



## ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM CULTIVARES DE FEIJÃO SUBMETIDAS AO AUMENTO DE TEMPERATURA, EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM ESTIRPES DE *Bacillus subtilis*

Bruna Coelho de Lima, Fábio Fernando de Araujo

### PROBLEMÁTICA

A elevada produção antropogênica de Gases de Efeito Estufa (GEE) em nossa atmosfera vem impactando a agricultura e expondo as culturas às inúmeras combinações de estresses abióticos (Zandalinas; Fritschi; Mittler, 2021). As temperaturas ambientais médias têm aumentado continuamente, e presume-se que fiquem ainda mais altas devido às contínuas emissões desses gases, levando a um aquecimento global médio de 3,2°C até o ano de 2100 (IPCC, 2022).

Por se tratar de uma cultura de ciclo curto, o feijão comum torna-se sensível às variações ambientais (Hoffmann et al, 2007) e em situações extremas, acima de 35°C, a planta sofre um desequilíbrio hormonal, resultando na abscisão dos órgãos reprodutivos e redução na formação de botões florais e vagens, comprometendo significativamente sua produção final (Didonet; Madriz, 2002, Vieira, 2006, Taiz; Zeiger, 2013).

Desse modo, estudos envolvendo Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCP) como alternativa sustentável para a redução dos efeitos danosos dos estresses abióticos em plantas, tem ganhado importância para a agricultura, principalmente devido à alta capacidade de algumas espécies bacterianas em induzir tolerância ao vegetal (Kaushal; Wani, 2016).

### CONHECIMENTO PRÉVIO

Com uma área plantada de 2.854,9 mil hectares, o feijão comum segue sendo a principal fonte de proteína e é o alimento mais tradicional na dieta da população brasileira (CONAB, 2022). Dentre os elementos climáticos limitantes à essa cultura, a temperatura é considerada como a maior interferente no florescimento e frutificação, bem como, no desenvolvimento das vagens. Em virtude da variação térmica ao longo do território brasileiro, o cultivo de feijão-comum é limitado em algumas regiões, tanto pela baixa temperatura no período de inverno na região sul, quanto pelas altas temperaturas relacionadas aos elevados índices de umidade ao norte (EMBRAPA, 2003).

Diante dessas variações ambientais, o metabolismo bioquímico das plantas sofre distúrbios hormonais, ocasionando a redução do ciclo de vida, elevação da atividade respiratória, queda na assimilação de gás carbônico, assim como, o surgimento de radicais livres no conteúdo celular, tal como as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).

Atualmente, no cenário agrônômico, novos estudos buscam comprovar os efeitos benéficos provenientes da associação entre microrganismos do solo e as plantas cultivadas, tendo como finalidade, a redução dos efeitos provocados por estresses abióticos. Os resultados dessa interação são de grande importância para o aumento da produtividade no campo (Dodd; Perez-Alfocea, 2012).



Neste contexto, avaliou-se a capacidade de dois isolados de *Bacillus subtilis* em moderar os danos provocados pelo calor em duas cultivares de feijão comum.

## DESCRIÇÃO DA PESQUISA

O delineamento experimental aplicado foi o fatorial, inteiramente casualizado, com seis repetições. Composto por três tratamentos (linhagens *Bacillus subtilis* AP-3, *B. subtilis* AP-12 e tratamento controle) e duas cultivares de feijão (IAC Imperador e TAA Dama). O arranjo experimental consistiu em vasos plásticos com capacidade para 3 litros. O solo utilizado para o cultivo foi o substrato comercial Carolina® na proporção de 700 gramas por vaso. As sementes foram desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio (2%) diluída em água e depois enxaguadas em água corrente. Posteriormente, foram tratadas com a dose de 250 mL para 50 kg de sementes, do inoculante líquido Nitro 1000 para feijão comum (*P. vulgaris* L.), composto por *Rhizobium tropici* (SEMIA 4077 e SEMIA 4088). As plantas foram cultivadas em uma câmara de crescimento de plantas Fitotron™ modelo Weiss Technik UK Ltd, com temperatura, umidade e fotoperíodo controlados. A emissão de luz foi por meio de lâmpadas fluorescentes que forneceram um total de 350 W.m<sup>-2</sup>. O fotoperíodo foi configurado com 16 horas de luz e 8 horas de escuro com intensidade de 300 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. A temperatura inicial de cultivo foi ajustada para 20°C à noite e 25°C de dia e a umidade relativa foi fixada em 60%.

Para a seleção de isolados utilizados no estudo, utilizou-se o critério de maior e menor atividade da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilase (ACC) deaminase in vitro, segundo Lucon et al. (2008). A capacidade de crescimento das cepas na presença de ACC foi verificada em meio líquido incubado a 48h a 27°C, sob agitação constante. A linhagem AP-12, apresentou maior capacidade de crescimento in vitro, e a linhagem AP-3 foi selecionada devido a sua atuação já reconhecida, em minimizar os efeitos causados por estresses abióticos e promover o crescimento das plantas em estudos anteriores (Araújo et al., 2005; Lima et al., 2019).

