

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**APLICAÇÃO CONJUNTA DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E
CO-INOCULAÇÃO DE RIZÓBIOS E *Azospirillum brasilense* EM
LEGUMINOSAS E GRAMÍNEAS**

**Juan Guillermo Cubillos Hinojosa
(Tese de Doutorado)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**APLICAÇÃO CONJUNTA DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E
CO-INOCULAÇÃO DE RIZÓBIOS E *Azospirillum brasilense* EM
LEGUMINOSAS E GRAMÍNEAS**

JUAN GUILLERMO CUBILLOS HINOJOSA
Microbiologista (UPC, Colômbia)
Mestre em Ciências Agrarias (UNAL, Colômbia)

Tese apresentada
Como um dos requisitos à obtenção
do Grau de Doutor em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS) Brasil
Junho de 2020

CIP - Catalogação na Publicação

Cubillos-Hinojosa, Juan Guillermo
APLICAÇÃO CONJUNTA DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E
CO-INOCULAÇÃO DE RIZÓBIOS E *Azospirillum brasilense* EM
LEGUMINOSAS E GRAMÍNEAS / Juan Guillermo
Cubillos-Hinojosa. -- 2020.
137 f.
Orientador: Enilson Luiz Saccol de Sá.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Ciência do Solo, Porto Alegre, BR-RS,
2020.

1. rizóbios. 2. co-inoculação. 3. *Azospirillum*. 4.
sustentabilidade. 5. Microbiologia do solo. I. Sá,
Enilson Luiz Saccol de, orient. II. Título.

JUAN GUILLERMO CUBILLOS HINOJOSA
Microbiologista (UPC, Colômbia)
MSc Ciências Agrárias (UNAL, Colômbia)

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOCTOR EM CIÊNCIA DO SOLO

Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo

Faculdade de Agronomia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 26/06/2020
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 05/08/2020
Por



ENILSON LUIZ SACCOL DE SÁ
Orientador-PPG Ciência do Solo



ALBERTO VASCONCELLOS INDA JUNIOR
Coordenador do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência do Solo

DEBORAH PINHEIRO DICK
PPG Ciência do Solo
UFRGS
(através do MConfig/UFRGS)

ALEKSANDER WESTPHAL MUNIZ
EMBRAPA Amazônia Ocidental
(através do MConfig/UFRGS)



NELSON OSVALDO VALERO VALERO
Universidad de la Guajira, Colombia
(através do MConfig/UFRGS)

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade
de Agronomia

" La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones
y la fuente de todo progreso"
Louis Pasteur

*Aos meus pais, Gonzalo e Antonia Isabel,
que me ensinaram a lutar com sacrifício na vida.
A meus irmãos David, Isabel, Juan Diego e Mariapaz,
pela companhia e carinho.
A meus sobrinhos Laura Sofia e Jerónimo,
que são anjos que dão alegria a minha vida.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser minha companhia e sustento em cada momento da minha vida, e especialmente neste sonho, pois nada sou sem ti Senhor.

À Organização dos Estados Americanos (OEA), o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB), e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento da bolsa de estudo de doutorado.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), e o Programa de Pós-Graduação (PPG) em Ciência do Solo por ter me aceitado, acolhido, e pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá, por ter me acolhido e aberto as portas do laboratório que, mesmo diante das dificuldades, continuou acreditando em mim. Obrigado pela paciência, pode ter certeza que eu levarei comigo sempre os seus ensinamentos que com carinho compartilharei com os meus alunos e colegas.

À professora Deborah Dick, pela colaboração e fornecimento das substâncias húmicas para o desenvolvimento desta pesquisa e me incentivar para aprender e apaixonar ainda mais pelo estudo da bioatividade das SH.

Aos professores do PPG em Ciência do Solo, PPG em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, onde cursei disciplinas, pela paciência e ensinamentos.

Aos funcionários do PPG em Ciência do Solo, em especial ao secretário Jader Amaro que sempre esteve preste me ajudar na gestão acadêmica e ao José Ferreira (tio Zé) pela disposição e ajuda na casa de vegetação.

Aos funcionários e professores do Departamento de Fitotecnia, em especial ao professor André Vian e aos técnicos de laboratório Fabio e Giovane.

Aos meus pais Gonzalo e Antonia, pelo amor incondicional, por serem minha maior motivação, exemplo, e essa voz de folego nos momentos difíceis. Vocês são meu orgulho, minha gratidão sempre.

Aos meus irmãos David Ricardo, Isabel Cristina, Juan Diego e Mariapaz que durante o decorrer da vida tem me acompanhado, meus sobrinhos Laura Sofia e Jerónimo, e minha cunhada Alba por torcerem por mim e me apoiar.

A minha família, principalmente a minha tia Aida, Gladys e Elvira por ter me apoiado durante meus estudos no Brasil e, a minhas primas-irmãs queridas Mariapaz e Elaine, e minhas mães da vida Erlinda e Liduvina, por sempre estar do meu lado e prestes me ajudar a pesar da distância.

A todos os colegas e bolsistas do Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Solo pelo convívio durante esses anos e sempre prestes para me motivar. Em especial a Fernanda Araújo (Fê), Carolina Castilho (irmã de luta) e Daniela Fernandes, pela amizade, auxílio, risadas e lágrimas, amo vocês e sempre estarão no meu coração.

Aos colegas do PPG Ciência do Solo com quem mais passei momentos acadêmicos e de amizade durante os quatro anos, em especial a Andressa Bender, Vitor Ambrosini, Cristian Gamboa, Ana Paula Lima e Mariana Ramos.

A todos os amigos brasileiros e colombianos que me acolheram e fizeram da minha estadia no Brasil agradável, em especial a Marco Melo e Laura Perez

Enfim, as pessoas que durante estes anos de doutorado entraram, passaram, e outras ainda, saíram de minha vida... a todas elas, eu agradeço.

APLICAÇÃO CONJUNTA DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E CO-INOCULAÇÃO DE RIZÓBIOS E *Azospirillum brasilense* EM LEGUMINOSAS E GRAMÍNEAS¹

Autor: Juan Guillermo Cubillos Hinojosa
Orientador: Prof. Enilson Luiz Saccol de Sá

RESUMO

A necessidade de se minimizar os impactos causados ao meio ambiente pela agricultura e os questionamentos sobre a eficácia de tal maneira de produzir, têm levado a se buscar a integração de estratégias sustentáveis que permitam manter ou incrementar a produção. As substâncias húmicas (SH) e a co-inoculação de rizobactérias diazotróficas são métodos que possuem bioatividade que facilitam o crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo de interesse crescente a integração destes na produção sustentável. Nesse contexto, a principal hipótese desta pesquisa é que aplicação conjunta de SH extraídas de leonardita, e de rizóbios co-inoculados com *Azospirillum brasilense* em leguminosas e gramíneas promovem maior crescimento das plantas. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação conjunta de SH e rizóbios em co-inoculação com *A. brasilense* na promoção de crescimento de leguminosas e gramíneas. Para isso, foram realizados experimentos em laboratório e casa de vegetação com plantas leguminosas, feijão-fava e leucena, e gramíneas, milho e aveia preta, inoculadas ou co-inoculadas com rizóbios e *A. brasilense* em conjunto com SH (ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF)). As plantas de milho e aveia preta foram cultivadas com a metade da dose de nitrogênio recomendada para cada cultivo. Os resultados mostraram que nas leguminosas, feijão-fava e leucena, houve um aumento maior da massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), e o nitrogênio acumulado (Nac) nos tratamentos que receberam SH e conjuntamente co-inoculados com rizóbios e *A. brasilense*, seguido pelos tratamentos que foram inoculados somente com rizóbios e SH e os tratamentos co-inoculados com rizóbios e *A. brasilense* em relação ao tratamento controle e ao tratamento que foi somente inoculado com os rizóbios. Também foi evidenciado que a aplicação conjunta de SH e rizóbios em co-inoculação com *A. brasilense* aumentou a massa dos nódulos secos em feijão-fava e o número de nódulos em leucena, seguido pelos tratamentos onde foram inoculados com rizóbios e SH, e os tratamentos co-inoculados com rizóbios e *A. brasilense*. Em plantas de milho e aveia preta os resultados mostraram que houve maior aumento da MSPA, MSR e Nac nos tratamentos com adição de SH e co-inoculados com rizóbios e *A. brasilense*, seguido pelos tratamentos com adição de SH e inoculados somente com os rizóbios, em comparação com a dose completa de N. Esses resultados indicaram que a adição de SH com a co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense*, embora necessitem ser avaliados em testes futuros no solo e no campo, possuem um potencial promissor para a produção de cultivos agrícolas e pecuários sustentáveis.

Palavras-chave: rizóbios, co-inoculação, *Azospirillum*, sustentabilidade.

¹ Tese de Doutorado em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (137 p.). Junho, 2020.

COMBINED APPLICATION OF HUMIC SUBSTANCES AND CO-INOCULATION RHIZOBIA AND *Azospirillum brasilense* IN LEGUMES AND GRASSES²

Author: Juan Guillermo Cubillos Hinojosa

Adviser: Enilson Luiz Saccol de Sá

ABSTRACT

The need to minimize the impacts caused to the environment by agriculture and questions about the effectiveness of such a way of production, have led to the search for the integration of sustainable strategies that allow to maintain or increase production. Humic substances (HS) and the co-inoculation of diazotrophic rhizobacteria are methods that have bioactivity that facilitate the growth and development of plants, and their integration in sustainable production is of increasing interest. In this context, the main hypothesis of this research is that combined application of SH extracted from leonardite and rhizobia co-inoculated with *Azospirillum brasilense* in legumes and grasses promote greater plant growth. The general objective of this work was to evaluate the effect of the combined application of SH and rhizobia in co-inoculation with *A. brasilense* in the promotion of growth of legumes and grasses. For this, experiments were carried out in the laboratory and greenhouse with leguminous plants, lima beans and leucena, grasses plants corn and black oats, inoculated or co-inoculated with rhizobia and *A. brasilense* together with HS (humic acids (HA) and fulvic acids (FA)). Corn and black oat plants were grown at half the recommended dose for each crop. The results showed that in the legumes, lima beans and leucena, there was a greater increase in the shot dry mass (SDM), dry mass root (DMR) and accumulated nitrogen (Nac) in treatments that received HS and jointly co-inoculated with rhizobia and *A. brasilense*, followed by treatments that were inoculated only with rhizobia and HS and treatments co-inoculated with rhizobia and *A. brasilense* in relation to the control treatment that received only the dose of N and to the treatment that was only inoculated with rhizobia. It was also evidenced that the combined application of HS and rhizobia in co-inoculation with *A. brasilense* there was a greater increase in the mass of dry nodules in lima beans and the number of nodules in leucena, followed by treatments where they were inoculated with rhizobia and HS, and treatments co-inoculated with rhizobia and *A. brasilense*. In corn and black oat plants the results showed that there was a greater increase in SDM, DMR and Nac in treatments with addition of HS and co-inoculated with rhizobia and *A. brasilense*, followed by treatments with addition of HS and inoculated only with rhizobia, in comparison with the complete dose of N. These results indicated that the addition of HS with the co-inoculation of rhizobia and *A. brasilense*, although its need to be evaluated in future test in the soil and in the field, have a promising potential for production of sustainable agricultural and livestock crops.

Keywords: rhizobia, co-inoculation, *Azospirillum*, sustainability.

² Doctoral thesis in Soil Science – Graduate Program in Soil Science, Faculty of Agronomy, Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre (137 p.). June, 2020.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I. Introdução Geral	1
CAPÍTULO II – Revisão Bibliográfica	7
CAPÍTULO III – Selection of native rhizobia in Rio Grande do Sul, Brazil efficient in biological nitrogen fixation in lima bean (<i>Phaseolus lunatus</i> L.)	21
1. Abstract	21
2. Introduction	22
3. Material and methods	23
4. Results	27
5. Discussion	33
6. Conclusion	36
CAPÍTULO IV – Rizóbios nativos eficientes en la fijación de nitrógeno en <i>Leucaena leucocephala</i> en Rio Grande do Sul, Brasil	37
1. Resumen	37
2. Introducción	38
3. Método	39
4. Resultados	43
5. Conclusiones	48
CAPÍTULO V – Aplicação conjunta de substâncias húmicas e rizobactérias promotoras de crescimento inoculadas e co-inoculadas em plantas de <i>Phaseolus lunatus</i> L. e <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam) de Wit	50
1. Resumo	50
2. Introdução	51
3. Material e métodos	54
4. Resultados e Discussão	60
5. Conclusões	71
CAPÍTULO VI – Potencial da co-inoculação de rizobactérias em aplicação conjunta de substâncias húmicas para promoção de crescimento de plantas de milho e aveia preta	72

1. Resumo	72
2. Introdução	73
3. Material e métodos	77
4. Resultados e Discussão	82
5. Conclusões	92
CAPÍTULO VII – Conclusões gerais	94
Referências bibliográficas	96
Resumo Biográfico	137

RELAÇÃO DE TABELAS

	Pag.
Capítulo III.	
Table 1. Locations and georeferencing of soil and nodule samples	24
Table 2. Origin, phenotypic characteristics, growth time in YMA+RC, acidic or alkaline reaction in YMA+BB, and authentication of rhizobia isolates obtained from Rio Grande do Sul soils and nodules, evaluated as symbiont of lima bean	28
Table 3. Production of plant. Shoot dry mass (SDM), root dry mass (RDM), nodule dry mass (NDM), accumulated nitrogen (Nac) in shoot, Relative Efficiency Index (REI) (Brockwell et al., 1966) on fava bean (<i>Phaseolus lunatus</i> L.) cultivated in a greenhouse conditions	32
Capítulo IV	
Tabla 1. Localización de las muestras recolectadas	39
Tabla 2. Origen, características fenotípicas, tiempo de crecimiento en medio LMV, prueba de reacción acida o alcalina en medio LMA+AB, verificación de nódulos activos de los aislamientos obtenidos de suelos de Rio Grande do Sul y de nódulos de plantas de <i>Desmodium</i> sp, evaluados como simbioses de leucaena	46
Tabla 3. Valores promedio de masa seca de la parte aérea (MSPA), masa seca de la raíz (MSR), número de nódulos (NN), nitrógeno acumulado (Nac) de las plantas inoculadas con rizóbios y el índice de eficiencia relativa (IER).	47
Capítulo V	
Tabela 1. Identificação e descrição dos tratamentos experimento em plantas de feijão-fava.	56
Tabela 2. Identificação e descrição dos tratamentos do experimento com plantas de leucena.	57
Tabela 3. Efeito da inoculação e co-inoculação de rizóbios (Plu03, Plu14 e SEMIA 4077) e <i>A. brasilense</i> (Az) em conjunto com ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF), na promoção de crescimento de plantas de feijão-fava.	60
Tabela 4. Efeito da inoculação e co-inoculação de rizóbios (Leu01, SEMIA 4081, SEMIA 6361) e <i>A. brasilense</i> (Az) em conjunto com ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF), na promoção de crescimento de plantas de leucena.	65
Capítulo VI	
Tabela 1. Identificação e descrição dos tratamentos no experimento com plantas de milho.	79
Tabela 2. Identificação e descrição dos tratamentos experimento em plantas de aveia preta.	80
Tabela 3. Produção de Massa seca da parte aérea (MSPA), Massa seca da raiz (MSR) e Nitrogênio acumulado na parte aérea (Nac) em plantas de milho pela inoculação ou co-inoculação de rizóbios e <i>A. brasilense</i> em conjunto com substâncias húmicas.	82

Tabela 4. Produção de Massa seca da parte aérea (MSPA), Massa seca da raiz (MSR) e Nitrogênio acumulado na parte aérea (Nac) em plantas de aveia preta pela inoculação ou co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* em conjunto com substâncias húmicas. 88

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Pag.
Capítulo III.	
Figure 1. Characteristics of rhizobia isolates obtained from soil and nodules samples collected in the field	30
Capítulo IV.	
Figura 1. Porcentaje de aislamientos obtenidos de muestras de suelo por localidades en el Estado de Rio Grande do Sul, Brasil.	44
Capítulo V.	
Figura 1. Eficiência relativa da fixação biológica de nitrogênio pela inoculação ou co-inoculação de rizóbios e <i>A. brasilense</i> em conjunto com substâncias húmicas em plantas de feijão-fava.	64
Figura 2. Eficiência relativa da fixação biológica de nitrogênio pela inoculação ou co-inoculação de rizóbios e <i>A. brasilense</i> em conjunto com substâncias húmicas em plantas de leucena.	69
Capítulo VI	
Figura 1. Eficiência relativa da inoculação ou co-inoculação de rizóbios e <i>A. brasilense</i> em conjunto com substâncias húmicas na produção de massa seca da parte aérea nas plantas de milho.	87
Figura 2. Eficiência relativa da inoculação ou co-inoculação de rizóbios e <i>A. brasilense</i> em conjunto com substâncias húmicas na produção de massa seca em plantas de aveia preta.	91

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

AH – Ácidos húmicos

AF – Ácidos fúlvicos

Az – *Azospirillum brasilense*

BNF - Biological Nitrogen Fixation

MNS – Massa dos Nódulos Secos

MSPA – Massa Seca da Parte Aérea

Nac – Nitrogênio acumulado

NN – Número de Nódulos

N – Nitrogênio

RPCP- Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas

SEMIA – Coleção de estirpes da Seção de Microbiologia Agrícola (SEMIA) do antigo Instituto de Pesquisas Agronômicas (IPAGRO), hoje pertencente Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária (DDPA)

SH – Substâncias húmicas

YMA+BB - Yeast Mannitol Agar with the addition of bromothymol blue

YMA+CR - Yeast Mannitol Agar with addition of Congo Red

CAPÍTULO I – Introdução Geral

O crescimento da população mundial deverá desacelerar ainda mais no futuro, e a população deverá atingir cerca de 9,7 bilhões em 2050 segundo Nações Unidas (WILMOTH *et al.*, 2019). A manutenção da produção de alimentos para garantir a segurança alimentar para a população mundial cada vez mais crescente sem comprometer os recursos naturais, e ao mesmo tempo proteger o meio ambiente e produzir fontes renováveis de energia, para as gerações futuras representa um dos maiores desafios para a ciência do solo.

Dentro dos grãos de importância para alimentação da população mundial e brasileira, além do fornecimento de forragens para alimentação de animais se encontram as culturas do milho (segunda mais produzida na safra 2019/2020), aveia preta, feijão, entre outras. Entretanto, o cultivo de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit.), é uma leguminosa arbórea tropical, entre outras leguminosas promissoras, que é considerada uma alternativa para a escassez de forragem para alimentação do gado em tempos de seca, devido a seu alto rendimento de biomassa, alta concentração de proteína, energia e digestibilidade pelo gado (PEDRAZA *et al.*, 2001; MAHECHA, 2002; REY *et al.*, 2005; DIOUF *et al.*, 2008), além de seu uso em sistemas de agrofloresta.

A aplicação de fertilizantes químicos é uma das práticas mais custosas na produção das culturas tanto para alimentação humana como animal, além das taxas de aplicação, raramente são limitadas para refletir ou controlar seu uso excessivo ou perda permanente. Além disso, menos do 50% de N aplicado é absorvido pelas plantas devido à fatores como lixiviação, volatilização de amônia, desnitrificação, erosão e imobilização microbiana (HALVORSON *et al.*, 2002), o que contribui à contaminação do solo e as águas subsuperficiais com o N, levando a danos na saúde e comprometendo a sustentabilidade agrícola (TILMAN, 1998; ADESMOYE e KLOEPPER, 2009).

A agricultura agroecológica tenta evitar estes impactos na base do manejo da adubação nas lavouras utilizando resíduos orgânicos como fonte de nutrientes e substâncias húmicas (SH) como: vermicompostos, lodo de esgoto, turfas, composto de dejetos de animais, carvão mineral tipo leonardita e linhito. Estes últimos vêm sendo estudados os efeitos na ciclagem dos nutrientes, na promoção de crescimento de plantas e no solo (SILVA *et al.*, 2000; NARDI *et al.*, 2002; CANELLAS e FAÇANHA, 2004; RODDA *et al.*, 2006; ROSA *et al.*, 2009; CUBILLOS *et al.*, 2015, VALERO *et al.*, 2016).

A bioatividade das SH estimulando o crescimento, desenvolvimento das plantas, e a indução de proliferação de raízes modificando a arquitetura do sistema radicular, tem sido demonstrada em diversos trabalhos (CHEN e AVAID, 1990; FAÇANHA *et al.*, 2002; ZANDONADI *et al.*, 2007; TREVISAN *et al.*, 2010, BARROS *et al.*, 2010; SHAH *et al.*, 2018). Os efeitos das SH sobre o desenvolvimento vegetal são dependentes da fonte, da dose das SH empregada e do genótipo da planta (VAUGHAN e MALCOLM, 1985; RODDA *et al.*, 2006). Além disso, outros estudos realizados por MUSCOLO *et al.*, (2007) e NARDI *et al.*, (2002) sugerem que a ação das SH sobre as plantas seria "efeito semelhante à auxina" e que está relacionada com um teor mais elevado de grupos nitrogenados na sua estrutura e aos domínios hidrofílicos.

A interação entre material húmico e sistema radicular na rizosfera verifica-se com a entrada das estruturas húmicas de menor tamanho como os AF no apoplasto, atingindo assim as membranas celulares (CANELLAS *et al.*, 2002). Da mesma maneira, foi relatado que os AH promoveram o desenvolvimento radicular de plântulas de milho e café e a ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática (FAÇANHA *et al.*, 2002), como também foi detectada a presença de auxinas em SH isoladas de vermicomposto que aumentaram a síntese e atividade da H⁺-ATPase da membrana plasmática isolada de raízes de milho (CANELLAS *et al.*, 2002) que é induzida através da modulação de genes Mha2 (FRIAS *et al.*, 1996). Esta modulação de expressão dos genes envolvidos na sínteses e atividade da H⁺-ATPase tem sido evidenciada com SH extraídas de vermicomposto (QUAGGIOTTI *et al.*, 2004), como também em um experimento usando plantas mutantes insensíveis a auxinas, comprovou-se a ação hormonal tipo auxina promovida por SH isoladas de diferentes fontes de matéria orgânica (ZANDONADI, 2006).

A aplicação de SH em cultivos agrícolas de interesse comercial já foi estudada principalmente para a promoção de crescimento (BALDOTTO *et al.*, 2009), arroz (TEJADA e GONZÁLES, 2004), videira (FERRARA E BRUNETTI, 2008), cana-de-açúcar e milho testados em casa de vegetação (MARQUES JUNIOR *et al.*, 2008; CONCEIÇÃO *et al.*, 2009), entre outros. Da mesma maneira tem sido demonstrado os efeitos da aplicação de AH com potássio (K) no aumento do crescimento de pepino (KAZEMI, 2013). ROSA *et al.*, (2009) estudou a adição de diferentes doses SH extraídas de carvão mineral em plantas de feijão observando um aumento na produção de massa seca da parte aérea e as concentrações de P, K, Ca, Mg, sendo observado esse mesmo efeito em tomateiro (BERNARDES *et al.*, 2011) utilizando produto comercial a base de SH. Também foi evidenciado estímulo no crescimento das plantas de alface e cebolinha com o uso de um produto comercial à base de SH extraídas de leonardita (LÜDTKE, 2014).

Outra forma que tem sido estudada para promoção de crescimento vegetal é o emprego de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP), contribuem para aumentar o crescimento das plantas (KLOEPPER e SCHROTH, 1978). Entre os principais mecanismos de promoção de crescimento estão a fixação biológica de N (FBN) (INIGUEZ *et al.*, 2004; MONTAÑEZ *et al.*, 2009), a produção de auxinas, citocininas, giberelinas e inibição de etileno (ARSHAD e FRANKENBERGER, 1992), o antagonismo contra fitopatógenos pela produção de sideróforos (SCHER e BAKER, 1982) a competição por nutrientes, a indução de resistência sistêmica adquirida (PIETERSE *et al.*, 2003), ou o aumento da disponibilidade de nutrientes como fósforo (SESSITSCH *et al.*, 2002; STURZ *et al.*, 2000).

Os rizóbios estão entre os micro-organismos mais bem estudados, sendo muito utilizados na inoculação de plantas e, em simbiose com leguminosas, mostram capacidade de fixar de nitrogênio atmosférico. Vários estudos têm sido desenvolvidos para selecionar estirpes de bactérias que apresentem alta eficiência na FBN em feijão comum e feijão caupi, como em outras culturas, com a finalidade de aumentar os níveis de produtividade dessas culturas. Isto tem revelado uma grande diversidade de estirpes com potencial para uso como inoculantes (FERREIRA *et al.*, 2000; LACERDA *et al.*, 2004, SOARES *et al.*, 2006).

