p. 263-285, 2002.

GEURTS, R.; BISSELING, T. *Rhizobium* nod factor perception and signalling. **The Plant Cell**, v. 14, n. 1, p. 239-249, 2002.

GRENE, R. Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. **The Arabidopsis Book**, v. 1, p. 1-20, 2002.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiol Biochem.**, v. 48, n. 12, p. 909-30, 2010.

GRATTAN, S. R.; GRIEVE, C. M. Salinity-mineral relations in horticultural crops. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 78, p. 127-157, 1999.

GECHEV, T. S. *et al.* Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **Bioessays.**, v. 28, n. 11, p. 1091-1101, 2006.

GASPAR, T. *et al.* Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, v. 37, p. 263-285, 2002.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1-15, 2012.

GRATTAN, S. R.; GRIEVE, C. M. Mineral nutrient acquisition and response by plants grown in saline environments. In: Pessaraki M. (ed.): **Handbook of Plant and Crop Stress**. **Marcel Dekker**, New York: 203–229, 1999.

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annu Rev Plant Physiol**, v. 31, p. 149-190, 1980.

HASEGAWA, P. M. *et al.* Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.**, v. 51, p. 463-499, 2000.

HAVIR, E.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalases in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450-455, 1987.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. 2. Role of electron transfer. **Archives of Biochemistry and Biophysics** **125**: 850-857, 1968.

HEIDSTRA, R.; BISSELING, T. Nod factor-induced host responses and mechanisms of Nod factor perception. **New Phytol.**, v. 133, n. 1, p. 25–43, 1996.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p. 315-319, 1976.

KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 39–44. 1989.

LAL, B.; KHANNA, S. Selection of salt tolerant *Rhizobium* isolates of *Acacia nilotica*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 10, p. 637–639, 1995.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell & Environment.**, v. 25, p. 275–294, 2002.

LEITE, L. F. C. *et al.* Nodulação e produtividade de grãos do feijão-caupi em resposta ao molibdênio. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 04, p. 492-497, 2009.

LIMA, M. G. S. *et al.* Efeito do estresse salino sobre a concentração de pigmentos e prolina em folhas de arroz. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 3, p. 335-340, 2004.

LOKHANDE, V. H.; SUPRASANNA, P. Prospects of halophytes in understanding and managing abiotic stress tolerance. P. Ahmad and M.N.V. Prasad (eds.), **Environmental Adaptations and Stress Tolerance 29 of Plants in the Era of Climate Change**, Springer Science, p. 29-56, 2012.

LONG, S. R. Genes and signals in the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Plant Physiology**, v. 125, n. 1, p. 69-72, 2001.

LÓPEZ, M. *et al.* Growth and nitrogen fixation in *Lotus japonicas* and *Medicago truncatula* under NaCl stress: Nodule carbon metabolism. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 641-650, 2008.

MAAS, E. V. Crop tolerance to saline sprinkling water. **Plant and Soil**, v. 89, p. 273-284, 1985.

MADIGAN, P. V. *et al.* Microbiologia de Brock - 12^a Ed. 2010. Artmed Porto Alegre, RS p. 1160.

MAGGIO, A. *et al.* Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? **Plant J.**, v. 31, p. 699–712, 2002.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba, SP: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo. 201 p., 1989.

MANSOUR, M. M. F. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. **Biology Plantarum**, v. 43, p. 491–500, 2000.

MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rizobia isolated from cowpea nodules of the northeast of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n.5-6, p.1005-1010, 1997.

MEDEIROS, R. *et al.* Estresse salino sobre a nodulação em feijão caupi. **Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 5 (Número Especial), p. 202-206, 2008.

MITTOVA, V. *et al.* Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. **Plant Cell Environ.**, v. 6, p. 845–856, 2003.

MONTERO, J. I. *et al.* Transpiration from geranium grown under high temperatures and low humidities in greenhouses. **Agric. For.Meteorol.** v. 107, p. 323–332, 2001.

MUGNAI, S. *et al.* Stress-induced variation in leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence in *Callistemon* plants. **Res. J. Biol. Sci.**, v. 4, p. 913–921, 2009.

MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytologist**, v. 167, p. 645–663, 2005.

MUNNS, R.; JAMES, R. A.; LÄUCHLI, A. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. **Journal of Experimental Botany**. v. 57, p. 1025–1043, 2006.

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

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, p. 867-880, 1981.

NÓBREGA, R. S. A. *et al.* Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. **Ciência agrotec.**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 899-905, 2004.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.**, v. 49, p. 249–279, 1998.