As espécies de *Bacillus* foram cultivadas em placas de Petri em meio de cultura com ágar nutriente sólido (extrato de levedura 3 L<sup>-1</sup>, peptona 5g L<sup>-1</sup> e Ágar 20g L<sup>-1</sup>). As placas foram mantidas em estufa bacteriana por 48h a 32°C. Em seguida, as colônias bacterianas foram raspadas e diluídas em 9 mL de solução salina (MgSO<sub>4</sub> + 7H<sub>2</sub>O, 0,01M). Posteriormente, a solução foi agitada em Vortex™ para a dispersão total. No momento da semeadura, foi aplicado às sementes 0,1 mL da solução contendo 1,0 x 10<sup>9</sup> células por mL de cada um dos *Bacillus* em seus respectivos tratamentos. Os vasos foram armazenados no Fitotron® e irrigados periodicamente. Após a emergência das plântulas, foi realizado o desbaste, deixando-se apenas uma por vaso.

A incidência da alta temperatura nas plantas de feijoeiro teve início durante a fase reprodutiva da planta (estádios R5 a R7), caracterizada pela emissão de botões florais e formação de vagens. A temperatura dentro do Fitotron® foi elevada de 20°C/25°C para 28°C/33°C noite/dia durante dez dias. Nos demais estádios fenológicos de desenvolvimento, a temperatura foi mantida em 20/25 °C nos períodos noite/dia. Todas as amostras foliares coletadas antes, durante e após o período de estresse térmico foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a - 80°C até a realização das análises bioquímicas. O teor do aminoácido Prolina no tecido foliar foi determinado conforme a metodologia descrita por Bates et al. (1973). A determinação da atividade



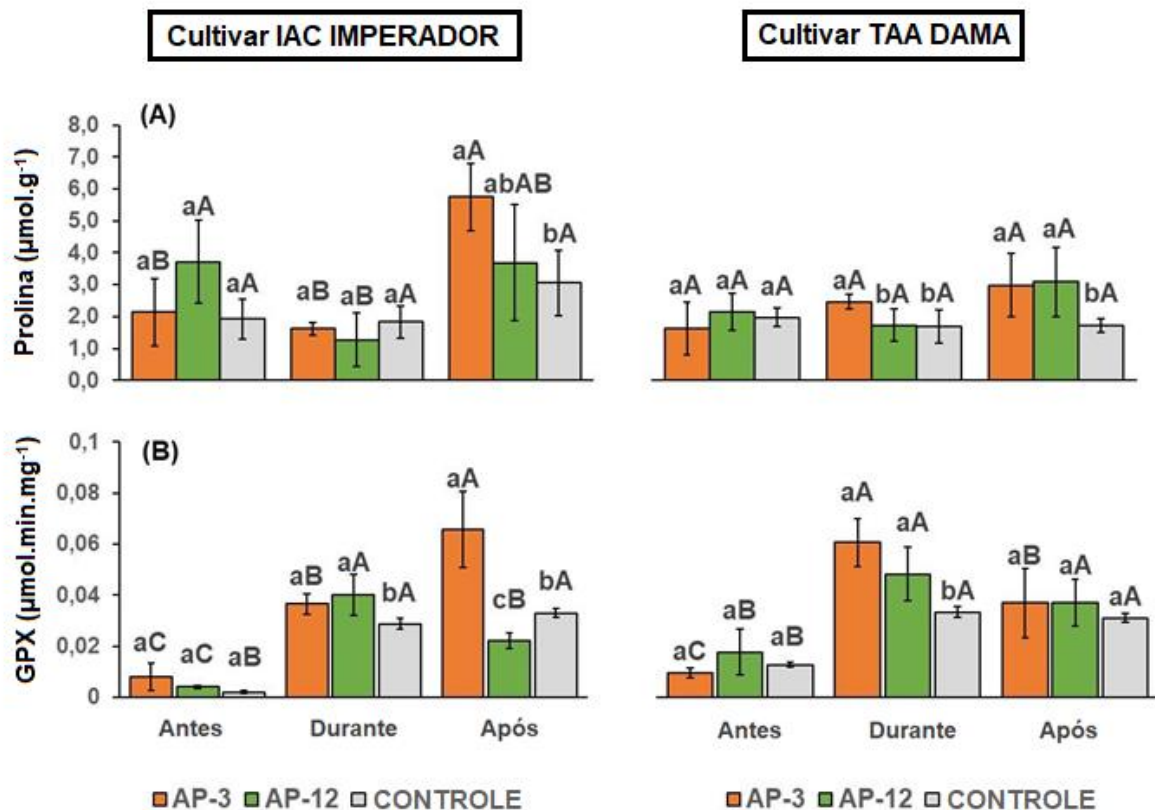
enzimática da Guaiacol peroxidase (GPX) (EC 1.11.1.7) foi realizada de acordo com Araujo et al. (2005).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação após o período de alta temperatura mostrou um aumento no teor do aminoácido prolina nos tratamentos contendo as linhagens AP-3 e AP-12. Na cultivar IAC Imperador, o teor foi três vezes maior nas plantas com a linhagem AP-3. Já na cultivar TAA Dama, as duas linhagens proporcionaram o aumento de prolina (Figura A). O acúmulo de prolina em várias espécies de plantas sob estresse tem sido associado à tolerância do vegetal à alguma forma de adversidade, e a sua concentração é comumente mais elevada em plantas tolerantes do que em plantas com sensibilidade a determinada situação de estresse (Ashraf ; Foolad, 2007). Essa proteína osmoprotetora contribui para o ajuste osmótico ao manter o turgor celular em diversas condições de estresses (Batool et al., 2020), sendo considerada um dos principais mecanismos adaptativos das plantas como resposta ao aumento de calor (Yuan et al., 2017).