Além disso, nos últimos anos se tem demonstrado que os rizóbios também são capazes de promover o crescimento de plantas não-leguminosas por meio de outros mecanismos, entre os quais a produção de hormônios (YANII *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2005; SCHLINDWEIN *et al.*, 2008). A síntese de hormônios tipo ácido indol-acético (AIA), promove o crescimento das raízes e a proliferação de pêlos radiculares, melhorando a absorção de água e nutrientes do solo, e conseqüentemente, melhorando o desenvolvimento da planta infectada (CABALLERO-MELLADO *et al.*, 2006). Neste sentido, em cultivos em sucessão ou em consorciação, a gramínea pode também ter o crescimento favorecido pela produção de hormônios, entre eles o AIA, pelas bactérias simbiotes de leguminosas. Alguns desses efeitos têm sido comprovados em trabalhos conduzidos com alface (NOEL *et al.*, 1996), canola (NOEL *et al.*, 1996), azevém (HAHN, 2013), trigo (WEBSTER *et al.*, 1997; SANTOS, 2018), rabanete (ANTOUN *et al.*, 1998), sorgo, milheto, capim áries, capim sudão (MACHADO, 2015), milho (CHABOT, 1996; GUTIERREZ-ZAMORA, 2001; HAHN, 2013; SANTOS, 2018) e arroz (WEBSTER *et al.*, 1997; OSÓRIO FILHO, 2009; HAHN, 2013; SANTOS, 2018).

Entretanto, nos últimos anos tem se explorado no Brasil a mistura de RPCP como rizóbios e *A. brasilense* conhecida como técnica de co-inoculação (HUNGRIA *et al.*, 2013), sendo recomendada oficialmente pela RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola) desde o ano 2016 para espécies leguminosas. Em alguns trabalhos de pesquisa desenvolvidos em leguminosas como feijão comum e soja (HUNGRIA *et al.*, 2013), e em gramíneas como milho, trigo e arroz (HAHN *et al.*, 2013; SANTOS, 2018) tem demonstrado os benefícios no aumento da produtividade do cultivo com uso desta técnica, havendo a necessidade de conduzir estudos em outros cultivos.

As vantagens tanto das SH e as RPCP na promoção de crescimento de plantas nos últimos anos tem crescido o interesse no estudo da integração destes para produção agropecuária sustentável. Em alguns trabalhos tem sido evidenciado aumentos na promoção de crescimento pelo uso conjunto de ácidos húmicos e *Herbaspirillum seropedicae* em toletes de cana tratados termicamente em condições de casa de vegetação (MARQUES JUNIOR *et al.*, 2008), além do efeito na produtividade de cultivos de cana e milho em campo (MARQUES

JUNIOR, 2010). Em leguminosas, como a soja, foram avaliadas a inoculação de sementes com estirpes de *Bradyrhizobium* sp. em conjunto com humato de sódio, molibdato de amônio e humato de sódio nas folhas, sendo relatados aumentos na fixação biológica de nitrogênio e número de nódulos incrementando a produtividade do cultivo em 22% a mais do que o controle (TILBA e SINEGOVSKAYA, 2012). Enquanto no feijão comum, tem sido avaliado o efeito da co-inoculação de rizóbios e *Herbaspirillum seropedicae* em conjunto com AH extraídos de vermicomposto nas plantas submetidas a estresse hídrico, os autores demonstraram que a recuperação das plantas após condições de estresse (MELO *et al.*, 2017). No cultivo de batata tem sido avaliada a aplicação de AH comercial extraído de leonardita em conjunto com RPCP (*Bacillus megatorium* e *Bacillus subtilis*), sendo relatado maior aumento no rendimento do cultivo (EKIN, 2019).

Os benefícios relatados pela de SH de diversas fontes e a inoculação ou co-inoculação de RPCP para a promoção de crescimento em algumas plantas, mostram um caminho que deve ser explorado conduzindo estudos tanto em gramíneas como em leguminosas e outras não leguminosas, de maneira que possam ser utilizadas como estratégia de produção sustentável.

No contexto do exposto acima, a principal hipótese desta pesquisa é que aplicação conjunta de Substâncias Húmicas (SH) extraídas de leonardita e de rizóbios co-inoculados com *Azospirillum brasilense* em leguminosas e gramíneas promovem o crescimento das plantas; contribuindo em leguminosas na estimulação da nodulação e em gramíneas no crescimento e desenvolvimento à aplicação isolada nas culturas. Como segunda hipótese planteou-se que existem rizóbios autóctones nos solos do Rio Grande do Sul eficientes na fixação biológica de nitrogênio em associação com leucena e feijão fava.

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação conjunta de SH e rizóbios em co-inoculação com *A. brasilense* na promoção de crescimento de leguminosas e gramíneas. Os objetivos específicos foram: (a) Selecionar rizóbios autóctones do solo do Rio Grande do Sul eficientes na fixação biológica de nitrogênio em associação com leucena (*Leucaena leucocephala*) e feijão-fava (*Phaseolus lunatus*). (b) Avaliar o efeito da aplicação conjunta de SH e rizóbios em co-inoculação com *A. brasilense* na promoção de

crescimento das leguminosas: leucena e feijão fava. (c) Avaliar o efeito da aplicação conjunta de SH e rizóbios em co-inoculação com *A. brasilense* na promoção de crescimento das gramíneas: milho (*Zea mays*) e aveia preta (*Avena strigosa*).

Este trabalho de pesquisa apresenta-se em forma de capítulos: no segundo capítulo encontra-se a revisão bibliográfica; no terceiro capítulo encontra-se o primeiro artigo em inglês intitulado “Selection of native rhizobia in Rio Grande do Sul, Brazil efficient in biological nitrogen fixation in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.)”; no quarto capítulo apresenta-se o segundo artigo em espanhol intitulado “Rizóbios nativos eficientes en la fijación de nitrógeno en *Leucaena leucocephala* en Rio Grande do Sul, Brasil”; no quinto capítulo encontra-se o terceiro artigo intitulado: Aplicação conjunta de substâncias húmicas e rizobactérias promotoras de crescimento inoculadas e co-inoculadas em plantas de *Phaseolus lunatus* L. e *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit”; no sexto capítulo apresenta-se o quarto artigo intitulado: Potencial da co-inoculação de rizobactérias em aplicação conjunta de substâncias húmicas para promoção de crescimento de plantas de milho e aveia preta; e no sétimo capítulo as conclusões gerais.

CAPÍTULO II – Revisão Bibliográfica

2.1. Substâncias húmicas como bioestimulantes no crescimento e desenvolvimento de plantas.

As substâncias húmicas (SH) são grandes arranjos supramoleculares resultantes da automontagem de moléculas húmicas heterogêneas e relativamente pequenas, resultantes da degradação de materiais biológicos residuais; essas associações supramoleculares são estabilizadas pelas ligações de hidrogênio e ligações hidrofóbicas fracas, como as forças de Van der Waals, π - π , e CH- π , posicionando-se hidrofobicamente para o interior da micela e as estruturas contendo grupos hidrofílicos para a parte externa (PICCOLO, 2002; THENG *et al.*, 2012).

As SH solúveis, constituem a fração coloidal da matéria orgânica do solo, contribuindo com 85 a 90 % do teor total de carbono orgânico (DICK *et al.*, 2009) e de acordo com a sua solubilidade em função do pH, podem ser distribuídas em duas frações: ácidos fúlvicos (AF) que são a fração alcalino-solúvel que é solúvel em meio ácido, contendo uma grande quantidade de grupamentos funcionais oxigenados; e ácidos húmicos (AH) que são solúveis em meio alcalino, e insolúveis em meio ácido devido a que com a protonação dos grupamentos funcionais ocorre o colapso da estrutura e precipitação das macromoléculas. Também há uma fração insolúvel em meio alcalino e ácido, que representam a matéria orgânica intimamente ligada à fração mineral do solo conhecida como humina (Hu) (KONONOVA, 1982; STEVENSON, 1994; GUERRA, 2008; CANELLAS *et al.*, 2001).

Dentre as fontes mais utilizadas para extração de SH encontram-se a leonardita (ADANI *et al.*, 1998; AGUIRRE *et al.*, 2009; GIANOULLI *et al.*, 2009; MORA *et al.*, 2010), lignite (GIANOULLI *et al.*, 2009; VALERO *et al.*, 2018) e a turfa (SILVA *et al.*, 2011), que são carvões de baixa qualidade para produzir energia, encontrados geralmente na parte superior do perfil de depósitos de carvão próximo a outros carvões como linhito e turfa. Estes tipos de carvões, ricos em ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF), não são utilizados comercialmente para produção de energia pelo fato de ter um baixo poder energético, porém são considerados fonte de SH obtidas pelo método clássico de extração com soluções alcalinas (SILVA FILHO e SILVA, 2002; SENESI *et al.*, 2007; CHASSAPIS e ROULIA, 2008; GIANOULLI *et al.*, 2009). Da mesma maneira, para extração de SH são utilizado o solo (MALIK e AZAM, 1985; BALDOTTO *et al.*, 2011), os resíduos de animais (BALDOTTO *et al.*, 2007) e os compostos orgânicos feitos de húmus de minhoca (vermicompostos) (ATIYEH *et al.*, 2002; ARANCON *et al.*, 2003; GARCIA *et al.*, 2012; BALDOTTO e BALDOTTO, 2014; GARCIA *et al.*, 2014), de torta de filtro (BALDOTTO *et al.*, 2009), de esterco bovino (ARANCON *et al.*, 2003; BALDOTTO e BALDOTTO, 2014b), de cama-de-frango (BALDOTTO e BALDOTTO, 2014b), de resíduos de alimentos (ARANCON *et al.*, 2003), de lixo urbano (CANELLAS *et al.*, 2000; JINDO *et al.*, 2012) e de lodo de esgoto (CANELLAS *et al.*, 2000; JINDO *et al.*, 2012). Na composição elementar de diferentes SH tem sido relatado que os principais elementos na composição são: C, H, O, N e S; estes estão sempre presentes independentemente de sua origem (THAN, 2003).

Dentre os efeitos das SH no estímulo da promoção de crescimento de plantas existem inúmeros de trabalhos que mostram que estes podem ser de forma indireta ou direta (CHEN e AVIAD, 1990; STEVENSON, 1994; VARANINI e PINTON, 2000; NARDI *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2004; CANELLAS e OLIVARES, 2014; CANELLAS *et al.*, 2015). Os diretos atuam sob os processos metabólicos e fisiológicos das plantas envolvidos na promoção de crescimento, modificação da arquitetura radicular e a captação de nutrientes (CHEN e AVIAD, 1990; FAÇANHA *et al.*, 2002; ZANDONADI *et al.*, 2007; ROSA *et al.*, 2009; TREVISAN *et al.*, 2010, BARROS *et al.*, 2010), enquanto os efeitos indiretos atuam sob as propriedades do solo físicas, químicas e biológicas influenciando a fertilidade como a complexação de metais que facilita a absorção

principalmente de micronutrientes, o aumento da capacidade de troca catiônica (CHEN e AVIAD, 1990; CHEN *et al.*, 2003; PINTON *et al.*, 1999; GARCIA-MINA, 2005), o fornecimento de nutrientes e retenção de umidade (ROCHA e ROSA, 2003) refletindo-se esses posteriormente na fisiologia vegetal das plantas (CANELLAS *et al.*, 2011). No entanto, a maioria dos efeitos benéficos relatados das SH no crescimento das plantas parece estar relacionada à sua influência positiva nas mudanças na arquitetura das raízes, pois a vegetação com sua comunidade microbiana associada, promove a alteração dos componentes inorgânicos do solo e, conseqüentemente, influencia diretamente a química da solução do solo (CANELLAS *et al.*, 2015). As plantas alteram a taxa de intemperismo mineral, gerando mudanças no pH, liberando agentes de complexação de metal e o potencial redox no solo (LUCAS, 2001).

Um dos efeitos das SH na fisiologia das plantas é “como auxina”, que têm sido relatados em trabalhos publicados entre 1914 e 1920 mostraram que as SH melhoraram o crescimento das plantas ao fornecer substâncias chamadas "Auximones" (BOTTOMLEY, 1914a,b, 1917, 1920), que logo depois foi corroborado por HILLITZER (1932) e CHAMINADE e BOUCHER (1940). Em seguida, em plantas de ervilha, nas pontas de raízes foi encontrando que as SH possuem uma atividade semelhante à auxina, sendo comprovado por O'DONNELL (1973), o que permitiu que partir desse momento abrir o caminho para estudar as frações húmicas e verificar que estas possuíam uma alta atividade hormonal (CACCO e DELL'AGNOLA, 1984; DELL'AGNOLA e NARDI, 1987; NARDI *et al.*, 1988; PICCOLO *et al.*, 1992). Seguidamente foi demonstrado que apenas as SH de baixo peso molecular como os AF induzem alterações semelhantes às causadas por indole-3-acético ácido (AIA) (MUSCOLO *et al.*, 1993), como também o aumento tanto a atividade peroxidase quanto a atividade da AIA oxidase. MUSCOLO e NARDI (1999) avaliaram a possível interação das SH com as membranas plasmáticas em células de cenoura com isotiocianato de fluoresceína. Outros estudos realizados relataram que essa atividade “como auxina” está relacionada com um teor mais elevado de grupos nitrogenados na sua estrutura e os domínios hidrofílicos (CHEN e AVIAD, 1990; CANELLAS *et al.*, 2002; FACANHA *et al.*, 2002; NARDI *et al.*, 2002; MUSCOLO *et al.*, 2007).

Outros dos efeitos importantes que desempenham as SH é a regulação de enzimas envolvidas no metabolismo vegetal, como por exemplo a

H⁺-ATPase, VTP-ase, nitrato redutase, e auxínico (PINTON *et al.*, 1992; FAÇANHA *et al.*, 2002; NARDI *et al.*, 2005; ZANDONADI e BUSATO, 2012; ZANDONADI *et al.*, 2013, ZANDONATI *et al.*, 2014, CANELLAS *et al.*, 2015, SHAH *et al.*, 2018).

Em relação as H⁺-ATPases, são enzimas transmembranais com capacidade de hidrolisar ATP (HAGER *et al.*, 1991; FRIAS *et al.*, 1996; BALDOTO e BALDOTTO, 2014), gerando energia e um gradiente eletroquímico que está diretamente envolvido em dois mecanismos fundamentais para o desenvolvimento vegetal: o primeiro é a energização do sistema secundário de translocação de íons, que é fundamental para absorção de macro e micronutrientes; esse mecanismo, pode ser explicado pela ação das H⁺-ATPases na despolarização da membrana plasmática e, conseqüentemente, na ativação de transportadores (SONDERGAARD *et al.*, 2004; MORSOMME e BOUTRY, 2000). O segundo é a promoção do aumento da plasticidade da parede celular por acidificação do apoplasto pelo bombeamento de H⁺ que gera aumento do pH, fator fundamental para o processo de crescimento e alongamento da célula vegetal (COSGROVE, 1997), sendo a base da teoria do crescimento ácido (HAGER, 2003) que é induzido pela auxina que gera o aumento de extrusão de prótons mediado pela H⁺-ATPase da membrana plasmática que induz a ação de enzimas específicas que atuam sobre a parede celular, o que facilita a plasticidade e, conseqüentemente o alongamento da célula (RAYLE e CLELAND, 1992).

O efeito das SH sobre a estimulação da atividade e sínteses das enzimas H⁺-ATPases da membrana plasmática, possui um efeito semelhante ao auxínico “como auxina” (NARDI *et al.*, 1991; FAÇANHA *et al.*, 2002; CANELLAS *et al.*, 2002; JINDO *et al.*, 2012). Além disso, as SH podem estimular a H⁺-ATPase das vesículas da membrana de raízes de várias plantas (NARDI *et al.*, 1991; VARANINI *et al.*, 1993; PINTON *et al.*, 1999; NARDI *et al.*, 2000). AH isolados de vermicomposto e de lodo de esgoto, promoveram o desenvolvimento radicular de plântulas de milho e de café e a ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática (FAÇANHA *et al.*, 2002). Estudos realizados por CANELLAS *et al.*, (2002) detectaram a presença de auxinas em SH isoladas de vermicomposto e observaram aumento na atividade e na síntese da H⁺-ATPase da membrana plasmática isolada de raízes de milho. A síntese de H⁺-ATPase de

membrana plasmática é induzida através da modulação de genes Mha2 (FRIAS *et al.*, 1996). De acordo com QUAGGIOTTI *et al.*, (2004), as SH isoladas de vermicomposto também podem modular a expressão destes genes. ZANDONADI (2006), usando plantas mutantes insensíveis a auxinas, comprovou a ação hormonal tipo auxina promovida por SH isoladas de diferentes fontes de matéria orgânica. BARROS *et al.*, (2010) descreveu os efeitos de materiais húmicos transformados sobre a fisiologia das plantas, demonstrando bioatividade no desenvolvimento radicular, pelas fracções de AH que possuem uma característica hidrofílica e a presença de grupos nitrogenados. Por tanto, o conteúdo de grupos nitrogenados e o caráter mais hidrofílico dos AH da leonardita é uma característica que na teoria poderia favorecer a atividade fitoestimuladora destes AH sobre as raízes das plantas.

Entretanto, também se tem reportado os efeitos das SH na contribuição da absorção de nutrientes das plantas, como consequência da atividade da H⁺-ATPase energizando os transportadores de íons que contribui na absorção de nutrientes secundários e promove a absorção de nutrientes como no caso do nitrato por meio de canais iônicos estabelecidos na membrana plasmática, sendo transportado de maneira assimétrica por prótons (2: 1H⁺:NO₃⁻) (CANELLAS *et al.*, 2015), havendo alguns relatos sobre o aumento no transporte de nitratos pela atividade de SH em plantas de milho (NARDI *et al.*, 2000a,b), que induzem a codificação dos genes Mha2 que é considerado um dos principais tipos de H⁺-ATPase expressado nas células das raízes (QUAGGIOTTI *et al.*, 2004).

Dentre os fatores principais que podem influenciar decisivamente na bioatividade das substâncias húmicas encontram-se: a espécie, o órgão e a idade da planta; a dose recomendada para cada espécie ou cultivar; a fonte de material orgânico, de onde foi extraída e; as características físico-químicas específicas das substâncias húmicas a serem utilizadas (VAUGHAN e MALCOLM, 1985; RODDA *et al.*, 2006; ZANDONADI *et al.*, 2014).

A aplicação de SH na produtividade de culturas agrícolas e pecuárias de interesse comercial vem sendo estudada e confirmando seu uso para a promoção de crescimento de diversas culturas, como abacaxi (BALDOTTO *et al.*, 2009), arroz (TEJADA e GONZÁLES, 2004), videira (FERRARA e BRUNETTI, 2008), cana-de-açúcar e milho testados em casa de vegetação

(MARQUES JUNIOR *et al.*, 2008; CONCEIÇÃO *et al.*, 2009; OLIVARES *et al.*, 2017). Outros estudos demonstram o efeito da aplicação de AH com potássio (K) no crescimento de pepino, ROSA *et al.*, (2009) estudou a adição de diferentes doses SH extraídas de carvão mineral, em plantas de feijão observando um aumento na produção de massa seca da parte aérea e as concentrações de P, K, Ca, Mg, em tomateiro BERNARDES *et al.*, (2011) utilizando produto comercial a base de SH e LÜDTKE (2014) avaliou SH extraídas de leonardita no rendimento de alface e cebolinha encontrando um estímulo no crescimento das plantas.

2.2. Rizóbios como fixadores de nitrogênio em associação simbiótica com plantas leguminosas.

As bactérias denominadas rizóbios pertencem ao grupo de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP) e são consideradas o principal grupo de diazotróficos simbióticos, pela sua capacidade de estabelecer associação simbiótica com plantas leguminosas de importância agrícola e fixar de nitrogênio (N), sendo fixadas anualmente de 44 a 66 milhões de toneladas de N, o que representa aproximadamente metade do N utilizado na agricultura (GRAHAM e VANCE, 2003). O processo simbiótico com as plantas pertencentes à família Leguminosae caracteriza-se pela formação de estruturas hipertróficas, nas raízes e, excepcionalmente, no caule, denominadas nódulos.

A palavra rizóbio tem origem do gênero *Rhizobium*, significa “rhizo” = raiz e “bium” = vida: a vida da raiz. Estas bactérias possuem como características em comum que são bacilos Gram negativos, não produzem esporas, aeróbicas e pertencentes ao filo Proteobacteria (ZAKHIA e LAUJUDIE, 2001).

Dentre os rizóbios são conhecidas mais de 100 espécies distribuídas em 16 gêneros, dentre eles encontram-se: *Rhizobium*, *Mezorhizobium*, *Ensifer* (anteriormente *Sinorhizobium*), *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrhobactrum*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Shinella*, *Neorhizorium*, *Pararhizobium* (Classe de α -proteobactérias), *Burkholderia*, *Paraburkholderia* (anteriormente *Burkholderia*), *Cupriavidus* (anteriormente *Ralstonia*) (Classe de β -proteobactérias) (VELÁZQUEZ *et al.*, 2017).

O processo de interação rizóbio-planta inicia pela carência nutricional de nitrogênio (N) da planta que sinaliza aos rizóbios através dos compostos flavonoides exsudados nas raízes. Estes flavonoides, a sua vez encarregam-se de ativar os genes Nod dos rizóbios, que logo vão produzir a sinal de simbiose conhecido como fator Nod que contém diversas substâncias químicas e variam estruturalmente dependendo da espécie do rizóbio; o que é considerado um fator chave que determina a amplitude de plantas hospedeiras (PERRET *et al.*, 2000; MULDER *et al.*, 2005).

Uma vez ocorre a interação inicial planta-rizóbio com as sinalizações e o encurvamento dos pelos radiculares, as bactérias atuam na divisão celular nas células do interior do córtex radicular, sendo estimulada a formação do meristema nodular (CAMARA 2014; GONZALEZ e MARKETON, 2003). Em seguida, as bactérias retidas no pelo radicular encurvado induz a formação do cordão de infecção de origem vegetal, que logo penetra as células radiculares e as bactérias colonizam no interior atingindo os espaços intracelulares (GONZALEZ e MARKETON, 2003).

Essa capacidade de fixar N biologicamente ocorre devido ao complexo enzimático nitrogenase, que converte o N₂ em amônio e assim disponibiliza nitrogênio para as plantas (NUNES *et al.*, 2003). Quando os rizóbios não estão em associação com leguminosas encontram-se no solo de vida livre, com nutrição saprofítica.

2.2.1. Associação simbiótica de *Leucaena leucocephala* com rizóbios.

A planta de *Leucaena* é considerada uma hospedeira promíscua devido a que pode ser infectada e produzir nódulos por mais de três gêneros de bactérias, dentre *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Cupriavidus* (MOREIRA *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2006; HERNÁNDEZ *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2013; BUENO e CAMARGO, 2015).

Diversas pesquisas realizadas indicam que a nodulação desta planta ocorre preferencialmente com rizóbios de crescimento rápido nos gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium* (MOREIRA *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1999; BALA

e GILLER, 2001; BALA *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2006; HERNANDEZ e MILIAN, 2010; SILVA *et al.*, 2012; HERNANDEZ *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2013), sendo avaliada a eficiência na fixação biológica de nitrogênio.

2.2.2. Associação simbiótica de feijão-fava (*Phaseolus lunatus*) com rizóbios.

O estudo da diversidade e associação simbiótica de rizóbios com plantas de *Phaseolus lunatus* se limava a seu lugar de origem no Peru e México onde se tem reportado que estas plantas podem ser infestadas por rizóbios dos gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, formando nódulos (ORMEÑO-ORRILLO *et al.*, 2007). Logo depois, em outro trabalho foi reportado que *P. lunatus* também pode ser infectado e formar nódulos com rizóbios do gênero *Bradyrhizobium*, sendo reportadas duas novas espécies de *B. paxllaeri* e *B. icense* em Peru (DURAN *et al.*, 2014).

Entre tanto, no Brasil os estudos de rizóbios simbiontes de *P. lunatus* são escassos devido a que *P. lunatus* não é uma leguminosa nativa, que logo foi introduzida no nordeste brasileiro, sendo conduzidos os primeiros trabalhos nessa região onde foi observado que a infecção pelo rizóbio e nodulação de plantas de feijão-fava ocorre antes dos 30 dias após, enquanto o período de maior nodulação e massa dos nódulos ocorre na floração entre 45 e 60 dias após a emergência (SANTOS *et al.*, 2009). Além disso, foi encontrada a grande diversidade morfológica e fisiológica entre os rizóbios simbiontes de *P. lunatus* no Estado do Piauí, nordeste do Brasil, sendo reportados os gêneros *Sinorhizobium*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (SANTOS *et al.*, 2011).

Em relação a estudos da avaliação da eficiência de rizóbios na fixação biológica de nitrogênio (FBN), ANTUNES *et al.*, (2011) avaliaram a eficiência de alguns isolados de rizóbios simbiontes de *P. lunatus* coletados e descritos por SANTOS (2008), comparado com estirpes CIAT 899 e NGR 234 recomendadas para feijão comum, encontrando que 8 isolados foram eficientes na FBN e contribuíram à maior acumulação de N nas plantas que a estirpes.