NOCTOR, G.; DE PAEPE, R.; FOYER, C. H. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 3, p. 125–134, 2007.

NIU, X. *et al.* Ion homeostasis in NaCl stress environments. **Plant Physiology**, v. 109, p. 735–742, 1995.

OGREN, E.; OQUIST, G. Effects of drought on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition susceptibility in intact willow leaves. **Planta**, v.166, n.3, p. 380-388, 1985.

ONDRASEK, G.; RENGEL, Z.; VERES, S. Soil salinisation and salt stress in crop production. In “Abiotic Stress in Plants: Mechanisms and Adaptations”, ISBN 978-953-307-394-1. (Eds.) Shanker A.K. and Venkateswarlu B. **InTech**, p. 171-190, 2011.

OP DEN CAMP, R. H. *et al.* Nonlegume *Parasponia andersonii* deploys a broad rhizobium host range strategy resulting in largely variable symbiotic effectiveness. **Mol Plant Microbe Interact.**, v. 25, n. 7, p. 954-63, 2012.

PADULOSI, S.; N G, N. Q. Origin taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B .B.; MOHAN, R.; DASHIELL, K. E; JACKAI, L. E. N., eds. **Advances in Cowpea Research**. Tsukuba; IITA JIRCAS, p. 1-12, 1997.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 60, p. 324–349, 2005.

PORTES, T. A.; MAGALHÃES, A. C. N. Análise comparativa de diferentes genótipos de feijão através da medição da fluorescência da clorofila a e do balanço de O₂. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, n. 1, p. 17-23, 1993.

PRAXEDES, S. C. Alterações fisiológicas e bioquímicas em dois cultivares de feijão-de-corda com tolerância diferencial à salinidade. 145 f. 2008. **Tese (Doutorado em fitotecnia)**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

RAYCHAUDHURI, S. S.; DENG, X. W. The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. **Botanical Review**, v. 66, n. 1, p. 89-98, 2000.

REIS, V. M. *et al.* Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M.S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, p. 153-174, 2006.

RENGASAMY P. Salinity in the landscape: a growing problem in Australia. **Geotimes**, v. 53, p. 34-9, 2008.

RHIJN P. V.; VANDERLEYDEN, J. The Rhizobium-Plant Symbiosis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 59, n. 1, p. 124–142, 1995.

RHOADS, D. M. *et al.* Siedow Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Contribution to Oxidative Stress and Interorganellar Signaling. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 357-366, 2006.

RHODES, D.; NADOLSKA-ORCZYK, A.; RICH, P. J. **Salinity, osmolytes and compatible solutes**. In *Salinity: Environment—Plants—Molecules*, ed. Läuchli, A; Lüttge, U. Dordrecht, p. 181–204, 2004.

RHODES, D.; RENDON, G.A.; STEWART, G.R. The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. **Planta**, v. 125, p. 201-211, 1975.

RIBEIRO, M. R. Origem e classificação dos solos afetados por sais. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade, p. 11-19, 2010.

RIZHISKY, L. *et al.* Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. **Plant J.**, v. 32, n. 3, p. 329-342, 2002.

RUMJANEK, N. G. *et al.* Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R.; ARAUJO LIMA, J. A.; SILVA, P. H. S.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.279-335, 2005.

SAIRAM, R. K; SRIVASTAVA, G. C. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. **Plant Science**, v. 162, n. 6, p. 897–904, 2002.

SANDOWSKY, M. J. *et al.* Restriction of nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* is mediated by factors in the roots of *Glycine max*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, n.2, p. 832-6, 1995

SANGINGA, N.; LYASSE, O.; SINGH, B. B. Phosphorus use efficiency and nitrogen balance of cowpea breeding lines in a low P soil of the derived savanna zone in West Africa. **Plant and Soil**, v. 220, p. 119-128, 2000.

SAKIHAMA, Y. *et al.* Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. **Toxicology**, v. 177, p. 67–80, 2002.

SEEBAUER, J. R. *et al.* Amino acid metabolism in maize earshoots. Implications for assimilate preconditioning and nitrogen signaling. **Plant Physiology**, v. 136, p. 4326-4334, 2004.

SEGER, M. *et al.* Repercussion of mesophyll-specific overexpression of a soybean cytosolic glutamine synthetase gene in alfalfa (*Medicago sativa* L.) and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Plant Science**, v. 176, n. 1, p. 119–129, 2009.