Avaliando a atividade enzimática da Guaiacol peroxidase entre as cultivares, observamos que na cultivar IAC Imperador a atividade enzimática aumentou gradativamente em resposta ao aumento de temperatura no tratamento AP-3, exibindo maior atividade após o período de estresse térmico (Figura B). Em relação a cultivar TAA Dama, o momento de maior atividade enzimática ocorreu durante o período de estresse, expresso pela inoculação da espécie AP-3.

O aumento na atividade enzimática da Guaiacol peroxidase em plantas sob condição de estresse, aponta a capacidade de tolerância do vegetal à condição adversa, e consequentemente redução na síntese de radicais livres presentes nas células, minimizando os danos às membranas celulares (Abd El-Daim et al., 2014).



**Figura 1.** Comportamento temporal da concentração de Prolina (A) e da atividade enzimática da Guaiacol peroxidase (B) em diferentes períodos de estresse térmico, durante a fase reprodutiva dos feijoeiros co-inoculados com duas espécies de *B. subtilis* (AP-3 e AP-12).

Letras minúsculas representam diferenças significativas entre inoculação e letras maiúsculas representam diferenças significativas entre cultivares (teste de Tukey  $p < 0,05$ ).

## APLICAÇÃO PRÁTICA

Houve interação da espécie AP-3 com as cultivares de feijão em estudo, indicando melhores resultados bioquímicos quando inoculada em plantas submetidas à condição de calor.

A inoculação de sementes de feijão com *Bacillus subtilis* se apresenta como uma opção viável e sustentável para superar as temperaturas elevadas na agricultura.

## AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2017/16202–2).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

## LITERATURA CITADA

Araújo, F. F. *et al.* Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8–9, p. 1639–1645, 2005.



Abd el-daim, I. A., Bejai, S., Meijer, J. Improved heat stress tolerance of wheat seedlings by bacterial seed treatment. **Plant and Soil**, vol. 379, n. 1-2, p. 337–350, 2014.

Ashraf, M.; Foolad, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, n. 2, p. 206–216, 2007.

Bates, L. S.; Waldren, R. P.; Teare, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, n. 1, p. 205–207, 1973.

Batool, T. et al. Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato in response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities. **Scientific Reports**, v. 10, n. 16975, 2020.

Brasil. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento de safra brasileira: volume 9 - safra 2021/2022**. Brasília: CONAB, 2022.

Didonet, A. D.; Madriz, P. M. Abortamento de flores e vagens no feijoeiro: efeito da temperatura e da radiação solar. In: Congresso nacional de pesquisa de feijão, 7, 2002, Viçosa, MG. **Anais**. Viçosa: UFV, p. 55-58, 2002.

Dodd, I. C.; Perez-Alfocea, F. Microbial amelioration of crop salinity stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 9, p. 3415–3428, 2012.  
EMBRAPA. Cultivo do Feijoeiro Comum. Brasília: **Embrapa Arroz e Feijão**, 2003.

Hoffmann, L. et al. Resposta de cultivares de feijão à alta temperatura do ar no período reprodutivo. **Ciência Rural**, v. 37, n. 6, p. 1543–1548, 2007.

IPCC, 2022: Summary for Policymakers. In: Climate Change 2022: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. **Cambridge University Press**, Cambridge, UK and New York, NY, USA.

Kaushal, M.; Wani, S. P. Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 35–42, 2016.

Lima, B.C., Moro, A.L., Pacheco, A.C., Bonifácio, A., Araújo, A.S.F., Araújo, F. F. *Bacillus subtilis* ameliorates water stress tolerance in maize and common bean. **Journal of Plants Interactions**, vol. 14, n.1, 2019.

Lucon, C. M. M.; Akamatsu, M. A.; Harakava, R. Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 43, n. 6, p. 691–697, 2008.

Taiz, L.; Zeiger, E. **Fisiologia Vegetal**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.



Vieira, C. **Feijão**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV - Universidade Federal de Viçosa, 2006.

Yuan, L. *et al.* Influence of heat stress on leaf morphology and nitrogen-carbohydrate metabolisms in two wucai (*Brassica campestris* L.) genotypes. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, vol. 86, n.2, p.1–16, 2017.

Zandalinas, S. I.; Fritschi, F. B.; Mittler, R. Global Warming, Climate Change, and Environmental Pollution: Recipe for a Multifactorial Stress Combination Disaster, **Trends in Plant Science**, v.26, p. 588–599, 2021.