Em outro estudo foi relatada a efetividade da inoculação de sementes de feijão-fava variedade Boca de Moça e Branca com rizóbios isolados de solos da microrregião do Médio Parnaíba Piauiense (COSTA NETO, 2016).

2.3. Rizóbios como promotores de crescimento em gramíneas.

Os rizóbios sempre foram estudados como rizobactérias fixadoras de nitrogênio em simbiose com leguminosas até as décadas de 1990 e 2000, onde foram conduzidos os primeiros estudos em plantas não leguminosas de importância agrícola (NOEL *et al.*, 1996; WEBSTER *et al.*, 1997; YANNI *et al.*, 1997; ANTOUN, 1998), que eram motivados por observações no campo, onde as plantas de arroz cultivadas nas mesmas condições agronômicas de solo, manejo e adubação em sucessão com a leguminosa de trevo, produziam mais que aquelas que não estavam em sucessão (YANNI *et al.*, 2001).

Posteriormente, foi relatada que a colonização de rizóbios nas gramíneas acontece bem diferente do que nas leguminosas, onde as bactérias penetram o interior do tecido vegetal por meio das raízes, caules e folhas da gramínea ocasionando fissuras e inserções radiculares sem gerar danos que possam desenvolver doenças (REDDY *et al.*, 1997; WEBSTER *et al.*, 1997; YANNI *et al.*, 1997; CHI *et al.*, 2005). Nas gramíneas, os mecanismos de promoção de crescimentos utilizados por rizóbios encontram-se a produção de substâncias fito-estimuladoras como auxinas (BISWAS *et al.*, 2000; ERUM e BANO, 2008), citocininas (PERSELLO-CARTIEAUX *et al.*, 2003) e giberelinas (YANNI *et al.*, 2001; ERUM e BANO, 2008), que influencia o aumento do rendimento da produtividade dos cultivos.

Existem diversos estudos que demonstram os benefícios da inoculação de rizóbios na promoção de crescimento de gramíneas como o milho (HAHN *et al.*, 2014; SANTOS, 2018), arroz (YANNI *et al.*, 1997; BISWAS *et al.*, 2000; OSÓRIO FILHO *et al.*, 2014; SANTOS, 2018), cevada (MIRANSARI e SMITH, 2009), capim Tanzânia e a pensacola (MACHADO *et al.*, 2011), o milheto e sorgo (MACHADO, 2015).

2.4. *Azospirillum sp* como promotor de crescimento de plantas

O gênero *Azospirillum* é um gênero de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP), pertencentes ao filo Proteobactéria, de morfologia bacilar e curvada, Gram negativas, aeróbicas, não fermentativas, (REIS *et al.*, 2007), com capacidade de colonizar mais de cem espécies de plantas e contribuir no seu desenvolvimento e produtividade em campo

(BASHAN e DE-BASHAN, 2010); principalmente da família *Poaceae* (gramíneas) de importância agrícola e econômica (POVINELI, 2012), fixando nitrogênio endofiticamente (HUNGRIA, 2011).

Além disso, também podem atuar endofiticamente em outras famílias vegetais, como em diversas espécies de monocotiledôneas, dicotiledôneas herbáceas, arbustivas e arbóreas (LANGE e MOREIRA, 2002). Quando *Azospirillum* sp. não estão em associação com alguma espécie vegetal, atuam como micro-organismos de vida livre no solo, podendo efetuar a fixação de N (HUNGRIA, 2011), sendo assim consideradas fixadoras de nitrogênio associativas facultativas (BALDANI *et al.*, 1997).

No gênero *Azospirillum* encontram-se quinze espécies identificadas: *A. lipoferum* e *A. brasilense* (TARRANT *et al.*, 1978), *A. amazonense* (MAGALHÃES *et al.*, 1983), *A. halopraeferens* (REINHOLD *et al.*, 1987), *A. irakense* (KHAMMAS *et al.*, 1989), *A. largomobile* (DEKHILL *et al.*, 1997), *A. doebereineriae* (ECKERT *et al.*, 2001), *A. oryzae* (XIE e YOKOTA, 2005), *A. melinis* (PENG *et al.*, 2006), *A. canadense* (MEHNAZ *et al.*, 2007a), *A. zae* (MEHNAZ *et al.*, 2007b), *A. rugosum* (YOUNG *et al.*, 2008), *A. palatum* (ZHOU *et al.*, 2009), *A. picis* (LIN *et al.*, 2009) e *A. thiophilum* (LAVRINENKO *et al.*, 2010), sendo *A. brasilense* em termos de fisiologia e genética a mais estudada e produzida como inoculante (REIS *et al.*, 2007; CASSAN e DIAZ-ZORITA, 2016).

Estas rizobactérias são reconhecidas por fixarem nitrogênio endofiticamente no tecido das gramíneas, sendo descoberto este mecanismo na década de 1970 pela pesquisadora Johanna Döbereiner e proposto como o primeiro mecanismo de promoção de crescimento (OKON *et al.*, 1983). Em associações de gramíneas não há formação de nódulos como acontece nas leguminosas; o que ocorre é a colonização da superfície ou interior das raízes e parte aérea das plantas. Nesse sentido, a contribuição da FBN por *Azospirillum* sp. na nutrição de plantas não é tão significativa, pois bactérias associativas excretam uma parte do N fixado para planta, suprimindo assim uma parte da necessidade do N das plantas, contrastando com o que ocorre na simbiose entre leguminosas e rizóbios onde a FBN é significativa (HUNGRIA *et al.*, 2010).

Outros dos mecanismos de promoção de crescimento de plantas efetuados por bactérias do gênero *Azospirillum*, amplamente reconhecidos, são

a produção de substâncias fitoestimuladoras, como o ácido indol-acético, o ácido giberélico, o ácido abscísico e o etileno (PERRIG *et al.*, 2007), as quais proporcionam melhor crescimento radicular (OKON e VANDERLEYDEN, 1997); aumentando a superfície de absorção das raízes da planta, o volume de substrato do solo explorado, facilitando maior absorção de água e nutrientes (BASHAN *et al.*, 2004; CORREA *et al.*, 2008; HUNGRIA, 2011).

Em relação à inoculação de *Azospirillum* sp., os estudos mostram que esse gênero promove o crescimento, o desenvolvendo e a produtividade de diversos cultivos agrícolas (BASHAN e DE-BASHAN, 2010; DARTORA, 2016). Porém, a resposta da inoculação com *Azospirillum* sp. depende do genótipo da planta, da concentração e qualidade das células bacterianas utilizadas, das condições ambientais e as boas práticas agrícolas (MATSUMURA *et al.*, 2015).

Dentre deste gênero, há no mercado de produtos comerciais à base da espécie *Azospirillum brasilense* (CASSAN e DIAZ-ZORITA, 2016), com bactérias recomendadas para o milho (QUADROS, 2009; HUNGRIA *et al.*, 2010; MARINI *et al.*, 2015; MULLER *et al.*, 2016), trigo (HUNGRIA, 2011), cana de açúcar (REIS *et al.*, 2009), arroz (PEDRAZA *et al.*, 2009; REICHEMBACK *et al.*, 2011, HAHN, 2013), sorgo, algodão, fumo, aveia branca e alface (CASSAN e DIAZ-ZORITA, 2016).

2.5. Técnica de co-inoculação de rizóbios e *Azospirillum brasilense*

A técnica de co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* começou no ano 2016 a ser recomendada para espécies leguminosas pela Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola – RELARE. Essa técnica promissora que vinha sendo explorada no Brasil, consiste na mistura de inoculantes comerciais que contem essas RPCP. Os benefícios pelo uso desta técnica foram evidenciados nos primeiros estudos conduzidos em soja e feijão-comum, onde evidenciou-se aumentos no crescimento, desenvolvimento e produtividade dos cultivos, quando comparada com a inoculação isolada das rizobactérias (HUNGRIA *et al.*, 2013).

Nas leguminosas, quando é utilizada essa técnica, os rizóbios utilizam o mecanismo de fixação biológica de nitrogênio, enquanto *A. brasilense* utiliza

como mecanismo de promoção de crescimento a produção de fitohormônios, como o ácido indol-acético, ácido giberélico e ácido abscísico (PERRIG *et al.*, 2007).

Nas gramíneas, a técnica de co-inoculação rizóbios e *A. brasilense* também tem sido utilizada, onde não há formação de nódulos e os rizóbios em associação tem a capacidade na maior parte de produzir fitohormônios entre outros mecanismos das RPCP, enquanto *A. brasilense* supre a necessidade de N parcialmente para o desenvolvimento da planta (HUNGRIA *et al.*, 2007), obtendo-se maior crescimento, modificação da cinética da absorção de N e aumentos na produtividade (HAHN *et al.*, 2013; SANTOS, 2018).

2.6. Plantas leguminosas avaliadas no presente estudo: leucena e feijão-fava

A leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) é uma leguminosa arbórea, nativa da América Central, encontrada amplamente distribuída nas regiões tropicais e considerada uma das forrageiras mais promissoras para a região semiárida, por se adaptar as condições edafoclimáticas da região do Nordeste brasileiro (SOUSA *et al.*, 2005). O crescimento desta planta pode ocorrer naturalmente em uma grande variedade de solos, incluindo solos ligeiramente ácidos (SHELTON e BREWBAKER, 1994).

Esta leguminosa forrageira pertencente à subfamília Mimosoideae, eficiente na fixação biológica de nitrogênio pelo aporte na média de 177 - 247 kg.ha⁻¹ de nitrogênio, além de apresentar alto teor de N nas folhas (1,3 %) e alta produção de biomassa no redor de 5 t.ha⁻¹ (SZOTT *et al.*, 1991; TIAN *et al.*, 1992; NASCIMENTO e SILVA, 2004). Apesar de ser considerada uma planta invasora pela sua ocorrência natural nos ecossistemas (COSTA e DURIGAN, 2010), é utilizada para recuperação da cobertura vegetal, sistemas agroflorestais ou agrosilvipastoris, forragem, alimentação humana, lenha, madeira, adubo verde, sombra, apoio para espécies escandentes, quebra-ventos e controle de erosão (SHELTON e BREWBAKER, 1994; ALMEIDA *et al.*, 2006; COSTA e DURIGAN, 2010).

A espécie *Phaseolus lunatus* L. é conhecida popularmente por diversos nomes comuns, entre eles fava, feijão-fava, feijão-de-lima, feijol,

mangalô-amargo, fava-belém, fava-terra, feijão espadinho, feijão-farinha, feijão-favona e feijão-fígado-de-galinha (ANTUNES, 2010). Sua origem é andina, possuindo três grupos genéticos distribuídos geograficamente, sendo um andino restrito ao Equador e Peru, e dois mesoamericanos que são largamente distribuídos numa área que vai do México até a Argentina e o Caribe, principalmente em altitudes do nível do mar até 1600 metros (SERRANO-SERRANO *et al.*, 2010). Estes materiais, se diferenciam pelas características das sementes, onde as mesoamericanas são pequenas e o andino grandes (BAUDOIN *et al.*, 2004).

O cultivo do feijão-fava tem melhor desenvolvimento em solos arenos-argilosos, férteis e bem drenados, tendo bom rendimento com pH entre 5,6 e 6,8. No Brasil, é cultivado em todas as regiões brasileiras, principalmente na região Nordeste, destacando-se os estados da Paraíba, Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Piauí (VIEIRA, 1992; SANTOS, 2008; ANTUNES, 2010; ARAUJO *et al.*, 2015).

No Rio Grande do Sul, a espécie apresenta diversidade de genótipos, o cultivar olho de cabra preto, olho de cabra vermelho e branco, porém, seu cultivo é limitado e realizado por pequenos produtores devido à tradição do consumo do feijão-comum e à falta de cultivares recomendadas para as condições climáticas da região (DUARTE, 2012).

2.7. Plantas gramíneas avaliadas no presente estudo: milho e aveia preta

O milho (*Zea mays* L.) é um dos grãos importância e de maior volume de produção mundial, havendo sido produzidos na safra 2019/20 mais de 1,1 bilhões de toneladas (USDA, 2020). No Brasil, estima-se uma produção recorde de 101 milhões de toneladas na temporada 2019/20 (CONAB, 2020), sendo considerado o terceiro país maior produtor e o segundo maior exportador mundial de milho.

A produção de altos rendimentos de grãos na cultura do milho assim como as demais gramíneas, é dependente de diversos fatores, das características intrínsecas à planta e das condições climáticas da região de cultivo, o manejo dado à cultura também interfere na produção da lavoura (ARGENTA *et al.*, 2001).

Em relação à fertilidade do solo para gramíneas, o nitrogênio é o nutriente requerido em maior quantidade sendo um fator limitante do teor tanto do rendimento de grãos refletido na proteína dos grãos, como também na qualidade do produto (AMARAL FILHO *et al.*, 2005). Portanto, o milho é dependente nutricional de nitrogênio (CANCELLIER, 2011), o que faz necessário a suplementação mineral com fontes de adubação nitrogenada para conseguir altos rendimentos na produtividade do cultivo (AMADO, 2002; SCALCO *et al.*, 2002).

Entretanto, aveia preta (*Avena strigosa* Schreb) é uma gramínea que produz alta quantidade fitomassa e abundante sistema radical (CALEGARI *et al.*, 1992), amplamente utilizada para produção de pastagem hiberna, como forragem conservada na forma de ensilagem e feno, com produção em grão reduzida (FOTANELLI e PIOVEZAN, 1991).

A importância da aveia preta está nos sistemas de produção agrícola, na rotação de cultura durante o inverno no Estado do Rio Grande do Sul, onde encontram-se consorciada com o cultivo da soja (LOPES *et al.*, 2009), ocupando no Brasil 2 milhões de hectares de área cultivada e interação lavoura-pecuária (EMBRAPA, 2018).

CAPÍTULO III – Selection of native rhizobia in Rio Grande do Sul, Brazil efficient in biological nitrogen fixation in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.)

1. Abstract

The aim of this research was to evaluate the capacity of symbiotic efficiency of native rhizobia from soils of the state of Rio Grande do Sul in *Phaseolus lunatus* plants. Soil and nodule samples from predominant legume plants such as *Desmodium* sp. in seven locations in the state of RS were collected. For the isolation of the rhizobia from the soil samples, lima bean “olho de cabra preto” variety and “leucena” (*Leucena leucocephala*) and plants were used as baits. Subsequently, the symbiotic characterization of the isolates was performed by inoculation on lima bean plants in vitro conditions. The selected bacterial isolates were evaluated for biological nitrogen fixation efficiency in a greenhouse experiment, being determined after: shoot dry mass, root dry mass, nodule dry mass, nitrogen (N) accumulated shoot and calculated the N fixation relative efficiency index. Among the 28 isolated rhizobia tested, 11 induced nodule formation in lima bean. The rhizobia Plu03 and Plu14 stimulated a greater increase of plant dry mass, nodule dry mass and nitrogen accumulation in the shoot, reflecting in a higher relative efficiency index. The isolates Plu03 and Plu14 are more efficient in promoting growth of lima bean, which can be recommended for future agronomic efficiency studies.

Keywords: Rhizobia, lima bean, biological nitrogen fixation

2. Introduction

Lima bean (*Phaseolus lunatus*), also known in Brazil as “feijão-fava” or “espadinho” beans in Brazil are considered the second most important species of the genera *Phaseolus*, after common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), due to its characteristics as drought and excess moisture resistance and protein potential, representing a source of food and income for small farmers (FOFANA *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 1992).

In Brazil, it is cultivated in all Brazilian regions, mainly in the Northeast region, especially the states of Paraíba, Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte and Piauí (VIEIRA, 1992; SANTOS, 2008; ANTUNES, 2011; ARAUJO *et al.*, 2015; ARAUJO *et al.*, 2016). In the state of Rio Grande do Sul, the species has a diversity of genotypes, the variety “olho de cabra preto”, “olho de cabra vermelho” and “Branco”, however, its cultivation is limited and carried out by small producers due to the tradition of consuming common bean and the lack of cultivars recommended for the subtropical climatic conditions of the region (DUARTE, 2012).

This crop has the ability to establish symbiosis with rhizobia, where biological nitrogen fixation (BNF) occurs, which is considered one of the forms of sustainable increase in legume productivity and allows the replacement of mineral nitrogen fertilizers (FRANCO *et al.*, 2002). The study of the diversity and symbiotic association of rhizobia with *P. lunatus* was limited to countries with research centers such as Peru and Mexico, where it has been reported that *P. lunatus* forms symbiosis mainly with *Bradyrhizobium* sp. (ORMEÑO-ORRILLO *et al.*, 2006; LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2013; DURAN *et al.*, 2014), being reported by DURAN *et al.*, (2014) two new species of *Bradyrhizobium* (*B. paxllaeri* and *B. icense*) in Peru. In addition, ORMEÑO-ORRILLO *et al.* (2007) reported that strains of the genera *Rhizobium* and *Sinorhizobium* also induced lima bean nodules.

However, in Brazil, studies with lima bean symbiotic rhizobia are limited because *P. lunatus* is not a native legume, but a great morphological and physiological diversity has been found among native nodulant rhizobia of *P. lunatus* in the northeast of Brazil, being reported the genera *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* and *Rhizobium* (ARAUJO *et*

al., 2015; SANTOS *et al.*, 2011). Many studies demonstrate that although some rhizobia have a restricted host range (SANTAMARÍA *et al.*, 2014), in *P. lunatus* low host specificity is observed and symbiosis with rhizobia strains of more than four genera is established.

The selection of rhizobia isolates efficient in BNF in *P. lunatus* are scarce in Brazil, with only a few studies performed in the northeast region of Brazil. Among these studies, the efficiency BNF of rhizobia isolates in *P. lunatus* genotype UFPI-468 “fava-miuda” variety compared to strain SEMIA 4077 - CIAT 899 (strains recommended for common bean - *P. vulgaris* inoculant production) and SEMIA 6357 (NGR 234) symbiont of diversity legumes has been evaluated. The authors observed that eight of the rhizobia isolates contributed to the increase in shoot dry mass, higher N accumulation, reflecting a higher efficiency of these isolated in BNF, compared to the reference strains (ANTUNES *et al.*, 2011). Similarly, in another study, four isolated of the genera *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* were evaluated for their symbiotic performance in “boca de moça” and “branca” varieties. The authors reported that plants inoculated with isolated of the genera *Bradyrhizobium* showed higher growth, nodulation and nitrogen content, reflecting higher photosynthetic efficiency compared to plants inoculated with *Rhizobium* isolated (COSTA NETO *et al.*, 2017).

Currently, in the state of Rio Grande do Sul, Brazil there are not native isolates or strains released like inoculants for *P. lunatus*. Therefore, there is a need to isolate and select *P. lunatus* natives nodulant rhizobia, efficient in BNF that contribute to increased sustainable productivity. In this sense, the objective of this research was to evaluate the capacity of symbiotic efficiency of native rhizobia from soils of the state of Rio Grande do Sul in *P. lunatus* plants

3. Materials and Methods

Study site

The study was conducted at the Soil Microbiology Laboratory and in the greenhouse of the Soil Department of the Federal University of Rio Grande

do Sul (UFRGS). Soil samples were collected from different locations in rural area of Rio Grande do Sul (Table 1). The soil samples were collected at a depth of 0-20 cm, considering the presence of native or introduced leguminous plants. Root nodules were also collected from *Desmodium* sp plants at the UFRGS Agronomic Experimental Station (EEA), in Eldorado do Sul – RS, Brazil.

Table 1. Locations and georeferencing of soil and nodule samples.

Sample of soil	Location	Latitude (S)	Longitude (O)	Predominant legume on location
1	Eldorado do Sul - RS	30°5'19.03"	51°40'28.21"	<i>Desmodium</i> sp.
2	Eldorado do Sul – RS	30°5'16.75"	51°40'29.24"	<i>Desmodium</i> sp.
3	Eldorado do Sul – RS	30°6'58.50"	51°39'57.98"	Bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i>)
4	Porto Alegre – RS	30°4'15.87"	51°8'20.55"	<i>Leucena</i> (<i>Leucena leucocephala</i>)
5	Viamão – RS	30°7'43.57"	51°4'4.44"	Maricá (<i>Mimosa bimucronata</i>)
6	Viamão – RS	30°7'51.18"	51°3'58.67"	Inga (<i>Inga marginta</i>)
7	Viamão – RS	30°7'50.46"	51°4'0.46"	Unidentified tree

Isolation and characterization of rhizobia colonies from soil samples and nodules collected in the field

The soil samples were taken to the Soil Microbiology Laboratory where a suspension of 10 g of soil in 90 mL of sterile saline solution (NaCl 0.85%) was performed on horizontal shaker for three hours. In the installation of the experiment were used lima bean seeds “olho de cabra preto” variety provided by the producer and “leucena” (*Leucaena leucocephala*) collected at the EEA-UFRGS as bait plants to obtain nodules. The seeds were disinfected by successive immersion in alcohol (70%) for 30 seconds, sodium hypochlorite (2.5%) for 30 seconds and immediately received six consecutive washes with sterile distilled water (VINCENT, 1970). Then, seeds of leucena and lima bean were seeded separately in plastic pots with a mixture of vermiculite and sand (2:1) and inoculated immediately with addition of 2 mL of the suspensions of the soil samples in each pot, with 5 replications for each soil sample. The plants of leucena was irrigated with SARRUGE (1975) nutrient solution and lima beans with HOAGLAND & ARNON (1950) nutrient solution modified by SILVEIRA *et al.*, (1998) during the experiment and cultivated under laboratory conditions.

After 45 days from inoculation, the root of the leucena and lima bean

plants were removed and nodules with alcohol (70%) for 30s, followed by sodium hypochlorite solution (1%) for 30s and seven washes with sterile distilled water. Then, in laminar flow chamber each nodule was placed in sterile test tubes and macerated with sterile glass rod. The suspension of the macerated nodules was inoculated on plates with Yeast Mannitol Agar with Congo Red (YMA+CR) (VINCENT, 1970) in laminar flow chamber using either the drop method (MILES & MISRA, 1988) or streak scattering method separately (BUCK & CLEVERDON, 1960). After the plates were incubated in an incubator at 28 ± 2 °C for 10 days. The nodules of *Desmodium* sp. collected in the field were disinfected and processed in the same way as the leucena and lima bean nodules described before.

All bacterial isolates were transferred to other plates with YMA+CR to obtain colonies with persistent morphology, and daily evaluation of bacterial colony growth in order to analyse the colony morphology. The colony diameter and color, border type, opacity and consistency, growth time were also observed. In addition, the pH change of the YMA with bromothymol blue (YMA+BB) was evaluated. All isolated obtained were maintained in LMA medium test tubes (VINCENT, 1970) in refrigerator.

Evaluation of rhizobia isolates symbiotic capacity in lima bean plants.

Rhizobia isolates obtained from nodules of lima bean and *Desmodium* sp., in addition to the rhizobia isolates from leucena nodules were evaluated for their ability to induce nodulation in lima bean plants growing on laboratory conditions. For this, each isolate was inoculated into falcon tubes with 30mL of yeast mannitol (YM) broth (VINCENT, 1970) and kept in an orbital incubator at $28 \text{ °C} \pm 2$ with agitation of 120 rpm to achieve a concentration of 10^8 cells.mL⁻¹.

The seeds previously disinfected was placed in 700 mL plastic pots containing a mixture of vermiculite and sand (2:1) and then inoculated with 1 mL of broth from each bacterial isolate with three replications. During the experiment the plants were irrigated with HOAGLAND & ARNON (1950) nutrient solution modified by SILVEIRA *et al.*, (1998) diluted to 50% without nitrogen.

Also, an uninoculated control treatment was conducted to ensure there was no cross contamination. After a period of 45 days the experiment was finished, being observed the root nodules formed and the presence of red color, indicating symbiotic nitrogen fixation.

Evaluation of symbiotic efficiency in nitrogen fixation of rhizobia isolates in lima bean plants.

This experiment was conducted under greenhouse conditions. The rhizobia tested, 11 isolates from lima bean (Plu01, Plu02, Plu03, Plu05, Plu06, Plu08, Plu08, Plu09, Plu11, Plu13 and Plu14) and the strains SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici* CIAT 899) and SEMIA 6357 (NGR 234) were evaluated. The strain SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici* CIAT 899) is released by the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA) from Brazil for the production of commercial inoculants to common bean (*Phaseolus vulgaris*) and SEMIA 6357 has been included in the experiment due to BNF efficiency in cowpea (genotype “UFPI-468” – “Fava miúda” variety) (ANTUNES *et al.*, 2011). These strains were obtained from the rhizobia collection SEMIA of the Department of Diagnostic and Agricultural Research (DDPA) from Brazil. The inoculum from each of the isolates and strains were incubated to a concentration of 10^8 cells.mL⁻¹ in YM broth, the same way as previously described in the evaluation of the symbiotic capacity of the isolates.