SHANNON, M. C.; GRIEVE, C. M. Tolerance of vegetable crops to salinity. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 5-38, 1999.

SHARMA, P. K.; HALL, D. O. Interaction of salt stress and photoinhibition on photosynthesis in barley and sorghum. **Journal of Plant Physiology**, v. 138, n. 5, p. 614–619, 1991.

SHIGEOKA, S. *et al.* Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **J. Exp. Bot.**, v. 53, n. 372, p. 1305-1319, 2002.

SILVEIRA, J. A. G. *et al.* Proline accumulation and glutamine synthetase are increased by salt induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, n. 2, p.115-123, 2003.

SINGLETON, P. W.; EL-SWAIFY, S. A.; BOHLOOL, B. B. Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 44, p. 884-890, 1986.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology**. New York: Springer-Verlag, 450p., 1994.

SORATTO, R. P. *et al.* Resposta do feijoeiro ao preparo do solo, manejo de água e parcelamento do nitrogênio. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 25, n. 1, p. 89-96, 2003.

SEVERINO, L. S. *et al.*; Cardoso, G. D.; Vale, L. S.; Santos, J. W. Método para determinação da área foliar da mamoneira. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 8, p. 753-762, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal** - 5ª Ed. Artmed, p-954, 2013.

THIES, J. E.; BOHLOOL, B. B.; SINGLETON, P. W. Subgroups of cowpea miscellany: symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaea* and *Macroptilium atropurpureum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1540-1545, 1991.

US SALINITY LABORATORY STAFF. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. **USDA Handbook 60**, U.S. Government Printing Office, Washington, D. C., 1954.

VERSLUES, P. E.; BRAY, E. A. LWR1 and LWR2 are required for osmoregulation and osmotic adjustment in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v.136, p.2831–2842, 2004.

VIPREY, V. *et al.* Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. **Mol Microbiol.** v. 28, n. 6, p. 1381-9, 1998.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, v. 287, p. 3-14, 2006.

WILSON, D. O.; REISENAUER, H. M. Determination of leghemoglobin in legume nodules. **Analytical Biochemistry**, v. 6, n. 1, p. 27–30, 1963.

WITTENBERG, J. B. *et al.* The role of leghemoglobin in nitrogen fixation by bacteroids isolated from soybean root nodules. **J. Biol. Chem.**, v. 249, p. 4057-4066, 1974.

XAVIER, T. F. *et al.* Ontogenia da nodulação em duas cultivares de feijão caupi. **Ciência Rural**, v. 37, n. 2, p. 572-575, 2007a.

XAVIER, G. R. *et al.* Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condição *in vitro*. **Revista Caatinga** [S.I.], v. 20, n. 4, p. 1-9, 2007b.

YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y.; IKEHARA, N. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. **Plant Physiol.**, v. 115, p. 1405–1412, 1997.

YANCEY, P. H. *et al.* Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science**, v. 217, p. 1214–1222, 1982.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, p. 209-213, 1955.

YOKOI S.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. **Salt Stress Tolerance of Plants**. JIRCAS Working Report, 25-33, 2002

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. *In* **Biological Nitrogen Fixation**, Chapman and Hall New York. Edited by Stacey G, Burriss RH, Evans HJ, p. 43–86, 1992.

YOSHIDA, K. Plant biotechnology genetic engineering to enhance plant salt tolerance. **Journal Bioscience Bioengineering**, v. 94, n. 4, p. 585-590, 2002.

ZAHRAN, H. H. *et al.* Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic and heat stress. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 10, p. 100–105, 1994.

ZEPEDA-JAZO, I. *et al.* Na⁺-K⁺ transport in roots under salt stress. **Plant Signal Behav.**, v.3, n. 6, p. 401–403, 2008.

ZHANG, W. T. *et al.* Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, p. 201-210, 2007.

ZHANG, X. P. *et al.* Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 41), p. 104–113, 1991.

ZHU, J. K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** v. 53, p. 247–73, 2002.

ZHU, J. K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 66-71, 2001.

ZILLI, J. E.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. BR 3262: nova estirpe de *Bradyrhizobium* para a inoculação de feijão-caupi em Roraima. Boa Vista: Embrapa Roraima, 7p. (Embrapa Roraima. **Comunicado técnico**, 10), 2008.

ZRIBI, L. *et al.* Application of chlorophyll fluorescence for the diagnosis of salt stress in tomato "*Solanum lycopersicum* (variety Rio Grande)". **Scientia Horticulturae**, v. 120, n. 3, p. 367–372, 2009.