In this experiment seeds of lima bean were used, which were previously disinfected by the method described before. After disinfection, the seeds were planted in 1.5 L plastic pots, containing a mixture of vermiculite and sand (2:1) and then inoculated with 2 mL of broth from each isolated studied. One week later roughing was done leaving one plant per pot and put a sterile iron stand to help the plant curl up and stand up.

The experimental design was randomized blocks with 14 inoculated treatments and two controls non-inoculated, one without nitrogen (Control-N) and the second with addition of nitrogen (Control+N) at a dose of N equivalent to 100 kg.ha⁻¹ receiving NH₄NO₃, being divided into 5 applications of 10 mL of a solution of (4,28 g.L⁻¹) NH₄NO₃ during the experiment. After the 45 days of cultivation period, the plants were collected by separating the shoot from the

root system. Shoot dry mass (SDM), root dry mass (RDM), nodule dry mass (NDM) were evaluated, and then the nitrogen accumulated N (Nac) in the shoot.

For this, the shoot was packed in paper bags and dried in oven with forced air circulation at 65°C for three days and then ground for the quantification of nitrogen by the method described by TEDESCO *et al.*, (1995). The roots were washed to remove adhered substrate particles and the nodules were removed and dried separately from the bag roots under the same conditions as before and weighed in the balance. The relative efficiency index (REI) was determined according to BROCKWELL *et al.*, (1966) of BNF of rhizobia isolates and strains.

The REI was calculated using the formula $REI = ((NT - NT-N) / (NT + N - NT-N)) \times 100$ where: NT = total nitrogen of plant of inoculated treatment; NT-N = total nitrogen of control uninoculated and without nitrogen; NT + N = total nitrogen of control uninoculated and receiving nitrogen supplementation (BROCKWELL *et al.*, 1966).

Statistical analysis

The data obtained were submitted to the analysis of variance, being the comparison of averages performed by the test of Tukey ($p < 0,05$) using the statistical program SPSS 15.

4. RESULTS

Rhizobia isolates obtained.

With the sampling and isolation studies, 28 bacterial isolates were obtained from soil samples and nodules: 14 isolates were obtained from soil samples (6 and 7) using lima bean as bait; 12 were isolated of nodules of *Desmodium* sp. collected in the field at location Eldorado do Sul; and 2 isolates were obtained from soil sample 4 using leucena as bait (Table 2).

Table 2. Origin, phenotypic characteristics, growth time in YMA+RC, acidic or alkaline reaction in YMA+BB, and authentication of rhizobia isolates obtained from Rio Grande do Sul soils and nodules, evaluated as symbiont of lima bean.

Isolated	Origin/ Sample number	Form	Margin	Elevation	Color	Opacity	Consistency	Growth time (days)	Diameter (mm)	Nodules Fix (+) in lima bean*	Reaction acid/alkaline YMA+BB
Des01	Eldorado do Sul city/ 1	Circular	Entire	Convex	Pink	Opaque	Gummy	4	5	-	Acid
Des04	Eldorado do Sul city/ 1	Circular	Entire	Convex	White	Opaque	Gummy	4	7	-	Acid
Des05	Eldorado do Sul city/ 1	Circular	Entire	Convex	White	Opaque	Gummy	3	7	-	Acid
Des06	Eldorado do Sul city/ 1	Circular	Entire	Convex	White	Bright	Gummy	4	5	-	Acid
Des08	Eldorado do Sul city/1	Circular	Entire	Convex	White	Opaque	Gummy	3	6	-	Acid
Des09	Eldorado do Sul city/ 1	Circular	Entire	Convex	White	Opaque	Gummy	4	5	-	Alkaline
Des14	Eldorado do Sul city/ 2	Circular	Entire	Convex	White	Opaque	Gummy	4	5	-	Acid
Des15	Eldorado do Sul city / 2	Circular	Entire	Convex	White	Opaque	Gummy	3	4	-	Acid
Des21	Eldorado do Sul city/ 3	Circular	Entire	Convex	White	Opaque	Gummy	3	4	-	Acid
Des22	Eldorado do Sul city/ 3	Circular	Entire	Convex	Pink	Opaque	Gummy	4	4	-	Acid

Des23	Eldorado do Sul city/ 3	Circular	Entire	Convex	Pink	Opaque	Gummy	4	5	-	Acid
Des26	Eldorado do Sul city/ 3	Circular	Entire	Convex	Pink	Bright	Gummy	4	9	-	Acid
Leu01	Porto Alegre city/ 4	Circular	Entire	Convex	White	Opaque	Gummy	3	4	-	Acid
Leu02	Porto Alegre city/ 4	Circular	Entire	Convex	White	Opaque	Gummy	3	3	-	Acid
Plu01	Viamão city/ 7	Circular	Entire	Convex	Pink	Bright	Gummy	2	2	+	Acid
Plu02	Viamão city/ 7	Circular	Entire	Convex	Pink	Bright	Gummy	2	3	+	Acid
Plu03	Viamão city/ 7	Punctiform	Entire	Convex	Pink	Bright	Aqueous	8	1	+	Alkaline
Plu04	Viamão city/ 7	Circular	Entire	Convex	White	Bright	Gummy	3	4	-	Acid
Plu05	Viamão city/ 7	Punctiform	Entire	Convex	Pink	Opaque	Aqueous	7	1	+	Alkaline
Plu06	Viamão city/ 7	Punctiform	Entire	Convex	Pink	Bright	Aqueous	7	1	+	Alkaline
Plu07	Viamão city/ 7	Circular	Entire	Convex	Pink	Opaque	Aqueous	3	1	+	Acid
Plu08	Viamão city/ 7	Punctiform	Entire	Convex	Pink	Bright	Gummy	5	1	+	Alkaline
Plu09	Viamão city/ 7	Circular	Entire	Convex	Pink	Bright	Aqueous	5	≤ 1	+	Acid
Plu10	Viamão city/ 7	Punctiform	Entire	Convex	Pink	Opaque	Aqueous	5	1,5	-	Alkaline
Plu11	Viamão city/ 7	Punctiform	Entire	Convex	Pink	Opaque	Aqueous	5	≤ 1	+	Alkaline
Plu12	Viamão city/ 6	Punctiform	Entire	Convex	Pink	Bright	Aqueous	5	≤ 1	-	Alkaline
Plu13	Viamão city/ 7	Circular	Entire	Convex	Pink	Opaque	Aqueous	5	1	+	Acid
Plu14	Viamão city/ 7	Punctiform	Entire	Convex	Pink	Opaque	Aqueous	5	≤ 1	+	Alkaline

Des: *Desmodium* sp; Plu: *Phaseolus lunatus*; YMA+BB: Yeast Mannitol Agar+ Blue de Bromothymol. * The authentication of the isolates was determined by the leg hemoglobin activity evidenced in the lima bean nodules being considered active.

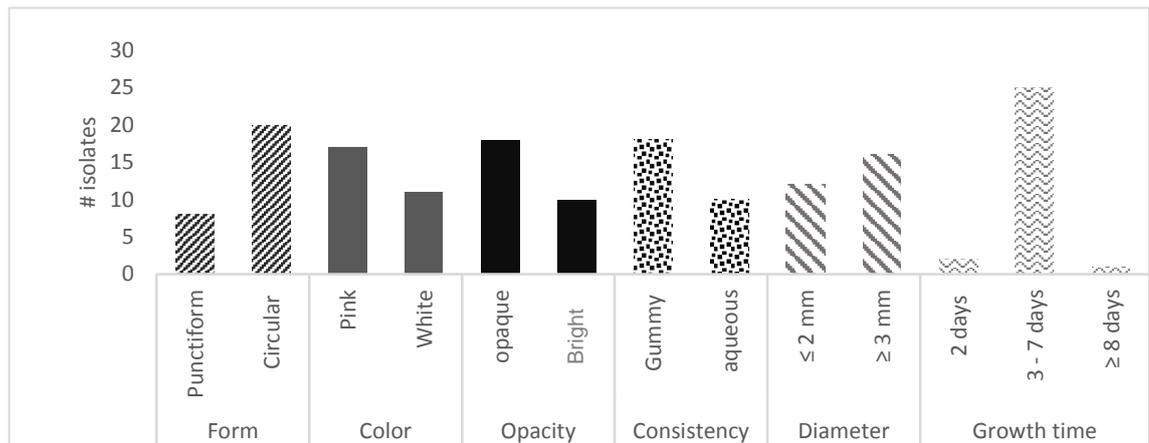


Figure 1. Characteristics of rhizobia isolates obtained from soil and nodules samples collected in the field.

All isolates showed colony morphology with convex elevation and entire border, in addition to the characteristics such as: surface form (circular or punctiform), color (white or pink), opacity (opaque or bright), consistency (gummy or aqueous), time of first colony onset (between 2 - 8 days) and diameter (≤ 1 mm or more) could be presumptive of rhizobia (Figure 1).

The production of acid alkali Related to the reaction in YMA+BB medium it was observed that 14 isolates of lima bean six produced acid reaction (Plu01, Plu02, Plu04, Plu07, Plu09, Plu13) and eight isolates produced alkaline reaction (Plu03, Plu05, Plu06, Plu08, Plu11, Plu12, Plu14). Some bacterial isolates such as Plu03, Plu05, Plu06, besides having growth 7-8 days, generated alkali production in YMA+BB medium, characteristics that could be presumptive of *Bradyrhizobium* genera (SOMASEGARAN & HOBEN, 1994). Among the rhizobia isolate of nodule of *Desmodium* sp., 11 produced acid reaction (Des01, Des04, Des05, Des06, Des08, Des14, Des15, Des21, Des22, Des22, Des26) and one (Des09) produced alkaline reaction. The leucena rhizobia isolates Leu01 and Leu02 produced acid reaction.

The production of acid alkali Related to the reaction in YMA+BB medium it was observed that 14 isolates of lima bean six produced acid reaction (Plu01, Plu02, Plu04, Plu07, Plu09, Plu13) and eight isolates produced alkaline reaction (Plu03, Plu05, Plu06, Plu08, Plu11, Plu12, Plu14). Some bacterial isolates such as Plu03, Plu05, Plu06, besides having growth 7-8 days, generated alkali production in YMA+BB medium, characteristics that could be

presumptive of *Bradyrhizobium* genera (SOMASEGARAN & HOBEN, 1994). Among the rhizobia isolate of nodule of *Desmodium* sp., 11 produced acid reaction (Des01, Des04, Des05, Des06, Des08, Des14, Des15, Des21, Des22, Des22, Des26) and one (Des09) produced alkaline reaction. The leucena rhizobia isolates Leu01 and Leu02 produced acid reaction.

In the rhizobia authentication, the isolates Plu01, Plu02, Plu03, Plu06, Plu07, Plu08, Plu09, Plu11, Plu13 and Plu14 induced nodules and produce leghemoglobin activity in plants of lima bean, being selected to be evaluated in a greenhouse experiment to evaluate the BNF efficiency (Table 2)

Symbiotic efficiency of rhizobia isolates in plants of lima bean.

The values of production of shoot dry mass (SDM), root dry mass (RDM), dry nodule mass (DNM), accumulated nitrogen (Nac) in shoot and Relative Efficiency Index (REI) (BROCKWELL *et al.*, 1966) obtained from lima bean cultivate in a greenhouse, are shown in Table 3. A higher shoot dry mass in treatments inoculated with isolate Plu14 was observed, followed by Plu03 and SEMIA 4077 compared to treatment control with addition of nitrogen (Control+N). Plants inoculated with SEMIA 4077 strain produced similar SDM to Control+N while those inoculated with strain SEMIA 6357 was lower. The other treatments obtained values below the Control+N.

In the variable root dry mass (RDM) was found that the plants inoculated with Plu14 and SEMIA 4077 showed higher RDM compared with Control+N. The other treatments were similar to the Control+N with exception of control non-inoculated without N (Control-N).

The nodules dry mass (NDM) were varied between inoculated treatments. The highest values in plant inoculated with isolates Plu14, Plu03, Plu13 and the strain SEMIA 4077 were obtained, being the isolates Plu14 and Plu03 superior to strain SEMIA 4077 ($p < 0.05$). The plants inoculated with strain SEMIA 6357, followed by inoculated treatments Plu01, Plu02, Plu05, Plu06, Plu07, Plu08, Plu09, Plu11 and Plu13 have low NDM values was found, compared to strain SEMIA 4077 recommended by MAPA for common bean (Table 3).

Table 3. Production of plant. Shoot dry mass (SDM), root dry mass (RDM), nodule dry mass (NDM), accumulated nitrogen (Nac) in shoot, Relative Efficiency Index (REI) (BROCKWELL *et al.*, 1966) on fava bean (*Phaseolus lunatus* L.) cultivated in a greenhouse conditions.

Treatments	SDM (g)	RDM (g)	NDM (mg)	Nac (mg)	REI %
Control+N	4,74 c	1,33 cde	0 g	186 c	100
SEMIA 4077	4,65 c	1,69 a	600 b	182 c	97
SEMIA 6357	2,64 e	1,38 cde	256 c	42 gh	16
Plu01	2,53 e	1,21 e	200 cde	99 e	54
Plu02	2,12 f	1,20 e	188 de	67 f	31
Plu03	5,79 b	1,36 cde	730 a	259 b	146
Plu05	2,52 e	1,38 cde	220 cd	49 g	20
Plu06	3,89 d	1,43 bcd	254 c	99 e	58
Plu07	1,84 fg	1,49 abc	96 f	18 j	2
Plu08	1,51 g	1,23 de	102 f	26 ij	7
Plu09	1,66 g	1,26 de	140 ef	33 hi	25
Plu11	2,77 e	1,50 abc	142 ef	64 f	44
Plu13	4,23 d	1,19 e	554 b	164 d	82
Plu14	6,68 a	1,63 ab	754 a	297 a	164
Control-N	1,84 fg	0,83 f	0 g	14 j	0

Control-N: non-inoculated control treatment without nitrogen; Control+N: non-inoculated control treatment with addition of nitrogen; Plu: isolate of rhizobia, symbiont of lima bean olho de cabra preto variety; SEMIA: strain of rhizobia SEMIA collection. Averages followed by the same letter in the column do not differ among themselves by Tukey test $p < 0.05$ ($n = 5$).

Related to the nitrogen fixation capacity, the isolates Plu14 and Plu03 contributed to a greater accumulation of N in the shoot of plants compared to the plants non-inoculated with addition of N (Control+N) and strain SEMIA 4077 with significant differences ($p < 0.05$), being the isolate Plu14 superior to all treatments (Table 2). In addition, treatment with strain SEMIA 4077 was observed to be similar to non-inoculated control treatment Control+N, while treatment with SEMIA 6357 had a low N accumulation compared to Control + N. The other isolates and Control-N were inferior to the non-inoculated treatment (Control + N).

In this study, the Relative Efficiency Index (REI) according to BROCKWELL *et al.*, (1966), the isolates Plu14 and Plu03 stood out as the most efficient in biological nitrogen fixation, obtaining an REI of 164 and 146 respectively, exceeding 100% of control treatment non-inoculated with addition of N (control+N). The treatment with strain SEMIA 4077 obtained an REI of 97%, followed by treatment with Plu13 isolate of 82%, values close to 100% obtained

by Control+N. However, a low REI was observed in the treatment with strain SEMIA 6357 equivalent to 16% and 2-58% in the other isolates treatments.

5. DISCUSSION

Isolation, selection and diversity studies of rhizobia with ability to perform symbiosis with lima bean still few in Brazil, possibly due to the fact that lima bean (*P. lunatus* L.) is not a native legume in the country (Araujo *et al.*, 2015). Some studies developed in Peru, where it is considered native, Mexico and in the northeast of Brazil, have shown that lima beans can be considered promiscuous because they have low host specificity and form symbiosis with isolates of four rhizobia genera: *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* (ORMEÑO-ORRILLO *et al.*, 2006; ORMEÑO-ORRILLO *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2011; ANTUNES *et al.* 2011; LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2013; SANTAMARIA *et al.*, 2014; DURAN *et al.*, 2014; ARAUJO *et al.*, 2015; SERVIN-GARCIDUEÑAS *et al.*, 2014; ORMEÑO-ORRILLO *et al.*, 2017).

In this study was possible to obtain several bacterial isolates on YMA+RC medium of soil samples collected from different location of the state of Rio Grande do Sul and from root nodules of *Desmodium* sp., being the highest number of rhizobia symbiont of lima bean from soil samples using the same plants as bait. Furthermore, the results showed that the rhizobia obtained from *Desmodium* sp and *L. leucocephala* nodules as bait in soil sample, do not able to form nodules in fava bean olho de cabra preto variety in the symbiotic evaluation test. This is possible because the symbiotic association and nodule formation are dependent on both plant genotype as inoculated isolate and environmental conditions (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Among the rhizobia isolates obtained as lima bean symbionts in this study, some have characteristics that distinguish the genera *Bradyrhizobium*. Similar results were observed in isolates obtained from nodules of lima bean crops in Peru soils, where the genera *Bradyrhizobium* was the predominant symbiont (ORMEÑO-ORRILLO *et al.*, 2006). However, other rhizobia obtained in this study showed rapid growth and acid production, similar to characteristics found in isolates identified as *Rhizobium* sp obtained from lima bean variety “fava miúda” (SANTOS *et al.*, 2011), but the identification of the genera and

species of rhizobia of these isolates obtained in this study requires molecular identification by 16S.

In the evaluation of symbiotic efficiency of isolates of rhizobia, the shot dry mass (SDM) of plants besides being considered an indicator of nutritional status variable in the production of plant cultivation, allows the selection of new isolates to be suggested as strains for the production of inoculants (XAVIER *et al.*, 2006; ZILLI *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2008). In this study, the results showed that Plu03 and Plu14 isolates provided a higher production of SDM compared to non-inoculated control treatments (Control-N and Control+N) and the strain recommended for common bean SEMIA 4077. Similar results were found by ANTUNES *et al.*, (2011) in northeastern of Brazil, in the state of Piauí, where they evaluated the efficiency of some isolates symbiont of UFPI-468 genotype, collected and described by SANTOS (2008), using as criteria the SDM of plants, SEMIA 4077 and SEMIA 6357 (NGR 234) strains and an absolute non-inoculated nitrogen free control (Control-N) as controls. The authors found that 12 isolates evaluated generated in plants a SDM similar to the two strains SEMIA 4077 and SEMIA 6357, which were efficient and higher than the absolute control (Control-N). However, these results also contrast with those obtained in the study in lima bean (Table 3) with strain SEMIA 6357, where low SDM of plants was found under both strain SEMIA 4077, Plu03 and Plu14 isolates and non-inoculated treatment control (Control-N).

Other similar result was found in one study from the state of Piauí, Brazilian northeast, where native isolates of genera *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* were evaluated in lima bean plants of “Boca de Moça” and “Branca” varieties in three evaluation periods (37 days after germination, 50 days after pod emission and 63 days in the declining nitrogen fixation period). The authors reported that plants inoculated with *Bradyrhizobium* (ISOL18) showed a higher continuous increase of SDM of plants during the three periods (COSTA NETO *et al.*, 2017).

In the variable root dry mass (RDM) of plants, the results showed that the plants inoculated with Plu14 isolated and the SEMIA 4077 strain influenced a higher increase of root growth of lima bean plants, being superior to the non-inoculated control treatments (Control + N and Control N). Similar results were

found by COSTA NETO *et al.*, (2017) in the “Boca de Moça” and “Branca” varieties of lima bean inoculated with *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* isolates, where they showed that *Bradyrhizobium* isolate (ISOL18) increased the RDM of plants during the three periods of evaluation. Contrary to the results obtained by ANTUNES *et al.* (2011) in lima bean genotype UFPI-468, where rhizobia isolates had no influence on root growth compared to control (Control-N).

Regarding the nodules dry mass (NDM) is a widely used variable as an indication of nodulation, which allows to determine the best performance of symbiotic association (DÖBEREINER, 1966; BOHRER & HUNGRIA, 1998; HUNGRIA & BOHRER, 2000 FERREIRA & CASTRO, 1995; ARAÚJO *et al.*, 2007), being evidenced in this study the highest performance in the isolates Plu14, Plu03 and Plu13, and strain SEMIA 4077, standing out the isolates Plu14 and Plu03 as superior to strain SEMIA 4077. Similar results were found by COSTA NETO *et al.*, (2017) where the isolate ISOL18 (*Bradyrhizobium* sp) induced a higher NDM in lima bean plants Boca de Moça and Branca varieties. In the same way, ANTUNES *et al.* (2011) reported that seven isolates of lima bean genotype UFPI-468 showed the best nodulation performance, similar to the SEMIA 4077 and SEMIA 6357 strains used as control. Although in our study with lima bean plants inoculated with the SEMIA 6357 strain showed low nodulation, as did the other isolates, (Table 3) and these results can be explained by the fact that nodule formation is dependent on plant genotype, isolate or inoculated strains and environmental conditions (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). varieties compared to *Rhizobium* sp. which showed a low nodulation.

In relation to the nitrogen accumulated (Nac) in shoot of the plants the results indicate that the treatments with the isolates Plu14 and Plu03 presented higher ability to fix N atmospheric by symbiotic association and supply it to the lima bean plant in conditions of this experiment, being superior to the non-inoculated control treatment without N (Control-N), non-inoculated control with N addition (Control + N) and SEMIA 4077 strain. These results are similar and agreement with those found by ANTUNES *et al.* (2011), where showed that eight of the isolates tested in lima bean genotype UFPI-468 also had higher ability to fix N atmospheric. Likewise, the results agree with that found by

COSTA NETO *et al.* (2017), where the isolate ISOL18 stood out for increasing Nac in lima bean Boca de Moça and Branca varieties.

In addition, the strain SEMIA 4077 that had not been evaluated on lima bean olho de cabra preto variety plants facilitated a higher nitrogen accumulation in the shoots similar to non-inoculated control treatment with addition of N (Control + N). This opens the possibility of being recommended for this variety of lima bean in addition to the genotype UFPI-468 where this same strain had higher ability to fix nitrogen (ANTUNES *et al.*, 2011). However, SEMIA 6357 induced a lower accumulation of N in the shoot compared to the control (Control + N), differing from that found by ANTUNES *et al.*, (2011) in the genotype UFPI- 468, where strain SEMIA 6357 showed higher Nac.

The relative efficiency index – REI (BROCKWELL *et al.*, 1966) indicates the percentage efficiency of bacteria on nitrogen fixation in symbiotic association with legumes. The results in this study showed that Plu03 and Plu14 isolates were the most efficient, due to the REI values exceeding 100%, above the minimum efficiency of 70% expected from rhizobia potentially efficient (MIRANDA, 1995). These isolates were the same ones that also presented higher SDM, RDM, DNM and Nac. Likewise, in a study with lima bean genotype UFPI-468, the authors found eight isolates efficient in biological nitrogen fixation (ANTUNES *et al.*, (2011) using the efficiency index according to FARIA & FRANCO (2002).

In case of SEMIA 4077 and SEMIA 6357 strains, the results showed that only SEMIA 4077 strain showed a REI above 70% minimum, differing from that found by ANTUNES *et al.*, (2011) in the lima bean UFPI-468 genotype where SEMIA 6357 was efficient.

6. Conclusion

The rhizobia isolates Plu03 and Plu14 rhizobia are efficient in biological nitrogen fixation in fava bean plants, and may be recommended for future agronomic efficiency studies with strain SEMIA 4077 in different soils, both in the greenhouse and in the field for lima bean olho de cabra preto variety.

CAPÍTULO IV – Rizobios nativos eficientes en la fijación de nitrógeno en *Leucaena leucocephala* en Rio Grande do Sul, Brasil³

1. RESUMO

A seleção de rizóbios autóctones promissores, fixadores de nitrogênio (N) é importante para a produção de leucena utilizada para a produção pecuária. No Rio Grande do Sul (RS), Brasil, existem poucas informações sobre isolados de rizóbios autóctones com capacidade simbiótica com plantas de leucena. O objetivo deste trabalho foi selecionar isolados de rizóbios autóctones, eficientes na fixação biológica de nitrogênio em plantas de leucena no estado do Rio Grande do Sul. Foram coletadas amostras de solo e nódulos em diferentes locais do Estado do Rio Grande do Sul e, logo foram utilizadas sementes de leucena para obter os nódulos que em seguida foram processados em meios de cultura para a obtenção dos isolados. Foi conduzido um experimento em casa de vegetação para avaliar a eficiência dos isolados de rizóbios, determinando-se a massa seca da parte aérea, massa seca da raiz, número de nódulos e nitrogênio acumulado nas plantas. Foram selecionados os isolados de rizóbios Leu01 e Leu02 como eficientes na fixação de N por proporcionarem o aumento da MSPA e acúmulo de N nas plantas de leucaena, semelhante ao tratamento controle não inoculado que recebeu fertilização nitrogenada, sendo estes isolados considerados como promissores que poderiam ser utilizados em outros estudos em casa de vegetação e campo desta leguminosa.

Palavras-chave: Simbioses, leguminosas, promoção de crescimento vegetal.

³ Artigo submetido à revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial

2. Introducción

La producción animal, principalmente la ganadería es una de las actividades más importante en el estado de Rio Grande do Sul, Brasil, siendo los pastos nativos la base para la alimentación animal. La necesidad de incrementar la producción de alimentos para la producción animal ha permitido el estudio de leguminosas como *Leucaena leucocephala* por su versatilidad, siendo utilizada como forraje, integrada con pastos y otros cultivos anuales, el desarrollo de sistemas silvopastoriles y agroforestales, el control de maleza por alelopatía, la recuperación de áreas degradadas y reforestación en suelos tropicales (KAMINSKI *et al.*, 2005; BUENO & CAMARGO, 2015; JETANA, 2016; NICODEMO *et al.*, 2018; CONRAD *et al.*, 2018; ESCALANTE, 2019; KANT *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2019).

En el Estado de Rio Grande do Sul, debido a las condiciones subtropicales como las bajas temperaturas en el invierno y la acidez de los suelos, se han realizado estudios sobre el crecimiento y supervivencia de especies y accesiones de leucaena, dentro de las cuales se encuentra *Leucaena leucocephala*; determinándose una tasa alta de crecimiento y sobrevivencia a las condiciones edafoclimáticas del sur de Brasil, siendo reportada como una de las especies de mayor potencial para ser cultivada (KAMINSKI, 2005).

Por otra parte, algunos estudios demuestran que *L. leucocephala* posee la capacidad de establecer asociación simbiótica con diversos géneros de rizobios como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium* con capacidad de fijar N (BUENO & CAMARGO, 2015; KANG *et al.*, 2018; CUBILLOS-HINOJOSA *et al.*, 2019; RAMIREZ *et al.*, 2020) a través de la formación de estructuras conocidas como nódulos que facilitan la captación de N atmosférico por medio de la fijación biológica de N.

En Brasil, existen cepas de rizobios que se encuentran en la colección SEMIA del Departamento de Diagnóstico e Investigación Agropecuaria (DDPA), recomendadas para leucaena y liberadas para la producción de inoculantes por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Abastecimiento (MAPA) de Brasil. Sin embargo, en el estado de Rio Grande do Sul no se han desarrollado estudios de aislamiento y selección de rizobios nativos, adaptadas a las condiciones subtropicales y capaces de establecer asociación simbiótica con leucaena.

Por tanto, el objetivo de esta investigación fue seleccionar rizobios nativos en el estado de Rio Grande do Sul simbioses de leucaena, eficientes en la fijación biológica de nitrógeno que puedan ser utilizados como inoculantes en los sistemas de producción agropecuaria.

3. Método

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Suelos y en el invernadero del Departamento de Suelos de la Universidad Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Se tomaron muestras de suelo en diferentes lugares de las zonas rurales del estado de Rio Grande do Sul, Brasil (Tabla 1). El muestreo se realizó a juicio a una profundidad de 0-20 cm, considerándose la presencia de plantas leguminosas nativas o introducidas. Adicionalmente, fueron recolectados nódulos de plantas de *Desmodium sp* en la Estación Experimental Agronómica (EEA) de la UFRGS en el municipio Eldorado do Sul.

Tabla 1. Localización de las muestras recolectadas.

Muestra	Lugar	Latitud (S)	Longitud (O)	Leguminosa predominante en el área
1	Eldorado do Sul - RS	30°5'19.03"	51°40'28.21"	<i>Desmodium sp.</i>
2	Eldorado do Sul – RS	30°5'16.75"	51°40'29.24"	<i>Desmodium sp.</i>
3	Eldorado do Sul – RS	30°6'58.50"	51°39'57.98"	Bracatinga (<i>Mimosa sp</i>)
4	Porto Alegre – RS	30°4'15.87"	51°8'20.55"	Leucaena (<i>Leucaena leucocephala</i>)
5	Viamão – RS	30°7'43.57"	51°4'4.44"	Maricá (<i>Mimosa bimucronata</i>)
6	Viamão – RS	30°7'51.18"	51°3'58.67"	Inga (<i>Inga marginta</i>)
7	Viamão – RS	30°7'50.46"	51°4'0.46"	Arbórea sem identificar

Aislamiento y caracterización de rizobios

Las muestras de suelo fueron recolectadas y transportadas al Laboratorio de Microbiología del Suelo y posteriormente se colocaron 10 g de cada muestra en 90 ml de solución salina al 0,85%, manteniéndose en agitación durante tres horas.

Para el aislamiento de rizobios a partir del extracto de suelo se instaló un experimento, utilizando como trampa semillas de plantas de leucaena recolectadas en campo para obtener nódulos. Estas semillas fueron escarificadas con papel de lija No. 100 durante 1 minuto y posteriormente

desinfectadas por inmersión sucesiva en alcohol al 70% durante 30 segundos, hipoclorito de sodio al 2,5% durante 30 segundos e inmediatamente se enjugaron seis veces consecutivas con agua destilada estéril (VINCENT, 1970). Luego, las semillas se sembraron por separado en vasos plásticos que contenían una mezcla de vermiculita y arena (2:1) e inmediatamente se realizó la adición de 2 mL de la suspensión líquida de las muestras de suelo en cada vaso, utilizándose 5 repeticiones para cada muestra. Los vasos fueron regados con la solución nutritiva Sarruge (SARRUGE, 1975), para mantener a las plántulas durante el experimento en condiciones de laboratorio.

Transcurridos 45 días después de adición de la suspensión de suelo, se realizó la separación de los nódulos de las raíces de las plántulas de leucaena y posteriormente se desinfectaron, utilizándose la misma metodología descrita anteriormente (VINCENT, 1970). Posteriormente, en cabina de flujo laminar los nódulos fueron macerados por separado con un bastón de vidrio en tubos de ensayo estériles. La suspensión obtenida de los nódulos macerados se inoculó en placas de Petri con medio de cultivo de levadura manitol con rojo congo (LMR) en cabina de flujo laminar utilizando el método de la gota y dispersión por estrías (MACHADO *et al*, 2016). Seguidamente, las placas fueron incubadas a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 10 días. Los nódulos recogidos en campo de *Desmodium* sp. fueron desinfectados y procesados de la misma manera que fue descrita anteriormente.

Todos los aislamientos bacterianos fueron transferidos a otras cajas de Petri con medio LMR con el propósito de obtener colonias con morfología persistente. Se realizó una evaluación diaria del crecimiento bacteriano de cada placa y con la ayuda de un microscopio estereoscópico, se determinó la morfología colonial, observándose el diámetro y color de la colonia, tipo de borde, opacidad, consistencia y tiempo de crecimiento (TZEC-GAMBOA *et al.*, 2020). Además, se evaluó el cambio de pH en el medio de cultivo de levadura manitol con adición de azul de bromotimol (LMA+AB). Los aislamientos puros se mantuvieron en tubos de ensayo de medio LMA en refrigeración a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Evaluación de la capacidad simbiótica *in vitro* de los aislamientos obtenidos.

Los aislamientos obtenidos a partir de nódulos generados por la adición de la suspensión de las muestras de suelos en plantas de leucaena y los aislamientos obtenidos a partir de nódulos de *Desmodium* sp. recolectados en campo, además de tres cepas de rizobios Vp16, Lc348, Din3 del banco de cepas de rizobios del Laboratorio de Microbiología de Suelos de la UFRGS, fueron evaluados en cuanto a su capacidad para inducir la formación de nódulos en plantas de leucaena en condiciones *in vitro*. Para esto, se usaron tubos de ensayo que contenían 30 mL de solución nutritiva de Sarruge 25% (SARRUGE, 1975) semisólida, previamente esterilizado en autoclave.

Los aislamientos obtenidos fueron transferidos para obtener los inóculos en tubos falcon que contenían 30 mL de medio de cultivo líquido de levadura manitol (LM) y se mantuvieron en una incubadora orbital a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ con agitación a 120 rpm según el tiempo de crecimiento de cada aislamiento, hasta alcanzar una concentración de 10^8 células.mL⁻¹ verificada por medio de recuento en placa.

En cabina de flujo, en cada tubo fue colocado una semilla de leucaena pre-germinada en cabina de flujo laminar, realizándose 3 repeticiones por cada aislamiento bacteriano. Luego, se inoculó 1 mL de caldo de cada aislamiento en cada tubo. Después de la inoculación, los tubos se mantuvieron en un lampadario con 8 h luz por día a temperatura ambiente. Se utilizó como control un tubo no inoculado. Transcurrido un período de 40 días, fue observada la formación de nódulos en las raíces de las plantas y verificado si estos se encontraban activos por la coloración rojiza que genera la actividad de la leg-hemoglobina, que indica fijación biológica de N.

Evaluación de la eficiencia simbiótica en la fijación de nitrógeno por los rizobios.

Los aislamientos de rizobios fueron seleccionados del experimento *in vitro* anteriormente descrito, por su capacidad de inducir la formación de nódulos en plantas de leucaena. Estos aislamientos, fueron evaluados en cuanto a su

eficiencia en la fijación biológica de N en condiciones de invernadero. Para esto, cinco semillas de leucaena previamente escarificadas y desinfectadas fueron sembradas en vasos Leonard, que contenían una mezcla de vermiculita y arena (2:1) en la superior y en la parte inferior solución nutritiva Sarrugue (SARRUGE, 1975) exenta de N. Seguidamente, se realizó la inoculación de las semillas con los aislamientos de rizobios seleccionados, adicionando 2 mL de inóculo en concentración de 10^{-8} células.mL⁻¹. Se utilizaron como tratamiento control las cepas de la colección SEMIA: 6361 (*Bradyrhizobium* sp), 6097 (*Bradyrhizobium* sp), 4077 (*Rhizobium tropici* CIAT 899) recomendadas para leucaena y liberadas por el Ministerio Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento (MAPA) de Brasil para la industria de inoculantes. Una semana después, se hizo el raleo de las plantas dejando solo una planta por vaso.

Se siguió un diseño experimental de bloques al azar con 17 tratamientos y cinco repeticiones, donde fueron evaluados 11 aislamientos, 2 cepas recomendadas de la colección de cepas "SEMIA" de rizobios y dos controles sin inoculación. Uno de estos controles sin inocular fue sin adición de N (Control-N) y el otro con adición de N (Control+N), utilizándose una dosis de N de 100 kg.ha⁻¹ en la forma de nitrato de amonio (NH₄NO₃). Esta dosis de N se adicionó fraccionada, semanalmente en 6 aplicaciones de 10 mL de una solución (1,2 g.L⁻¹) de NH₄NO₃.

Transcurrido un periodo de 60 días de cultivo, las plantas fueron retiradas de los vasos, separando la parte aérea del sistema radicular. Se determinó la masa seca de la parte aérea (MSPA), la masa seca de la raíz (MSR), el número de nódulos (NN) y el nitrógeno total acumulado (Nac) de la parte aérea y posteriormente el índice de eficiencia relativa (IER) (BROCKWELL *et al.*, 1966) de la fijación biológica de N de los aislamientos de rizobios. Para esto, la parte aérea de las plantas se colocó en bolsas de papel y se dejó secando en un horno de circulación forzada a 65 °C durante tres días, luego se procedió a molerlas para la posterior determinación de N (MENEHETTI, 2018). Las raíces fueron lavadas con el fin de eliminar las partículas del sustrato adheridas, los nódulos se separaron para su cuantificación y las raíces se secaron en el horno y se pesaron en la balanza.

El IER se calculó utilizando la fórmula (Ec.1) (BROCKWELL *et al.*, 1966):

$$EFR = ((NT - NT - N) / (NT + N - NT - N)) \times 100 \quad (\text{Ec.1})$$

Donde:

NT = nitrógeno total de la planta con tratamiento inoculado.

NT-N = nitrógeno total del tratamiento control no inoculado y sin adición de nitrógeno, que en este caso fue considerado como 0 mg debido a que la masa seca de este tratamiento fue poca, lo que no permitió su análisis. Sin embargo, las plantas tienen una baja cantidad de nitrógeno que proviene de la reserva de la semilla (EL KADER *et al.*, 2008).

NT+N = nitrógeno total del tratamiento control no inoculado con adición de nitrógeno.

Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza y a la prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0,05$), utilizando el paquete estadístico SPSS 15.

4. Resultados

Aislamientos obtenidos a partir de muestras de suelo.

En el aislamiento a partir de muestras de suelo utilizando plantas de leucaena como trampa para obtener nódulos, se obtuvieron 17 aislamientos, siendo 2 a partir de la muestra 1 (Leu09, Leu10), 2 de la muestra 2 (Leu11, Leu12), 1 de la muestra 3 (Leu13), 8 de la muestra de 4 (Leu01, Leu02, Leu03, Leu04, Leu05, Leu06, Leu07, Leu08), 1 a partir de la muestra 5 (Leu14), 1 de la muestra 6 (Leu15) y 2 de la muestra 7 (Leu16, Leu17). Resultados similares fueron encontrados en un estudio de caracterización de rizobios simbiotes de leucaena en diferentes locales en Mérida (México), donde se obtuvieron 23 aislamientos de rizobios (TZET-GAMBOA, 2020).

Se observó una escasa nodulación a partir de las muestras de suelo de algunos puntos de muestreo y esto puede deberse a que no existían cultivos o plantas de leucaena en estas localidades, con excepción de la muestra 4 donde se obtuvo el mayor número de aislamientos con 47 % (Figura 1) que fue tomada de suelo rizósferico de una planta de leucaena. Las plantas de leucaena se caracterizan por presentar una alta especificidad para establecer asociación simbiótica con rizobios, lo que limita la fijación biológica de N con los rizobios que forman nódulos (HERNANDEZ *et al.*, 2012; CUBILLOS-HINOJOSA *et al.*, 2019). En un estudio de aislamientos de rizobios en diferentes puntos de muestreo en campo, fueron encontrados también una baja nodulación, atribuyendo esto a la inexistencia de cultivos de leucaena (HERNANDEZ *et al.*, 2012).

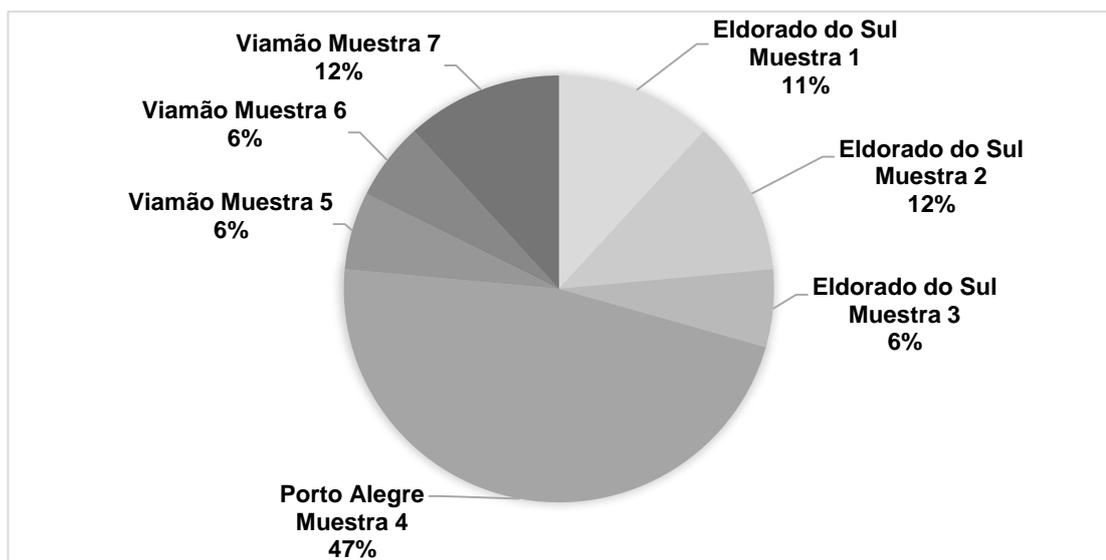


Figura 1. Porcentaje de aislamientos obtenidos de muestras de suelo por localidades en el Estado de Rio Grande do Sul, Brasil.

A partir de los nódulos de plantas de *Desmodium* sp recolectadas en el campo se obtuvieron 12 aislamientos, que posteriormente fue determinado si tenían la capacidad de formar nódulos en las plantas de leucaena (Cuadro 2).

Evaluación de la capacidad simbiótica *in vitro* de los aislamientos obtenidos.

En la prueba de evaluación de la capacidad simbiótica *in vitro* de los aislamientos obtenidos, fue evidenciada por la producción de la coloración rojiza

al interior del nódulo por actividad de la leg-hemoglobina, siendo determinados como rizobios simbioses de leucaena los aislamientos Leu01, Leu02, Des04, Des05, Des06, Des09, Des15 y Des23 (Tabla 2), los cuales fueron seleccionados para el experimento de eficiencia en la fijación biológica de nitrógeno. Las tres cepas Vp16, Lc348, Din3 del banco de aislamientos de rizobios del Laboratorio de Microbiología de Suelos de la UFRGS, que fueron incluidas en este experimento no tuvieron la capacidad para inducir la formación de nódulos, a pesar de su capacidad de establecer simbiosis con otras leguminosas (SANTOS, 2018).

Evaluación de la eficiencia en la fijación biológica de nitrógeno de los rizobios

Los resultados de MSPA, MSR, NN, Nac y el índice IER determinados en las plantas de leucaena inoculadas con los aislamientos y las cepas SEMIA de rizobios son presentados en la Tabla 3.

Se encontró una mayor masa seca en los tratamientos con los aislamientos de rizobios Leu01, Leu02, las tres cepas SEMIA 6361, SEMIA 6097 y SEMIA 4077, presentando diferencias con el tratamiento control no inoculado y sin adición de N (Control-N), como tampoco hubo diferencias con el tratamiento control no inoculado, que recibió adición de nitrógeno (Control+N) según la prueba de Tukey. Estos resultados indican que tanto los aislamientos de rizobios Leu01 y Leu02 como las cepas SEMIA promueven el crecimiento de las plantas de leucaena. Resultados similares fueron obtenidos en un estudio con cepas nativas de *Rhizobium* sp inoculadas en plantas de leucaena, donde las cepas contribuyeron en el aumento la masa seca de las plantas (CUBILLOS-HINOJOSA *et al.*, 2019). En contraste, difieren de los resultados encontrados en un estudio realizado por RAMOS & SOUZA (2013) con cepas de la colección de rizobios del Instituto Nacional de Investigaciones de la Amazonia (INPA) de Brasil, que fueron inoculadas en plantulas de leucaena, evaluando el efecto sobre la masa seca y comparadas con el control sin inocular y que recibió fertilización nitrogenada, no encontrando diferencias entre los tratamientos.

Tabla 2. Origen, características fenotípicas, tiempo de crecimiento en medio LMV, prueba de reacción acida o alcalina en medio LMA+AB, verificación de nódulos activos de los aislamientos obtenidos de suelos de Rio Grande do Sul y de nódulos de plantas de *Desmodium* sp, evaluados como simbiontes de leucaena.

Aislamiento	Lugar/Muestra	Forma	Borde	Elevación	Color	Opacidad	Consistencia	Tiempo de crecimiento (días)	Tamaño (mm)	Nódulos activos Leucaena Fix*	Reacción acida/alcalina LMA+AB
Des01	Eldorado do Sul / 1	Circular	Entero	Convexa	Rosada	Opaca	Gomosa	4	5	-	Acida
Des04					Blanca	Opaca	Gomosa	4	7	+	Acida
Des05					Branca	Opaca	Gomosa	3	7	+	Acida
Des06					Blanca	Brillante	Gomosa	4	5	+	Acida
Des08					Blanca	Opaca	Gomosa	3	6	-	Acida
Des09					Blanca	Opaca	Gomosa	4	5	+	Alcalina
Des14	Eldorado do Sul / 2				Blanca	Opaca	Gomosa	4	5	-	Acida
Des15					Blanca	Opaca	Gomosa	3	4	+	Acida
Des21	Eldorado do Sul / 3				Blanca	Opaca	Gomosa	3	4	-	Acida
Des22					Rosada	Opaca	Gomosa	4	4	-	Acida
Des23					Rosada	Opaca	Gomosa	4	5	+	Acida
Des26					Rosada	Brillante	Gomosa	4	9	-	Acida
					Blanca	Opaca	Gomosa	3	4	+	Acida
Leu01	Porto Alegre / 4				Puntiforme	Entero	Convexa	Blanca	Opaca	Gomosa	3
Leu02		Blanca	Opaca	Gomosa				3	3	+	Acida
Leu03		Blanca	Brillante	Gomosa				3	2	-	Acida
Leu04		Rosada	Opaca	Acuosa				5	1	-	Alcalina
Leu05		Rosada	Brillante	Acuosa				3	3	-	Alcalina
Leu06		Blanca	Brillante	Gomosa				3	2	-	Acida
Leu07		Blanca	Opaca	Acuosa				3	3	-	Alcalina
Leu08		Blanca	Brillante	Gomosa				4	1	-	Alcalina
Leu09	Eldorado do Sul/ 1	Circular	Entero	Convexa	Rosada	Opaca	Gomosa	4	1	-	Alcalina
Leu10					Rosada	Opaca	Gomosa	5	1	-	Alcalina
Leu11	Eldorado do Sul / 2	Puntiforme	Entero	Convexa	Rosada	Opaca	Acuosa	5	≤ 1	-	Alcalina
Leu12					Rosada	Brillante	Gomosa	5	1,5	-	Alcalina
Leu13	Eldorado	Puntiforme	Entero	Convexa	Rosada	Opaco	Gomosa	5	≤ 1	-	Alcalina
Leu14	Viamão/				Rosada	Opaca	Acuosa	5	≤ 1	-	Alcalina
Leu15	Viamão/	Circular	Entero	Convexa	Rosada	Opaco	Acuosa	5	1	-	Alcalina
Leu16	Viamão/				Rosada	Opaco	Acuosa	5	≤ 1 mm	-	Alcalina
Leu17	7				Rosada	Brillante	Gomosa	5	1	-	Alcalina

La evaluación de la capacidad simbiótica de los aislamientos con leucaena fue determinada por la actividad de la leghemoglobina evidenciada en los nódulos siendo considerados fix (+) activos, fix (-) negativo. Des: *Desmodium* sp.; Leu: *Leucaena leucocephala*; LMA+AB: Levedura manitol agar+ azul de bromotimol

Tabla 3. Valores promedio de masa seca de la parte aérea (MSPA), masa seca de la raíz (MSR), número de nódulos (NN), nitrógeno acumulado (Nac) de las plantas inoculadas con rizobios y el índice de eficiencia relativa (IER).

Tratamientos	MSPA	MSR	NN	Nac	IER
	g		-	mg	%
Control+N	0,35 a	0,24 a	0 d	6,32 a	100
SEMIA 6361	0,41 a	0,24 a	30 b	10,78 a	141
SEMIA 6097	0,33 a	0,24 a	32 b	7,69 a	113
SEMIA 4077	0,43 a	0,20 a	35 ab	10,83 a	148
Leu01	0,37 a	0,21 a	40 a	9,31 a	129
Leu02	0,37 a	0,21 a	34 b	8,00 a	127
Des04	0,14 b	0,09 a	6 c	0,00*	0
Des05	0,14 b	0,11 a	8 c	0,00*	0
Des06	0,16 b	0,11 a	8 c	0,00*	0
Des09	0,12 b	0,13 a	9 c	0,00*	0
Des15	0,15 b	0,10 a	9 c	0,00*	0
Des23	0,16 b	0,12 a	9 c	0,00*	0
Control-N	0,10 b	0,09 a	0 d	0,00*	0

* No determinado en este tratamiento por la poca cantidad de muestra. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos, según prueba de tukey al 5%.

Por otra parte, fue evidenciado en las plantas de leucaena inoculadas con los aislamientos de rizobios obtenidos de nodulos de *Desmodium sp.* una baja MSPA, semejante al tratamiento control no inoculado sin adición de N (Control-N). Estos resultados pueden estar asociados a la baja nodulación presentada, a pesar de que estos aislamientos de rizobios fueron determinados como simbioses de leucaena en la prueba de capacidad simbiótica, concordando con un trabajo similar (HERNANDEZ *et al.*, 2012), donde fue reportado que no todos los rizobios que establecen simbiosis con leguminosas son eficientes en la fijación biológica de N.

En la masa seca de la raíz no fueron observadas diferencias entre los tratamientos, lo que indica que los rizobios no estimularon el crecimiento radicular de plantas de leucaena.

En cuanto al número de nódulos (NN) se evidenció que los aislamientos de rizobios Leu01, Leu02 y las tres cepas (SEMIA 6361, SEMIA 6097 y SEMIA 4077) fueron los que tuvieron mayor capacidad de formar nódulos en comparación con los aislamientos de nódulos de *Desmodium sp.* simbioses de leucaena que presentaron una baja nodulación. Estos resultados coinciden con los observados en un estudio de establecimiento de sistemas silvopastoriles en campo, donde semillas de leucaena fueron inoculadas con el producto comercial Ferbiol que contenía la cepa *Rhizobium loti*, cultivadas en vivero y

posteriormente sembradas en campo durante ocho semanas, donde no evidenciaron diferencias en el número de nódulos entre las plantas inoculadas y no inoculadas, sin embargo encontraron que los nódulos de las plantas no inoculadas se encontraban inactivos, ya que son nódulos establecidos por rizobios autóctonos del suelo (BUENO & CAMARGO, 2015). Otros resultados similares fueron evidenciados en una investigación realizada en invernadero con aislamientos *Rhizobium* sp. nativos y una cepa comercial inoculados en semillas y plántulas de leucaena, que estimularon la nodulación de las plantas favoreciendo la fijación de N (CUBILLOS-HINOJOSA *et al*, 2019).

En el N acumulado por las plantas (Nac), los resultados obtenidos muestran que los aislamientos de rizobios Leu01, Leu02 y las tres cepas (SEMIA 6361, SEMIA 6097 y SEMIA 4077) proporcionaron una acumulación de N similar al tratamiento control no inoculado que recibió fertilización nitrogenada (Control+N) según la prueba de Tukey, con la diferencia de que nitrógeno acumulado por las plantas inoculadas con rizobios es proveniente de la fijación biológica de N y de la reserva que poseen las semillas (EL KADER *et al.*, 2008). Resultados similares fueron encontrados en un estudio, donde los aislamientos de *Rhizobium* sp. y las cepas comerciales incrementaron el porcentaje de nitrógeno en las plantas de leucaena inoculadas favoreciendo el crecimiento vegetal en condiciones de invernadero (CUBILLOS *et al.*, 2019).

Además, el índice de eficiencia relativa (IER) (BROCKWELL *et al.*, 1966) que muestra el porcentaje de eficiencia de una bacteria en asociación simbiótica con leguminosas en fijar N, permitió evidenciar que tanto los aislamientos Leu01 y Leu02 como las tres cepas (SEMIA 6361, SEMIA 6097 y SEMIA 4077) presentaron porcentaje de eficiencia similar o superior al control no inoculado y que recibió fertilización nitrogenada (Control+N), lo que permite inferir que estos aislamientos y cepas son eficientes en la fijación biológica de N.

5. CONCLUSIONES

Los aislamientos de rizobios Leu01 y Leu02 obtenidos en este estudio son eficientes en fijar nitrógeno en asociación simbiótica con plantas de leucaena. Por tanto, pueden ser utilizados en próximas etapas de estudios de

invernadero y campo para su evaluación agronómica que comprueben su potencial como futuras cepas de inoculantes.

Los aislamientos de rizobios obtenidos de nódulos de *Desmodium* sp. no son eficientes en la fijación biológica de nitrógeno en plantas de leucaena.

CAPÍTULO V – Aplicação conjunta de substâncias húmicas e rizobactérias promotoras de crescimento inoculadas e co-inoculadas em plantas de *Phaseolus lunatus* L. e *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit.

1. Resumo

Dentre as estratégias de produção sustentável encontram-se a co-inoculação de rizóbios e *Azospirillum* e o uso de substâncias húmicas (SH) na promoção de crescimento de plantas. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da inoculação ou co-inoculação de rizóbios e *Azospirillum brasilense* em conjunto com SH na promoção de crescimento e nodulação em feijão-fava e leucena. Para isto, foram instalados em casa de vegetação experimentos com o cultivo de cada espécie de planta. O desenho experimental foi o de blocos casualizados com cinco repetições. Foram utilizados vasos plásticos contendo mistura estéril de vermiculita e areia (2:1). Em seguida, realizou-se a semeadura com sementes seguida da inoculação de rizóbios, e da co-inoculação com *A. brasilense*. Posteriormente, foram adicionadas as SH: ácidos húmicos e fúlvicos na dose recomendada pelo fabricante de 4L.ha⁻¹. Tanto para os experimentos com leucena como feijão-fava foram conduzidos tratamentos controles sem inoculação, com adição de uma dose de nitrogênio (N) equivalente a 100 kg.ha⁻¹, na forma de NH₄NO₃ com ou sem as SH. Após 45 dias de cultivo, os experimentos foram colhidos, sendo determinada a massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), o N acumulado na parte aérea (Nac) e o índice de eficiência relativa (Ef). Além disso, em plantas de feijão-fava foi determinada a massa dos nódulos secos (MNS) enquanto em leucena foi o

número de nódulos (NN). Os resultados mostraram que em plantas de feijão-fava e leucena houve um aumento maior da MSPA, MSR e Nac nos tratamentos que receberam SH e co-inoculação com rizóbios e *A. brasilense*, seguido pelos tratamentos que foram inoculados somente com rizóbios e SH, e os tratamentos que receberam N e SH em comparação adição de N e a inoculação isolada dos rizóbios. A aplicação conjunta de SH e rizóbios em co-inoculação com *A. brasilense* teve maior efeito no aumento da MNS em feijão-fava e no NN em leucena, seguido pelos tratamentos onde foram adicionados somente os rizóbios com SH. Esses resultados indicam a existência de interação potencial do uso de SH com a co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* mostrando-se promissor para a produção de cultivos agrícolas sustentáveis.

Palavras chave: substâncias húmicas, co-inoculação, rizóbios, *Azospirillum*, bioestimulantes, sustentabilidade.

2. Introdução

Feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é segunda espécie de maior importância do gênero *Phaseolus*, depois do feijão comum (*P. vulgaris* L.). Destaca-se a importância deste cultivo no Brasil pelo seu conteúdo proteico, sendo uma fonte de alimento para população brasileira (SANTOS *et al.*, 2009; ARAUJO *et al.*, 2015). Além disso este cultivo é uma fonte de renda para pequenos produtores da região do nordeste do país e do estado do Rio Grande do Sul (FRANCO *et al.*, 2002). Já *Leucaena leucocephala*, embora exista discordância na sua utilização na agricultura (COSTA e DURIGAN, 2010), é uma leguminosa rica em proteína utilizada para produção animal, no desenvolvimento de sistemas silvipastoris e agroflorestais em diversos países de América Latina como Colômbia, Panamá, Costa Rica, México, entre outros (MURGUEITO *et al.*, 2016), assim como também na recuperação de áreas degradadas e reflorestação em solos tropicais (DIAS, 2005; BARRETO *et al.*, 2010; BUENO e CAMARGO, 2015; NICODEMO *et al.*, 2018; KANT *et al.*, 2019).

Nos últimos anos tem crescido o interesse na produção de alimentos para alimentação humana e a produção animal de maneira sustentável, de

menor impacto ambiental, e com maior segurança alimentar, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de estratégias de intensificação ecológica, como o uso eficiente dos nutrientes, de produtos bioestimulantes de crescimento de plantas, a redução da necessidade de controle de doenças e pragas, entre outras (TITTONEL, 2014; CANELLAS *et al.*, 2015). Considera-se bioestimulante de crescimento de plantas qualquer substância ou micro-organismo que aplicado ou inoculado na rizosfera ou nas plantas melhoraram a absorção dos nutrientes, a eficiência nutricional, a tolerância a estresse abiótico e qualidade do cultivo, como as substâncias húmicas (SH) e as rizobactérias promotoras de crescimento (RPCP) (DU JARDIM, 2015; YAKHIN *et al.*, 2017).

As SH constituem a fração coloidal da matéria orgânica do solo, sendo classificadas em ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) e huminas pela solubilidade em pH ácido ou alcalino. Dentre as fontes de SH encontram-se vermicompostos, esgotos, turfa, resíduos de lignocelulose da refinaria para produção de etanol e resíduos da produção de carvão como linhito e leonardita (SILVA *et al.*, 2000; CANELLAS *et al.*, 2000; CANELLAS e FAÇANHA 2004; AGUIRRE *et al.*, 2009; GIANOULLI *et al.*, 2009; CUBILLOS-HINOJOSA *et al.*, 2015; VALERO *et al.*, 2016; CANELLAS *et al.*, 2018; CANELLAS e OLIVARES, 2014; SPACCINI *et al.*, 2019). Estes últimos são considerados ricos em ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF), onde sua obtenção leva-se a cabo mediante o método clássico de extração com soluções alcalinas (SENESI *et al.*, 2007; CHASSAPIS e ROULIA, 2008; GIANOULLI *et al.*, 2009), sendo a leonardita de maior uso para extração de SH na indústria de fabricantes de produtos à base SH.

A bioatividade das SH na promoção de crescimento de plantas tem sido amplamente relatada em diversas pesquisas que mostram que as SH que estimulam o crescimento e desenvolvimento das plantas, indução de proliferação de raízes modificando a arquitetura do sistema radicular, desenvolvimento foliar, aumento na absorção de nutrientes e regulação de enzimas importantes para o metabolismo vegetal, como por exemplo a H⁺-ATPase, VTP-ase, nitrato redutase, e auxínico (CHEN E AVAID, 1990; PINTON *et al.*, 1992; FAÇANHA *et al.*, 2002; NARDI *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2004; NARDI *et al.*, 2005; ZANDONADI *et al.*, 2007; BARROS *et al.*, 2010; TREVISAN *et al.*, 2010; ZANDONADI e BUSATO, 2012; ZANDONADI *et al.*, 2013, ZANDONATI *et al.*,

2014, CANELLAS e OLIVARES., 2014; CANELLAS *et al.*, 2015; SHAH *et al.*, 2018).

Estes efeitos das SH sobre o desenvolvimento vegetal são dependentes da fonte, da dose e do genótipo da planta (VAUGHAN e MALCOLM, 1985; RODDA *et al.*, 2006; ZANDONADI *et al.*, 2014). Nesse sentido, em plantas de feijão, somente se tem relatos dos efeitos das SH na modificação da cinética de absorção de potássio, assimilação de elementos minerais como fosforo e nitrogênio, crescimento das plantas e a concentração de nutrientes no feijão comum (*P. vulgaris*) (ROSA *et al.*, 2009; AYDIN *et al.*, 2012), não havendo relatos em *P. lunatus* e *Leucaena leucocephala*.

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP), são um grupo muito diverso de bactérias que possuem capacidade de promover o crescimento de plantas (KLOEPPER e SCHROTH, 1978) por meio de diversos mecanismos como: a fixação biológica de N (FBN) (INIGUEZ *et al.*, 2004; MONTAÑEZ *et al.*, 2009), a produção de auxinas, citocininas, giberelinas e inibição de etileno (ARSHAD e FRANKENBERGER, 1992), o antagonismo contra fitopatógenos pela produção de sideróforos (SCHER e BAKER, 1982) a indução de resistência sistêmica adquirida (PIETERSE *et al.*, 2003), ou o aumento da disponibilidade de nutrientes como fósforo (SESSITSCH *et al.*, 2002; STURZ *et al.*, 2000). Esses efeitos das RPCP no crescimento de plantas de feijão-comum e leucena têm sido documentados em vários trabalhos, sendo algumas utilizadas na formulação de inoculantes comerciais (RINCON *et al.*, 2000; HUNGRIA *et al.*, 2000; HUNGRIA *et al.*, 2003; YADEGARI *et al.*, 2008; BUENO e CAMARGO 2015; AGUIRRE-MEDINA *et al.*, 2015; CUBILLOS-HINOJOSA *et al.*, 2019). Além disso no feijão-comum se tem recomendado a co-inoculação de rizóbios e *Azospirillum brasilense* que tem gerado um aumento na nodulação e na produtividade do cultivo (HUNGRIA *et al.*, 2013).

Em feijão-fava, estudos mostram que diversos cultivares deste feijão possuem a capacidade de estabelecer associação simbiótica com rizóbios eficientes em realizar o processo de fixação biológica de nitrogênio (ORMEÑO-CARILLO *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2009; ANTUNES *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2011; SERVIN-GARCIDUEÑAS *et al.*, 2014; DURAN *et al.*, 2014; ORMEÑO-CARILLO *et al.*, 2017). Porém não existem relatos do emprego da co-inoculação rizóbios e *A. brasilense* tanto em plantas de feijão-fava como leucena.

O uso combinado de PGPB e substâncias húmicas (SH) é relatado em poucos estudos, alguns têm sido desenvolvidos em cultivos milho, tomate, abacaxi e batata, sendo evidenciados aumentos na produtividade dos cultivos e a mitigação do estresse nas plantas quando comparado com a aplicação isolada (MELO *et al.*, 2017; EKIN, 2019), não havendo relatos ainda para feijão-fava e leucena. No entanto, em plantas do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) observou-se diminuição do estresse hídrico nas plantas pela aplicação conjunta de SH extraídas de vermicomposto e co-inoculação de *Rhizobium tropici* estirpes BR322, BR520 e BR534 e *Herbaspirillum seropedicae* (MELO *et al.*, 2017). Nesse sentido, ainda faltam trabalhos que demonstrem os efeitos da aplicação conjunta de SH e rizóbios eficientes na fixação biológica de nitrogênio co-inoculados com *A. brasilense* em plantas de feijão-fava e leucena.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inoculação ou co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com substâncias húmicas (ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) extraídos de leonardita) na promoção de crescimento de plantas de feijão-fava e leucena.

3. Material e métodos

Foram estabelecidos durante o verão nos meses de janeiro e fevereiro dois experimentos com plantas de *Phaseolus lunatus* e *Leucaena leucocephala* na casa de vegetação do Departamento de Solos, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As sementes e os cultivos bacterianos foram processados no Laboratório de Microbiologia do Solo da Faculdade de Agronomia da UFRGS

Desinfestação das sementes

No experimento com plantas de feijão-fava (*P. lunatus*) foram utilizadas sementes da variedade olho de cabra preto, fornecidas por produtores do nordeste brasileiro. Essas sementes foram desinfestadas por imersão sucessiva em álcool (70%) por 30 segundos, hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 segundos e, logo após, seis lavagens consecutivas com água destilada esterilizada (VINCENT, 1970). Em seguida, as sementes foram semeadas em

vasos plásticos com capacidade de 1,5 L que tinham sido lavados e flambados com álcool etílico 99% previamente e enchidos com uma mistura esterilizada em autoclave, de vermiculita e areia na proporção (2:1).

Para o experimento com plantas de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit), utilizou-se sementes que foram coletadas de uma mesma planta na Estação Experimental Agronômica (EEA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Estas sementes foram escarificadas com papel lixa Nº100 por 1 min, desinfestadas pelo método de VINCENT (1970) utilizado e descrito anteriormente em feijão-fava. Neste experimento utilizaram-se vasos plásticos com capacidade de 700 mL que tinham sido previamente desinfestados com álcool etílico 99%, enxaguados sucessivamente com água destilada estéril e enchidos com uma mistura de vermiculita e areia na proporção (2:1) esterilizada em autoclave, onde foram semeadas três sementes em cada vaso.

Produção dos inoculos dos isolados e estirpes das Rizobactérias promotoras de crescimento

Para o experimento com plantas de feijão-fava foram avaliados os isolados de rizóbios Plu03 e Plu14 e uma estirpe SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici* CIAT 899), liberada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil para produção de inoculantes comerciais para feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) e foram obtidas da coleção SEMIA de rizóbios do Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária (DDPA). Esse isolados e estirpe foram selecionadas pela capacidade de estabelecer simbioses e fixar nitrogênio em experimento prévio em plantas de feijão-fava variedade olho de cabra preto.

No experimento com plantas de leucena os rizóbios estudados foram o isolado Leu01 e as estirpes SEMIA 4081 e SEMIA 6361 obtidas a partir de plantas de leucena como hospedeira da coleção de rizóbios do Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária (DDPA). Tanto o Isolado Leu01 como as estirpes SEMIA 4081 e 6361 foram selecionados pela sua eficiência na fixação biológica de nitrogênio em experimento prévio.

Na produção dos inoculos bacterianos, as bactérias foram inoculadas separadamente em tubos falcon com 30 mL de meio de cultura levedura manitol

líquido (VINCENT, 1970) e, mantidos em incubador orbital a $28^{\circ}\text{C}\pm 2$ com agitação de 120 rpm até conseguir uma concentração de 10^8 células. mL^{-1} .

No caso de *Azospirillum brasilense*, foi utilizado produto comercial contendo as estirpes AbV5 e AbV6 de *A. brasilense*.

Substâncias húmicas.

Foram utilizados dois bioestimuladores comerciais ricos em substâncias húmicas (SH) extraídas de carvão tipo leonardita: um dos produtos foi Growmate Plant, à base de ácidos fúlvicos em concentração de 1,35 %, que daqui em diante será referido como AF. O outro produto foi Growmate Soil, à base de ácidos húmicos em concentração de 1,44 % que daqui em diante será referido como AH. As SH foram aplicadas na dose recomendada pelo fabricante $4\text{L}\cdot\text{ha}^{-1}$, sendo adicionados 10 mL de uma solução ($7,5\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$).

Desenho do experimento de feijão-fava em casa de vegetação.

Foi estabelecido um desenho em blocos completos casualizados com 23 tratamentos e cinco repetições, com dois isolados (Plu03 e Plu14) e a estirpe (SEMIA 4077) inoculados ou co-inoculados com *Azospirillum brasilense*, adição mineral de N (controle) e a aplicação conjunta de ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF), apresentados na Tabela 1.

Um dos tratamentos controle não inoculados recebeu nitrogênio (N) na forma de NH_4NO_3 em uma dose equivalente à adição de $100\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ (Controle+N) e dois tratamentos com adição de N em conjunto com as substâncias húmicas (Controle+N+AH e Controle+N+AF) (Tabela 1). O nitrogênio foi adicionado parceladamente em 5 aplicações, sendo colocados nos vasos 10 mL semanalmente de uma solução ($0,015\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) de NH_4NO_3 .

Os vasos dos tratamentos que foram inoculados com os rizóbios receberam 2 mL de caldo bacteriano na semeadura. Tanto os vasos dos tratamentos co-inoculados com rizóbios e *A. brasilense* como os inoculados unicamente *A. brasilense* receberam 1 mL do produto comercial, contendo as estirpes AbV5 e AbV6 de *A. brasilense*, na semeadura.

Tabela 1. Identificação e descrição dos tratamentos experimento em plantas de feijão-fava.

Tratamento	Descrição
Controle-N	Não inoculado, sem N
Controle+N	Não inoculado, com N
N+AH	Não inoculado, com N + ácidos húmicos
N+AF	Não inoculado, 100% N + ácidos fúlvicos
Az	Inoculação <i>A. brasilense</i>
Plu03	Inoculação rizóbio Plu03
Plu03+Az	Co-inoculação rizóbio Plu03 e <i>A. brasilense</i>
Plu03+AF	Inoculação rizóbio Plu03 + ácidos fúlvicos.
Plu03+AH	Inoculação rizóbio Plu03 + ácidos húmicos.
Plu03+Az+AF	Co-inoculação rizóbio Plu03 + <i>A. brasilense</i> + ácidos fúlvicos.
Plu03+Az+AH	Co-inoculação rizóbio Plu03 + <i>A. brasilense</i> + ácidos húmicos.
Plu14	Inoculação rizóbio Plu14
Plu14+Az	Co-inoculação rizóbio Plu14 e <i>A. brasilense</i> .
Plu14+AF	Inoculação rizóbio Plu14 + ácidos fúlvicos.
Plu14+AH	Inoculação rizóbio Plu14 + ácidos húmicos.
Plu14+Az+AF	Co-inoculação rizóbio Plu14 + <i>A. brasilense</i> + ácidos fúlvicos.
Plu14+Az+AH	Co-inoculação rizóbio Plu14 + <i>A. brasilense</i> + ácidos húmicos.
SEMIA 4077	Inoculação rizóbio SEMIA 4077
SEMIA 4077+Az	Co-inoculação rizóbio SEMIA 4077 e <i>A. brasilense</i> .
SEMIA 4077+AF	Inoculação rizóbio SEMIA 4077 + ácidos fúlvicos.
SEMIA 4077+AH	Inoculação rizóbio SEMIA 4077 + ácidos húmicos.
SEMIA 4077+Az+AF	Co-inoculação rizóbio SEMIA 4077+ <i>A. brasilense</i> + ácidos fúlvicos.
SEMIA 4077+Az+AH	Co-inoculação rizóbio SEMIA 4077+ <i>A. brasilense</i> + ácidos húmicos.

AH: ácidos húmicos; AF: ácidos fúlvicos; Az: *Azospirillum brasilense*; N: nitrogênio; Plu03 e Plu14: isolados de rizóbios; SEMIA 4077: estirpe de rizóbio.

As substâncias húmicas AH e AF foram adicionadas um dia antes e o nitrogênio na forma de NH_4NO_3 foi adicionado 3 dias após da sementeira das sementes. Todas as plantas foram irrigadas com solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1950) modificada por SILVEIRA (1998). Uma semana após foi realizado o desbaste deixando-se uma planta por vaso.

Desenho do experimento de leucena em casa de vegetação.

O delineamento experimental conduzido foi em blocos ao acaso com cinco repetições. Foram estabelecidos 23 tratamentos, com um isolado (Leu01)

e duas estirpes (SEMIA 4081 e SEMIA 6361) separadamente o co-inoculados, adição de N (controle) em aplicação conjunta com ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF) (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação e descrição dos tratamentos do experimento com plantas de leucena.

Tratamento	Descrição
Controle-N	Não inoculado, sem N
Controle+N	Não inoculado, com N
N+AH	Não inoculado, com N + ácidos húmicos
N+AF	Não inoculado, com N + ácidos fúlvicos
Az	Inoculação <i>Azospirillum brasilense</i>
Leu01	Inoculação rizóbio Leu01
Leu01+Az	Co-inoculação rizóbio Leu01 e <i>A.brasilense</i>
Leu01+AF	Inoculação rizóbio Leu01 + ácidos fúlvicos
Leu01+AH	Inoculação rizóbio Leu01 + ácidos húmicos
Leu01+Az+AF	Co-inoculação rizóbio Leu01 + <i>A.brasilense</i> + ácidos fúlvicos
Leu01+Az+AH	Co-inoculação rizóbio Leu01 + <i>A.brasilense</i> + ácidos húmicos
SEMIA 4081	Inoculação rizóbio SEMIA 4081
SEMIA 4081+Az	Co-inoculação rizóbio SEMIA 4081 e <i>A.brasilense</i>
SEMIA 4081+AF	Inoculação rizóbio SEMIA 4081 + ácidos fúlvicos
SEMIA 4081+AH	Inoculação rizóbio SEMIA 4081 + ácidos húmicos.
SEMIA 4081+Az+AF	Co-inoculação rizóbio SEMIA 4081 + <i>A.brasilense</i> + ácidos fúlvicos
SEMIA 4081+Az+AH	Co-inoculação rizóbio SEMIA 4081 + <i>A.brasilense</i> + ácidos húmicos
SEMIA 6361	Inoculação rizóbio SEMIA 6361
SEMIA 6361+Az	Co-inoculação rizóbio SEMIA 6361 e <i>A.brasilense</i>
SEMIA 6361+AF	Inoculação rizóbio SEMIA 6361 + ácidos fúlvicos
SEMIA 6361+AH	Inoculação rizóbio SEMIA 6361 + ácidos húmicos
SEMIA 6361+Az+AF	Co-inoculação rizóbio SEMIA 6361 + <i>A.brasilense</i> + ácidos fúlvicos
SEMIA 6361+Az+AH	Co-inoculação rizóbio SEMIA 6361 + <i>A.brasilense</i> + ácidos húmicos

AH: ácidos húmicos; AF: ácidos fúlvicos; Az: *Azospirillum brasilense*; N: nitrogênio; SEMIA 4081: estirpe de rizóbio; SEMIA 6361: estirpe de rizóbio.

Um dos tratamentos controle não inoculados recebeu nitrogênio (N) na forma de NH_4NO_3 em uma dose equivalente à adição de $100 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ (Controle+N) e dois tratamentos com adição de N em conjunto com as substâncias húmicas (Controle+N+AH e Controle+N+AF) (Tabela 2). O nitrogênio foi adicionado parceladamente em 6 aplicações, sendo colocados nos vasos 10 mL semanalmente de uma solução ($1,43 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) de NH_4NO_3 .

Os tratamentos que foram inoculados com rizóbios receberam 2 mL de caldo bacteriano na semeadura das sementes. Os tratamentos co-inoculados rizóbios e *Azospirillum* como o tratamento somente com *A. brasilense* receberam 1 mL do produto comercial contendo as estirpes AbV5 e AbV6 de *A. brasilense* na semeadura. As substâncias húmicas AH e AF foram adicionadas um dia antes e o nitrogênio na forma de NH_4NO_3 foi adicionado 3 dias após da semeadura das sementes. Todas as plantas foram irrigadas com solução nutritiva de SARRUGE (1975). Uma semana após foi realizado o desbaste deixando-se uma planta por vaso.

Medição das variáveis

Após 45 dias de cultivo de cada experimento, as plantas de feijão-fava e leucena foram coletadas, separando a parte aérea do sistema radicular. Foram avaliadas a massa seca da parte aérea (MSPA), a massa seca da raiz (MSR), a massa dos nódulos secos (MNS), e posteriormente foi determinado o N total acumulado (Nac) na parte aérea e a eficiência relativa (Ef), segundo BROCKWELL *et al.*, (1966), da fixação biológica de nitrogênio dos rizóbios. Para isto, a parte aérea foi acondicionada em sacos de papel e submetida a secagem na estufa de circulação forçada a 65°C, durante três dias e logo foi moída para a quantificação de N pelo método descrito por TEDESCO *et al.*, (1995). Todas as raízes foram lavadas para se retirar partículas de substrato aderidas, sendo secas com papel toalha absorvente para retirar o excesso de água. Em seguida, os nódulos dos tratamentos inoculados com rizóbios em feijão-fava foram retirados das raízes e secos em sacos de papel nas mesmas condições anteriores e após pesados, determinando-se a MNS. Enquanto os nódulos das plantas de leucena dos tratamentos inoculados com rizóbios foram retirados e quantificados.

O índice de eficiência relativa (Ef) na fixação biológica de nitrogênio foi calculado usando-se a fórmula (BROCKWELL *et al.*, 1966):

$$\text{Ef (\%)} = ((\text{NT} - \text{NT-N}) / (\text{NT+N} - \text{NT-N})) \times 100$$

Onde:

NT = nitrogênio total da planta do tratamento inoculado

NT-N = nitrogênio total do controle não inoculado e sem nitrogênio
NT+N = nitrogênio total do controle não inoculado e que recebeu suplementação nitrogenada.

Analises dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo a comparação de medias realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o programa estatístico SPSS 15.

4. Resultados e Discussão

Efeito da aplicação conjunta de SH e rizóbios inoculados e co-inoculados com *A. brasilense* em plantas de feijão-fava

Os resultados das variáveis avaliadas na promoção de crescimento de plantas de feijão-fava em resposta ao tratamento com rizóbios inoculado e co-inoculados com *A. brasilense* em conjunto com SH são apresentados na Tabela 3.

Na massa seca das plantas destacaram-se os tratamentos Plu14+Az+AF e Plu14+Az+AH que obtiveram os maiores aumentos (8,49 g e 8,61 g respectivamente), comparado com os outros tratamentos e o tratamento controle (Controle+N) que obteve 4,68 g (Tabela 3). Em seguida, os maiores aumentos foram quando plantas foram co-inoculadas com rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com SH (tratamentos Plu03+Az+AF; Plu03+Az+AH; SEMIA 4077+Az+AF e SEMIA 4077+Az+AH), seguido das plantas inoculadas com rizóbios com SH (Plu03+AH; Plu03+AF; Plu14+AH; Plu14+AF; SEMIA 4077+AH; SEMIA 4077+AF) que não houve diferenças com às plantas co-inoculadas com rizóbios e *A. brasilense*, e as plantas tratadas com N com SH (N+AH e N+AF). Todos estes tratamentos foram superiores ao tratamento controle+N e a inoculação isolada dos rizóbios com exceção dos tratamentos N+AH e N+AF que foram semelhantes ao tratamento inoculado com rizóbio Plu03, mas superiores ao tratamento controle+N.

Tabela 3. Efeito da inoculação e co-inoculação de rizóbios (Plu03, Plu14 e SEMIA 4077) e *A. brasilense* (Az) em conjunto com ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF), na promoção de crescimento de plantas de feijão-fava.

TRATAMENTOS	MSPA	MSR	MNS	Nac
	----- g -----		----- mg -----	
Controle+N	4,68 f	1,20 f	0 h	174,30 h
Plu14 + Az+ AH	8,61 a	2,18 a	1298 a	461,97 a
Plu14 + Az+ AF	8,49 a	2,06 a	1276 a	429,92 b
SEMIA 4077 + Az+ AH	7,90 b	1,87 b	984 c	385,66 c
Plu03 + Az+ AH	7,85 b	2,07 a	1140 b	422,66 b
SEMIA 4077 + Az+ AF	7,85 b	1,89 b	980 c	383,09 c
Plu03 + Az+ AF	7,71 b	2,06 a	1100 b	383,43 c
Plu14 + AH	7,22 c	1,86 b	1106 b	341,53 d
Plu14 + Az	7,13 c	1,69 c	884 d	339,19 d
Plu14 + AF	7,04 c	1,65 cd	1088 b	330,14 d
Plu14	6,53 d	1,41 e	762 e	292,76 d
Plu03 + AH	6,49 d	1,88 b	996 c	299,27 d
Plu03 + Az	6,48 d	1,66 cd	850 d	300,83 d
Plu03 + AF	6,46 d	1,83 b	970 c	288,14 d
SEMIA 4077 + Az	6,29 d	1,63 cd	652 f	276,87 d
SEMIA 4077 + AH	6,18 d	1,61 cd	876 d	252,19 e
SEMIA 4077 + AF	6,17 d	1,57 cd	854 d	247,55 ef
N+AH	5,64 e	1,66 cd	0 h	226,04 fg
Plu03	5,60 e	1,40 e	724 ef	225,98 efg
N + AF	5,39 e	1,56 d	0 h	211,92 g
SEMIA 4077	4,52 f	1,26 F	570 g	174,15 h
Az	1,69 g	0,81 g	0 h	19,70 i
Controle-N	1,84 g	0,78 g	0 h	15,47 i

N: nitrogênio; MSPA: Massa seca da parte aérea; MSR: Massa seca da raiz; MNS: Massa dos nódulos secos; Nac: nitrogênio acumulado na parte aérea. *Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) segundo o teste de Tukey ($n=5$).

Com base nos resultados obtidos ficou evidenciado os benefícios potenciais da combinação dos efeitos benéficos da co-inoculação rizóbios e *A. brasilense* e SH no crescimento das plantas de feijão-fava. A bioatividade da aplicação de SH para a promoção de crescimento de plantas têm sido relatados, como o estímulo da fotossíntese por mecanismos similares aos fitohormônios, a proliferação e alongamento das raízes devido à atividade H^+ -ATPase que induz a divisão celular (TREVISAN *et al.*, 2010; TREVISAN *et al.*, 2011; NARDI *et al.*, 2002, BARROS *et al.*, 2010, CANELLAS *et al.*, 2011), a assimilação dos nutrientes graças à presença de hidroxila (OH) em grupos carboxílicos e

fenólicos (MUSCOLO *et al.*, 2013). Em um estudo realizado com plantas de feijão faba (*Vicia faba*) em campo tratadas com AH comerciais aplicados nas folhas obtiveram aumentos no crescimento das plantas (EL-GHAMRY *et al.*, 2009), enquanto no feijão-comum têm sido relatados estímulos de AH e AF sobre a atividade peroxidase estimulando o crescimento e desenvolvimento das folhas. Em plantas de feijão-comum também se tem relatado os benefícios da co-inoculação de rizóbios e *Azospirillum* no aumento do crescimento e produtividade do cultivo (BURDMAN *et al.*, 1997; HUNGRIA *et al.*, 2013), enquanto no feijão-fava os aumentos na MSPA foram observados neste estudo (Tabela 3).

Resultados semelhantes de aplicação conjunta de SH em conjunto com RPCP, no caso de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), foram utilizados AH extraídos de vermicomposto em co-inoculação com as estirpes de *Rhizobium tropici* BR322, BR520 e BR534 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54 em plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Grafite e cv. Bônus, originário do Brasil e Moçambique) submetidas a déficit hídrico, evidenciaram aumentos na MSPA das plantas tanto submetidas ou não ao estresse hídrico comparado com o tratamento controle não inoculado que recebeu adubação nitrogenada (MELO, *et al.*, 2017).

Na massa seca da raiz (MSR) das plantas de feijão-fava observaram-se os maiores valores nas plantas co-inoculadas com rizóbios e *A. brasilense* utilizando os rizóbios Plu14 e Plu03 em aplicação conjunta com os AH e AF (tratamentos Plu14+Az+AH e Plu14+Az+AF), seguido dos tratamentos SEMIA 4077+Az+AH e SEMIA 4077+Az+AF. Em seguida, os maiores aumentos foram nas plantas co-inoculadas com rizóbios e *A. brasilense* (Plu03+Az; Plu14+Az; SEMIA4077+Az) e as plantas inoculadas dos rizóbios e SH (Plu03+AH; Plu03+AF; Plu14+AH; Plu14+AF; SEMIA4077+AH; SEMIA 4077+AF) não havendo diferenças entre estes tratamentos, comparado com a inoculação isolada dos rizóbios e o tratamento controle+N. Além disso, foram observados aumentos nos tratamentos não inoculados que receberam N com SH (N+AH e N+AF) comparados com controle+N e a inoculação isolada dos rizóbios.

Esses resultados mostram que co-inoculação dos isolados de rizóbios (Plu14 e Plu03) e *A. brasilense* em conjunto com SH se obteve maiores

aumentos da MSR nas plantas de leucena. Ao respeito, já existem relatos da bioatividade das SH que induzem alongamento e proliferação de raízes que modificam a arquitetura do sistema radicular pelo aumento da atividade H⁺-ATPase que induz à alongação e divisão celular das plantas (NARDI *et al.*, 2002; BARROS *et al.*, 2010; CANELLAS *et al.*, 2011; CHEN e AVAID, 1990; FAÇANHA *et al.*, 2002; ZANDONADI *et al.*, 2007; TREVISAN *et al.*, 2010; CANELLAS e OLIVARES, 2014; CANELLAS *et al.*, 2015), sendo evidenciado esses efeitos em plantas da mesma família do feijão-fava (*Phaseolus lunatus*) como o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) (AYDIN *et al.*, 2012; MELO *et al.*, 2017).

Resultados similares da co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* tem sido reportados em feijão-comum (BURDMAN *et al.*, 1997; HUNGRIA *et al.*, 2013). Assim como também da aplicação conjunta de AH e RPCP empregando AH extraídos de vermicomposto em co-inoculação com as estirpes de *Rhizobium tropici* BR322, BR520 e BR534 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54 em plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Grafite e cv. Bônus submetidas a déficit hídrico. Os autores evidenciaram aumentos significativos na MSR tanto submetidas ou não ao estresse hídrico comparado com o tratamento controle não inoculado que recebeu adubação nitrogenada (MELO *et al.*, 2017).

Em relação a massa dos nódulos secos MNS nas plantas de feijão-fava evidenciou-se que os maiores aumentos de MNS foram os tratamentos Plu14+Az+AH; Plu14+Az+AF, seguido dos tratamentos Plu14+AH; Plu14+AF; Plu03+Az+AH e Plu03+Az+AF que obtiveram valores, comparado com o tratamento inoculado somente com rizóbios Plu14 e Plu03. Também foi evidenciado que tanto os tratamentos de co-inoculação rizóbios e *A. brasilense* (tratamentos Plu03+Az; Plu14+Az e SEMIA 4077+Az) como a inoculação de rizóbios com SH (tratamentos Plu03+AH; Plu03+AF; Plu14+AH; Plu14+AF; SEMIA 4077+AH e SEMIA 4077+AF), quando comparada com a inoculação do rizóbios isoladamente.

Esses resultados evidenciam o potencial que exerce tanto a aplicação conjunta das SH em co-inoculação com rizóbios e *A. brasilense* como a aplicação dos rizóbios com SH no aumento da MNS em plantas de feijão-fava. Respeito a isso há relatos sobre a bioatividade das SH em leguminosas como a soja obtendo aumento no número de nódulos (TILBA e SINEGOVSKAYA, 2012) e a eficácia no desencadeamento da expressão de genes nod em plantas de

feijão mungo (*Vigna radiata*) (AHMAD *et al.*, 2012), enquanto a co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* tem sido relatados sua influência nos nódulos em feijão-comum (HUNGRIA *et al.*, 2013).

Em relação ao uso combinado de SH e RPCP, relatos semelhantes em soja mostraram que a inoculação com rizóbios em conjunto com humate de sódio, molibdato de amônio em campo aumenta significativamente o número de nódulos (TILBA e SINEGOVSKAYA, 2012). Porém, em um trabalho em plantas de feijão-comum onde que foram co-inoculadas com as estirpes de *Rhizobium tropici* BR322, BR520 e BR534 e *H. seropedicae* estirpe HRC 54 em conjunto com AH extraídos de vermicomposto, não evidenciaram aumentos na MNS (MELO *et al.*, 2017), contrastando com o evidenciado nas plantas de soja e no experimento com feijão-fava (Tabela 3)

Nos tratamentos não inoculados que receberam adubação nitrogenada, com o sem adição conjunta de SH (Controle+N; N+AH; N+AF) e no Controle-N não foram observados nódulos, o que garantiu que o experimento no sofreu contaminação cruzada com os rizóbios utilizados nos outros tratamentos.

Evidenciou-se que o maior acúmulo de N (Nac) das plantas de feijão-fava (Tabela 3) e maior eficiência relativa (Ef) da FBN (Figura 1) nas plantas que foram co-inoculadas com os rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com SH (Plu14+Az+AH; Plu14+Az+AF; Plu03+Az+AH; Plu03+Az+AF; SEMIA 4077+Az+AH; SEMIA 4077+Az+AF), sendo superior quando foram empregados AH. Além disso, foram observados aumentos no Nac e Ef das plantas tanto por co-inoculação dos rizóbios e *A. brasilense* como na inoculação dos rizóbios em aplicação conjunta com SH.

Esses resultados sugerem que a co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com SH exercem maior potencial no acúmulo de N na parte aérea das plantas de feijão-fava, embora a quantidade de N contido nas SH aplicadas não seria causador do aumento de N das plantas pela quantidade adicionada que é baixa. Em trabalhos semelhantes de inoculação de rizóbios, tem relatado as contribuições no acúmulo de N nas plantas de feijão-fava pela fixação biológica de nitrogênio (ORMEÑO-CARILLO *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2009; ANTUNES *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2011; SERVIN-GARCIDUEÑAS *et al.*, 2014; DURAN *et al.*, 2014; ORMEÑO-CARILLO *et al.*, 2017).

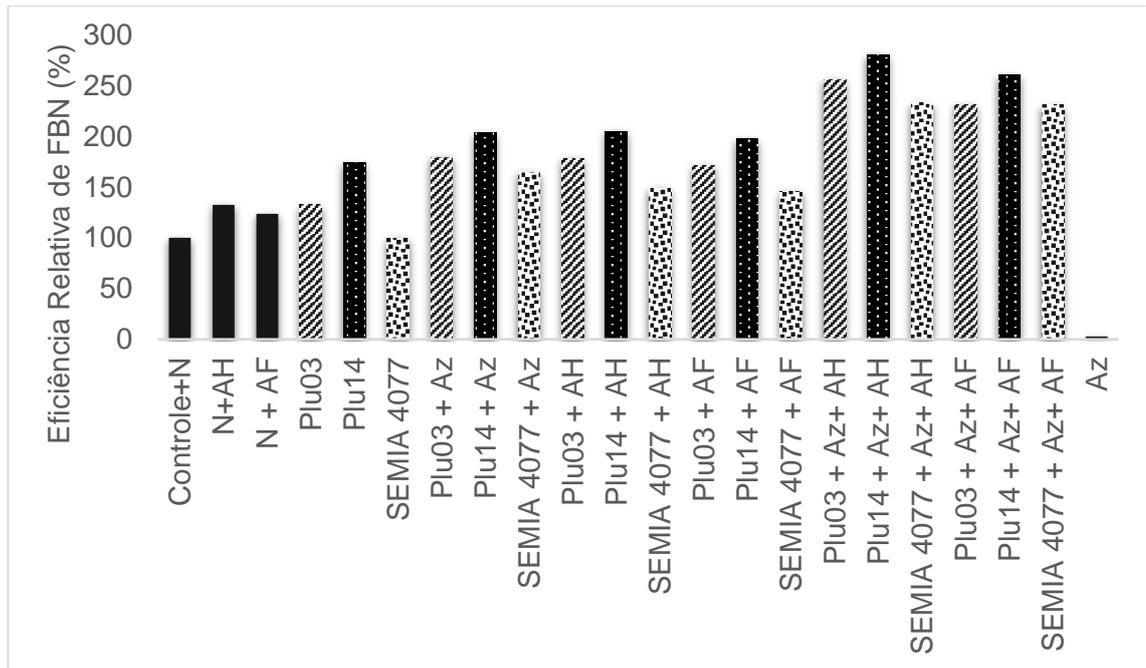


Figura 1. Eficiência relativa da fixação biológica de nitrogênio pela inoculação ou co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* em conjunto com substâncias húmicas em plantas de feijão-fava.

Em relação à co-inoculação rizóbios e *Azospirillum* alguns trabalhos com leguminosas como feijão-comum, soja (HUNGRIA *et al.*, 2013) e lentilhas (KUMAR e CHANDRA, 2008) relataram aumentos do Nac nas plantas. Da mesma maneira têm sido relatados os efeitos das SH como moduladoras dos processos metabólicos nas plantas, como o aumento da atividade H⁺-ATPase, alteração do metabolismo do nitrogênio, e a fotossíntese (CANELLAS *et al.*, 2013).

Resultados similares de aplicação conjunta de SH em co-inoculação com rizóbios *A. brasilense* obtidos neste estudo no Nac nas plantas de feijão-fava (Tabela 3) foram observados em soja, onde a inoculação com rizóbios em presença humate de sódio (ácidos húmicos com sódio), molibdato de amônio em campo aumentou significativamente o Nac nas plantas (TILBA e SINEGOVSKAYA, 2012).

Nos tratamentos não inoculados que receberam N com SH (N+AH; N+AF) aumentou o Nac nas plantas, quando comparado com o tratamento controle com N (Controle-N) (Figura 1). A contribuição das SH no acúmulo de N nas plantas, provavelmente pode ter acontecido pela indução das SH na

modulação de processos metabólicos como absorção de N através da permeabilidade da membrana pela atividade H⁺-ATPase (CANELLAS *et al.*, 2013).

4.1. Efeito da aplicação conjunta de SH e co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* em plantas de leucena.

Os resultados das variáveis avaliadas na promoção de crescimento de plantas de leucena em resposta ao tratamento com rizóbios inoculado, ou co-inoculados com *A. brasilense* em conjunto com SH são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Efeito da inoculação e co-inoculação de rizóbios (Leu01, SEMIA 4081, SEMIA 6361) e *A. brasilense* (Az) em conjunto com ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF), na promoção de crescimento de plantas de leucena.

TRATAMENTOS	MSPA	MSR	NN	Nac
	----- g -----			---- mg ----
Controle+N	1,61 l	0,22 f	0 f	29,35 h
N + AH	2,00 ij	0,44 cd	0 f	42,55 f
N + AF	1,94 jk	0,37 de	0 f	40,52 f
Leu01 + Az+ AH	3,00 a	0,63 ab	57 a	73,13 ab
SEMIA 6361 + Az+ AH	2,93 ab	0,67 ab	67 a	74,93 a
Leu01 + Az+ AF	2,92 ab	0,60 b	56 a	69,82 bc
SEMIA 4081 + Az+ AH	2,81 bc	0,69 a	56 a	71,02 ab
SEMIA 6361 + Az+ AF	2,73 cd	0,61 ab	61 a	66,48 c
SEMIA 4081 + Az+ AF	2,61 d	0,64 ab	59 a	61,84 d
Leu01 + AF	2,37 e	0,42 cde	42 bc	51,48 e
Leu01 + Az	2,36 ef	0,46 c	42 bc	51,59 e
Leu01 + AH	2,35 ef	0,46 c	46 b	51,93 e
SEMIA 4081 + Az	2,27 efg	0,45 c	40 c	52,59 e
SEMIA 4081 + AH	2,23 fgh	0,42 cde	43 bc	50,48 e
SEMIA 6361 + Az	2,18 gh	0,44 cd	40 bc	48,99 e
SEMIA 6361 + AH	2,14 hi	0,44 cd	41 bc	48,68 e
SEMIA 4081 + AF	1,91 jk	0,37 de	38 c	43,06 f
SEMIA 6361 + AF	1,86 k	0,35 e	41 bc	40,37 f
Leu01	1,67 l	0,26 f	28 d	35,44 g
SEMIA 4081	1,63 l	0,25 f	24 d	35,42 g
SEMIA 6361	1,58 l	0,25 f	27 d	31,10 h
Az	0,31 m	0,07 g	0 f	0,44 i
Controle-N	0,31 m	0,06 g	0 f	0,43 i

N: nitrogênio; MSPA: Massa seca da parte aérea; MSR: Massa seca da raiz; Massa dos nódulos secos; Nac: nitrogênio acumulado na parte aérea. *Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) segundo o teste de Tukey (n=5).

Neste experimento evidenciou-se o maior aumento da MSPA nas plantas de leucena quando foram co-inoculadas com rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com SH (tratamentos Leu01+Az+AH; Leu01+Az+AF; SEMIA 4081+Az+AH; SEMIA 4081+Az+AF; SEMIA 6361+Az+AH e SEMIA 6361+Az+AF), seguida da inoculação dos rizóbios com SH (tratamentos Plu03+AH; Plu03+AF; Plu14+AH; Plu14+AF; SEMIA 4077+AH e SEMIA 4077+AF) e a co-inoculação rizóbios e *A. brasilense* (Leu01+Az; SEMIA 4081+Az; SEMIA 6361+Az), a adição de N com SH (N+AH; N+AF), quando comparado com o controle+N (Tabela 4).

Esses resultados evidenciam o potencial da combinação dos efeitos benéficos da co-inoculação rizóbios e *A. brasilense* e a bioatividade das SH no crescimento das plantas de leucena, que podem ser explicados pelos benefícios da aplicação tanto das SH como das RPCP que têm sido relatadas em diversas pesquisas. Em relação aos efeitos das SH, há relatos que mostram que promovem o crescimento de plantas pelo estímulo da fotossíntese por mecanismos similares aos fitohormônios, à proliferação e alongamento das raízes devido à atividade H⁺-ATPase que induz a divisão celular (TREVISAN *et al.*, 2010; TREVISAN *et al.*, 2011; NARDI *et al.*, 2002, BARROS *et al.*, 2010, CANELLAS *et al.*, 2011), a assimilação dos nutrientes graças à presença de OH nos grupos carboxílicos e fenólicos (MUSCOLO *et al.*, 2013).

Em plantas de leucena, foi relatado que a aplicação AH extraídos de linhito contribuíram no aumento da MSPA das plantas (MURGAS e FALLA, 2016). Assim como também alguns trabalhos mostram a eficiência de rizóbios da fixação biológica de nitrogênio e seus benefícios na promoção de crescimento em plantas de leucena (RINCON *et al.*, 2000; BUENO e CAMARGO 2015; AGUIRRE-MEDINA *et al.*, 2015). Nos resultados do experimento (Tabela 4), também se evidenciaram aumentos da MSPA das plantas de leucena por co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* quando comparado com a inoculação isolada dos rizóbios e o Controle+N sendo similar aos aumentos relatado em trabalhos em plantas de soja e feijão co-inoculadas com rizóbios e *A. brasilense* (HUNGRIA *et al.*, 2013).

Em relação à aplicação conjunta de SH e RPCP têm sido relatados resultados similares em outras leguminosas, no caso de feijão-comum feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), onde foram testados AH extraídos de

vermicomposto em co-inoculação com RPCP em plantas de *Phaseolus vulgaris* submetidas a déficit hídrico. Os autores evidenciaram aumentos na MSPA das plantas tanto submetidas ou não ao estresse hídrico comparado com o tratamento controle não inoculado que recebeu adubação nitrogenada (MELO *et al.*, 2017). Em soja foi aplicado humato de sódio em conjunto com rizóbios na semente evidenciando aumentos no crescimento das plantas comparado com o controle (TILBA e SINEGOVSKAYA, 2012)

Em relação a massa seca da raiz das plantas de leucena foram observados os maiores aumentos nos tratamentos co-inoculados com rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com as SH (AH e AF) (Leu01+Az+AH; Leu01+Az+AF; SEMIA 4081+Az+AH; SEMIA 4081+Az+AF; SEMIA 6361+Az+AH; SEMIA 6361+Az+AF), seguido dos tratamentos co-inoculados com rizóbios e *A. brasilense*, seguido dos tratamentos inoculados com rizóbios com as SH (AH e AF), os tratamentos que receberam N com SH (N+AH e N+AF), em comparação com o tratamento controle não inoculado que recebeu N (Controle+N) e os tratamentos inoculados isoladamente com rizóbios.

Estes resultados mostram os efeitos benéficos que exerceram a co-inoculação rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com SH (AH e AF) sobre o crescimento das raízes de plantas de leucena. Os efeitos das SH relatados mostram que a bioatividade das SH induz o alongamento e proliferação de raízes que modificam a arquitetura do sistema radicular pelo aumento da atividade H⁺-ATPase que induz à elongação e divisão celular (NARDI *et al.*, 2002, BARROS *et al.*, 2010, CANELLAS *et al.*, 2011 CHEN e AVAID, 1990; FAÇANHA *et al.*, 2002; ZANDONADI *et al.*, 2007; TREVISAN *et al.*, 2010; CANELLAS e OLIVARES, 2014; CANELLAS *et al.*, 2015). Alguns trabalhos similares de aplicação conjunta de SH e RPCP foram relatados em leguminosas como o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), onde foram testados AH em co-inoculação com as estirpes de *Rhizobium tropici* BR322, BR520 e BR534 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54, mostrando aumentos da MSR tanto nas plantas submetidas ou não ao estresse hídrico (MELO *et al.*, 2017).

Em plantas de leucena, o maior número de nódulos (NN) foi observado nas plantas que foram co-inoculadas com rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com SH (Leu01+Az+AH; Leu01+Az+AF; SEMIA 4081+Az+AH; SEMIA 4081+Az+AF; SEMIA 6361+Az+AH; SEMIA

6361+Az+AF), seguido das plantas que foram co-inoculação rizóbio-*A. brasilense* (Leu01+Az; SEMIA 4081+Az; SEMIA 6361+Az) e as plantas inoculadas com rizóbios em aplicação conjunta com as SH (Leu01+AH; Leu01+AF; SEMIA 4081+AH; SEMIA 4081+AF; SEMIA 6361+AH; SEMIA 6361+AF), comparadas com as plantas inoculadas com rizóbios isoladamente. Em alguns trabalhos similares em leguminosas como a soja onde foram aplicados somente AH relataram aumentos do número de nódulos (TILBA e SINEGOVSKAYA, 2012) e em *Vigna radiata* L foi relatada a eficácia dos AH no desencadeamento da expressão de genes nod (AHMAD *et al.*, 2012). Em relação a co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* em plantas de leucena (Tabela 4) observou-se aumentos no número de nódulos, semelhante ao relatado em alguns trabalhos em feijão-comum, soja (HUGRIA *et al.*, 2013), e lentilhas (KUMAR e CHANDRA, 2008). Além disso, resultados semelhantes obtidos pela inoculação ou co-inoculação de RPCP em presença de SH foram relatados em soja (TILBA e SINEGOVSKAYA, 2012). Em contrapartida, os resultados obtidos neste estudo (Tabela 4) diferem dos encontrados em feijão comum onde não evidenciaram aumentos no NN por co-inoculação de rizóbios e *Herbaspirillum seropedicae* (MELO *et al.*, 2017).

Os resultados do nitrogênio acumulado (Nac) determinado na parte aérea das plantas de leucena mostraram que o maior acúmulo de N (Tabela 4) refletido na maior eficiência relativa (Ef) da FBN (Figura 2) nas plantas que foram co-inoculadas com os rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com SH (tratamentos Plu14+Az+AH; Plu14+Az+AF; Plu03+Az+AH; Plu03+Az+AF; SEMIA 4077+Az+AH e SEMIA 4077+Az+AF). Seguido das plantas que foram co-inoculadas com rizóbios e *A. brasilense*, seguido das plantas inoculadas com rizóbios com SH, as plantas inoculadas com rizóbios em conjunto com SH que aumentaram o Nac e obtiveram maior Ef (não havendo diferenças entres estes tratamentos), comparadas com as plantas inoculadas com rizóbios isoladamente e o controle não inoculado que recebeu N (controle+N).

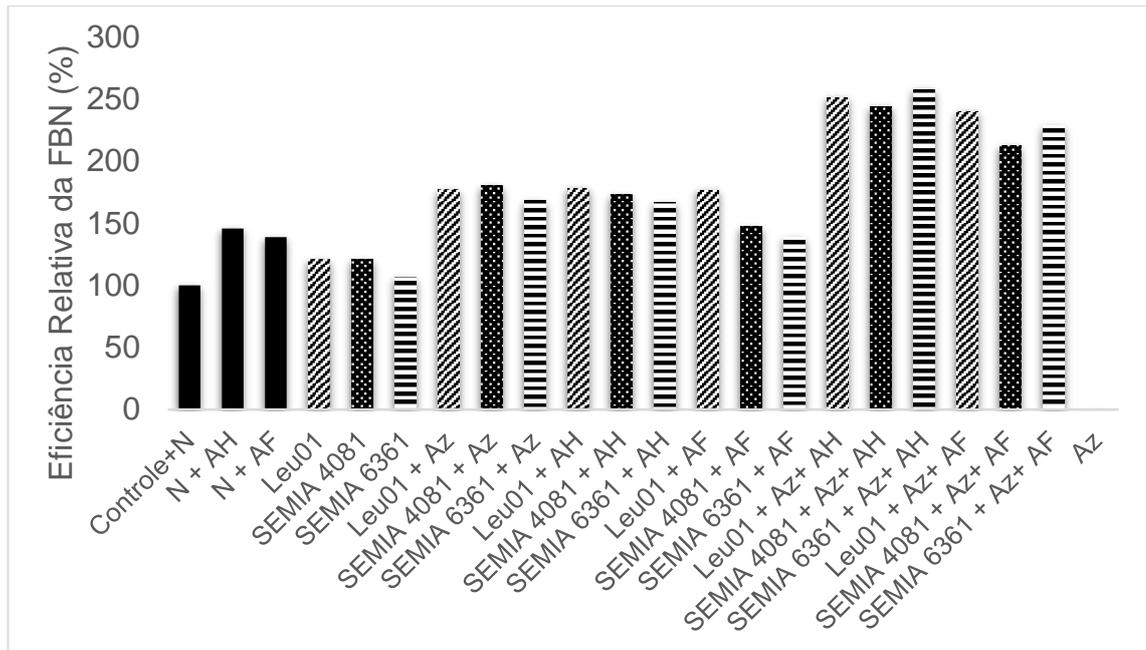


Figura 2. Eficiência relativa da fixação biológica de nitrogênio pela inoculação ou co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* em conjunto com substâncias húmicas em plantas de leucena.

Esses resultados obtidos evidenciam a eficiência da combinação dos efeitos da co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense*, e as SH que contribuíram ao maior estímulo do acúmulo de N na parte aérea das plantas de leucena e maior eficiência relativa da FBN. Sobre estes efeitos, há relatos das contribuições da inoculação isolada dos rizóbios no acúmulo de N e eficiência relativa da fixação biológica de nitrogênio em plantas de leucena (RINCON *et al.*, 2000; BUENO e CAMARGO 2015; AGUIRRE-MEDINA *et al.*, 2015). Também há relatos que mostram os efeitos das SH como moduladoras dos processos metabólicos nas plantas, como o aumento da atividade H^+ -ATPase, alteração do metabolismo do nitrogênio, e a fotossíntese (CANELLAS *et al.*, 2013). Resultados similares no aumento do Nac e Ef d FBN pela aplicação conjunta de SH em co-inoculação com rizóbios foram relatados em cultivos de soja inoculados com rizóbios em presença humate de sódio (ácidos húmicos com sódio), molibdato de amônio em campo foram relatados aumentos significativos Nac nas plantas (TILBA e SINEGOVSKAYA, 2012).

Os resultados obtidos nestes dois experimentos em plantas de feijão-fava e leucena mostraram que a co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com SH poderia ser considerada uma ferramenta potencial na promoção de crescimento de plantas na produção agrícola que podem ser

exploradas em futuras etapas em campo, não somente como alternativa econômica, senão como estratégia de sustentabilidade.

5. Conclusões

A co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com substâncias húmicas (ácidos húmicos e ácidos fúlvicos) em plantas de feijão-fava exerce maior promoção de crescimento de plantas de feijão-fava, estimulando o aumento da massa seca, a massa seca da raiz, o nitrogênio acumulado na parte aérea e na eficiência relativa da fixação biológica de nitrogênio das plantas, destacando-se a inoculação do isolado de rizóbio Plu14 e aplicação de AH.

A promoção de crescimento de plantas de leucena é maior quando as plantas são co-inoculadas com rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com substâncias húmicas (ácidos húmicos e ácidos fúlvicos) favorecendo aumentos da massa seca, a massa seca da raiz, o nitrogênio acumulado na parte aérea evidenciado na eficiência relativa da fixação biológica de nitrogênio.

A co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* assim como a inoculação de rizóbios com substâncias húmicas (ácidos húmicos e ácidos fúlvicos) aumentam o crescimento tanto das plantas de feijão-fava como das plantas de leucena.

A aplicação conjunta de substâncias húmicas (ácidos húmicos e ácidos fúlvicos) e rizóbios em co-inoculação com *A. brasilense* exerce maior aumento da massa seca dos nódulos secos em feijão-fava e maior número de nódulos em leucena.

CAPÍTULO VII – Potencial da co-inoculação de rizobactérias em aplicação conjunta de substâncias húmicas para promoção de crescimento de plantas de milho e aveia preta

1. Resumo

Na agricultura sustentável o uso de bioestimulantes como as substâncias húmicas (SH) e rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) tem se tornado uma alternativa para otimizar a produção agrícola, visando maior eficiência no uso de fertilizantes e menor impacto ambiental. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação conjunta de SH e rizóbios inoculados ou co-inoculados com *A. brasilense* na promoção de crescimento de milho e aveia preta. Foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação com plantas de milho e aveia preta tratadas com ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF), 50% da dose recomendada de nitrogênio (N50), rizóbios inoculados ou co-inoculados com *Azospirillum brasilense*. Também foram incluídos tratamentos controles com co-inoculação com rizóbios e *A. brasilense* com N50 sem SH, um tratamento com 100% da dose de nitrogênio (N100) com e sem SH e os controles não inoculados 50N e 100N. Em plantas de milho foram avaliados os isolados Vp16 e Lc348, enquanto em aveia preta foram as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5080. Nos tratamentos foram determinados a massa seca da parte aérea (MSPA), a massa seca da raiz (MSR), o nitrogênio acumulado (Nac) das plantas e o índice de eficiência relativa (Ef). Os resultados mostraram, tanto para milho como aveia preta que os maiores aumentos de MSPA, MSR, Nac e Ef se obtêm quando se faz a co-inoculação rizóbios e *A. brasilense* em conjunto com AH e N50, seguido da co-inoculação

de rizóbios e *A. brasilense* em conjunto com AF e N50, a inoculação de rizóbios em conjunto com SH e N50, quando comparada com a inoculação isolada e o controle N100. Em plantas de milho cultivadas com 50% da dose de N com aplicação conjunta de SH em co-inoculação com rizóbios e *A. brasilense* promove maior aumento do crescimento das plantas. A aplicação conjunta de SH em co-inoculação com rizóbios e *A. brasilense* com 50% da dose de N recomendada em plantas de aveia preta promove aumentos do crescimento. Portanto, a co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* em aplica o conjunta de SH poderia representar um grande potencial para a produção agrícola de milho e aveia preta de maneira sustentável.

2. Introdução

Os benefícios para as plantas da inoculação tanto de *A. brasilense* como de rizóbios em leguminosas já são amplamente conhecidos. Nos últimos anos tem aumentado o interesse em pesquisas com a inoculação de rizóbios em gramíneas, assim como a co-inoculação rizóbios e *A. brasilense*, o uso de bioestimulantes como as substâncias húmicas para a promoção de crescimento de plantas.

O milho (*Zea mays* L.) é um dos grãos de maior importância e volume de produção mundial, havendo sido produzidos na safra 2019/20 mais de 1,1 bilhões de toneladas (USDA, 2020). Na temporada 2019/20 no Brasil, deverá apresentar uma área de 18,5 milhões hectares, e uma produção recorde de 101 milhões de toneladas. (CONAB, 2020), sendo considerado o terceiro país maior produtor e o segundo maior exportador mundial de milho. Já a aveia preta (*Avena strigosa* Schreb) é uma gramínea amplamente utilizada para produção de grão quanto para pastagem, sendo relevante em sistemas de produção agrícola na rotação de cultivos durante o inverno no Estado do Rio Grande do Sul, consorciada com o cultivo da soja (LOPES *et al.*, 2009), ocupando no Brasil 2 milhões de hectares de área cultivada e em interação lavoura-pecuária (EMBRAPA, 2018).

A aplicação de fertilizantes químicos é uma das práticas mais custosas na produção dos cultivos tanto para alimentação humana como animal, além das taxas de aplicação, raramente são limitadas para refletir ou controlar

seu uso excessivo ou perda permanente. O nitrogênio (N) é o nutriente requerido em maior quantidade pelas gramíneas, tornando-se um dos fatores limitantes, tanto no rendimento de grãos como na qualidade do produto e conseqüentemente do teor de proteína nos grãos (AMARAL FILHO *et al.*, 2005). Além disso, menos de 50% do N aplicado ao solo é absorvido pelas plantas devido à fatores como lixiviação, volatilização de amônia, desnitrificação, erosão e imobilização microbiana (HALVORSON *et al.*, 2002), o que contribui para a contaminação do solo e as águas subsuperficiais com o N, levando a danos na saúde e comprometendo a sustentabilidade agrícola (TILMAN, 1998; ADESMOYE e KLOEPPER, 2009).

A utilização de bioestimulantes como as substâncias húmicas (SH) (ácidos húmicos e ácidos fúlvicos) representam uma estratégia de produção agrícola sustentável, que facilita o aumento do rendimento e produtividade dos cultivos (SHAH *et al.*, 2018), existindo inúmeros de trabalhos que relatam como as SH podem estimular o crescimento das plantas de forma direta ou indireta (CHEN e AVIAD, 1990; STEVESON, 1994; VARANINI e PINTON, 2001; NARDI *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2004; CANELLAS e OLIVARES, 2014; CANELLAS *et al.*, 2015). Os efeitos indiretos atuam sob as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo determinando a fertilidade, enquanto os diretos atuam sob os processos metabólicos e fisiológicos das plantas como o desenvolvimento radicular, desenvolvimento foliar, aumento na absorção de nutrientes e regulação de enzimas importantes para o metabolismo vegetal, como por exemplo a H⁺-ATPase, VTP-ase, nitrato redutase, e auxínico (PINTON *et al.*, 1992; FAÇANHA *et al.*, 2002; NARDI *et al.*, 2005; ZANDONADI e BUSATO, 2012; ZANDONADI *et al.*, 2013, ZANDONATI *et al.*, 2014, CANELLAS *et al.*, 2015, SHAH *et al.*, 2018).

Estes efeitos são dependentes da espécie, o órgão e a idade da planta, a dose recomendada para cada espécie ou cultivar, a fonte de material orgânico de onde foi extraída e, as características das substâncias húmicas (VAUGHAN e MALCOLM, 1985; RODDA *et al.*, 2006; ZANDONADI *et al.*, 2014). Existem relatos da bioatividade das SH em plantas de milho: estimulando a promoção do desenvolvimento radicular pela ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática (FAÇANHA *et al.*, 2002), gerando divisão celular, proliferação e alongamento das raízes (NARDI *et al.*, 2002, BARROS *et al.*, 2010, TREVISAN *et al.*, 2010,

CANELLAS *et al.*, 2011). Além disso, tem sido evidenciado mudanças na exsudação de ácido orgânico pelas plantas induzidas pela presença de SH, aumentando a acidificação e induzindo maior atividade e síntese de H⁺-ATPase, sendo descrita uma relação entre ácidos orgânicos e exsudação de prótons e o aumento da exsudação de ácido orgânico em plântulas de milho após o tratamento com SH (OHNO *et al.*, 2004; CANELLAS *et al.*, 2008; PUGLISI *et al.*, 2008). Também tem se relatado que as SH estimulam a fotossínteses por mecanismos aparentemente similares às fitohormônios (TREVISAN *et al.*, 2011), além de melhorar a assimilação dos nutrientes pelas raízes pela presença de OH em grupos carboxílicos y fenólicos (MUSCOLO *et al.*, 2013). Enquanto as plantas de aveia preta têm sido avaliadas SH extraídas de diferentes tipos de carvões apresentaram diferentes efeitos positivos sobre o crescimento das plantas, aumentando a altura, a matéria seca da parte aérea, o comprimento das raízes e diminuíram o rádio médio das raízes, comparados com o tratamento controle (SILVA *et al.*, 2000b).

Entretanto, as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) também representam uma estratégia de produção sustentável, devido a que podem estimular o crescimento das plantas diversos mecanismos como: a fixação biológica de N (FBN) (INIGUEZ *et al.*, 2004; MONTAÑEZ *et al.*, 2009), a produção de auxinas, citocininas, giberelinas e a inibição de etileno (ARSHAD e FRANKENBERGER, 1992; PERRIG *et al.*, 2007), o antagonismo contra fitopatógenos (CORREA *et al.*, 2008), a produção de sideróforos (SCHER e BAKER, 1982), a competição por nutrientes, a indução de resistência sistêmica adquirida (PIETERSE *et al.*, 2003), ou o aumento da disponibilidade de nutrientes como fósforo (SESSITSCH *et al.*, 2002; STURZ *et al.*, 2000). Esses mecanismos das RPCP podem interagir de forma combinada em benefício da planta (DOBBELAERE *et al.*, 2003).

A eficiência da inoculação de RPCP tem sido demonstrada na promoção de crescimento de milho e aveia preta, estando relacionada no aumento da germinação em casa de vegetação e a campo, melhor absorção de nutrientes, aumento tanto na biomassa quanto na altura das plantas e maior produção de grãos (GUTIERREZ-ZAMORA e ROMERO, 2001, BÉCQUER *et al.*, 2011, MACHADO, 2011; HAHN *et al.*, 2013; SANTOS, 2018). Dentre as RCPP utilizadas como inoculantes encontra-se *Azospirillum brasilense*, que tem dado

boas respostas no cultivo de milho (QUADROS, 2009; HUNGRIA *et al.*, 2010; MARINI *et al.*, 2015; MULLER *et al.*, 2016, SANTOS, 2018). Por outra parte, também tem havido grande interesse em estudar a capacidade de rizóbios noduladores de leguminosas de promover o crescimento do milho (GUTIERREZ-ZAMORA e ROMERO, 2001; BÉCQUER *et al.*, 2011; HAHN *et al.*, 2013; SANTOS, 2018) e outros cultivos. Além disso, nos últimos anos tem se desenvolvido e avaliado a técnica de co-inoculação, que consiste na mistura de inoculantes contendo RPCP (HUNGRIA *et al.*, 2013), sendo avaliada no milho a co-inoculação de rizóbios e *Azospirillum brasilense*, onde os rizóbio em associação tem a capacidade na maior parte de produzir fitohormônios entre outros mecanismos, enquanto *A. brasilense* supre a necessidade de N parcialmente para o desenvolvimento da planta (HUNGRIA *et al.*, 2007), obtendo-se maior crescimento de N e aumento da produtividade (HAHN *et al.*, 2013). Em um estudo de inoculação de rizóbios e co-inoculação com *A. brasilense* foram relatados que os rizóbios contribuem na modificação da cinética da absorção de nitrogênio (SANTOS, 2018). Em aveia preta, os efeitos desta técnica de co-inoculação ainda não são conhecidos.

Em relação ao uso combinado de RPCP e SH, existem relatos de efeitos positivos da aplicação conjunta de SH extraídas de vermicomposto e *Herbaspirillum seropedicae* em plantas de milho, mostrando aumentos sobre a germinação de sementes de milho, da população microbiana, no desenvolvimento e crescimento da planta e na produtividade do cultivo e rendimento do grão comparada com aplicação isolada (CONCEIÇÃO *et al.*, 2008, MARQUES JUNIOR, 2010; CANELAS *et al.*, 2012; CANELAS *et al.*, 2013; CANELLAS *et al.*, 2015). Também tem sido reportado o uso combinado de *Rhizobium cellulosilyticum* e SH extraídas de estrume de bovino, aumentando o estímulo sobre a germinação e desempenho inicial de plantas de milho (MELO *et al.*, 2017). Porém, são poucos os trabalhos que evidenciem os efeitos do uso combinado de SH de outras fontes e rizóbios inoculados, como também o uso de co-inoculação com rizóbios e *A. brasilense* tanto em plantas de milho como em aveia preta.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação conjunta de SH e co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* na promoção de crescimento de milho e aveia preta.

3. Material e métodos

Dois experimentos foram conduzidos separadamente na casa de vegetação do Departamento de Solos, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sendo o milho estabelecido no verão e aveia preta no inverno. As sementes e os cultivos bacterianos foram processados no Laboratório de Microbiologia do Solo da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

Desinfestação das Sementes

Para o experimento de milho (*Zea mays* L.) foram utilizadas sementes do híbrido Morgan 30A77PW, caracterizado como superprecoce e utilizado para produção de grãos. Essas sementes foram desinfestadas por imersão sucessiva em álcool (70%) por 30 segundos, hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 segundos e, logo após, seis lavagens consecutivas com água destilada esterilizada (VINCENT, 1970). Em seguida, 3 sementes foram semeadas em vasos plásticos com capacidade de 1,5 L previamente lavados e flambados com álcool etílico 99% e enchidos com uma mistura de vermiculita e areia na proporção (2:1) esterilizada em autoclave.

No experimento de aveia preta (*Avena strigosa* Schreb) foram utilizadas sementes do cultivar IAPAR 61, utilizado amplamente na rotação de cultivos no inverno no estado do Rio Grande do Sul. As sementes foram desinfestadas pelo método de Vincent (1970) descrito anteriormente modificando a imersão em hipoclorito de sódio (1%) por 30 segundos devido à sensibilidade da semente. Em seguida, as sementes foram pre-germinadas em papel filtro úmido com água destilada estéril, e logo após, semeadas 3 sementes em vasos plásticos com capacidade de 1,5 L, previamente lavados e flambados com álcool etílico 99%, enchidos com uma mistura de vermiculita e areia na proporção (2:1) estéril.

Produção dos inoculos dos isolados e estirpes de RPCP

Para o experimento de milho foi realizado um cultivo bacteriano separadamente dos rizóbios UFRGS Vp16 (*Burkholderia* sp.), isolado de trevo

branco (*Trifolium repens*) por ALVES (2005), e UFRGS Lc348 (*Mesorhizobium* sp.), isolado de plantas de cornichão (*Lotus corniculatus*) por FRIZZO (2007), ambos pertencentes à Coleção de Culturas de Rizóbios da UFRGS. Esses dois isolados foram selecionados por serem eficientes na promoção de crescimento do híbrido de milho Morgan 30A77PW, além de modificar positivamente a cinética de absorção de nitrogênio de forma isolada ou combinada com *A. brasilense* (SANTOS, 2018).

Os rizóbios utilizados em aveia preta foram as estirpes SEMIA 587 (*Bradyrhizobium elkani*) e SEMIA 5080 (*B. diazoefficiens*) da coleção de rizóbios SEMIA do Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária (DDPA). Essas estirpes têm sido amplamente estudadas mostrando uma alta eficiência simbiótica e competitividade, sendo recomendadas pelo Ministério de Agricultura Pesca e Abastecimento (MAPA) como inoculantes para o cultivo de soja, que é estabelecido em sistema de consorciação com aveia preta.

Para produzir o inoculo dos rizóbios, cada isolado foi cultivado separadamente em tubos falcon com 30 mL de meio de cultura levedura manitol líquido (VINCENT, 1970) e, mantidos em incubador orbital a 28°C±2 com agitação de 120 rpm até conseguir uma concentração de 10⁸ células.mL⁻¹ de acordo com o tempo de crescimento de cada isolado.

No caso de *A. brasilense*, foi utilizado produto comercial a base das estirpes AbV5 e AbV6 de *A. brasilense* em concentração de 10⁸ células.mL⁻¹.

Substâncias húmicas.

Neste estudo foram utilizados dois bioestimuladores comerciais ricos em substâncias húmicas (SH) extraídas de carvão tipo leonardita: um dos produtos foi Growmate Plant, à base de ácidos fúlvicos em concentração de 1,35 %, que daqui em diante será referido como AF. O outro produto foi Growmate Soil, à base de ácidos húmicos em concentração de 1,44 % que daqui em diante será referido como AH. As SH foram aplicadas na dose recomendada pelo fabricante 4L.ha⁻¹, sendo adicionados 10 mL de uma solução (7,5 mL.L⁻¹).

Nutrição mineral das plantas de milho e aveia-preta.

As plantas de milho foram cultivadas com adição da metade da dose de nitrogênio (50%) recomendada (equivalente a 75 kg.ha⁻¹) sendo o N adicionado nos vasos semanalmente 10 mL de uma solução NH₄NO₃ (3 g.L⁻¹). Utilizaram-se tratamentos controles com adição de N50% e com 100% (equivalente a 150 kg.ha⁻¹), sendo o N adicionado nos vasos semanalmente 10 mL de uma solução NH₄NO₃ (6 g.L⁻¹) para 100%.

Em aveia preta, as plantas foram cultivadas com adição da metade da dose de nitrogênio (50%) recomendada (equivalente a 40 kg.ha⁻¹) sendo o N adicionado nos vasos semanalmente 10 mL de uma solução NH₄NO₃ (1,43 g.L⁻¹). Utilizaram-se tratamentos controles com adição de N50% e com 100% (equivalente a 80 kg.ha⁻¹), sendo o N adicionado nos vasos semanalmente 10 mL de uma solução NH₄NO₃ (2,86 g.L⁻¹) para 100%.

Todas as plantas foram irrigadas com solução nutritiva de SARRUGE (1975) a 50% da sua força iônica.

Experimento de aplicação de SH em conjunto com rizóbios inoculados ou co-inoculados com *A. brasilense* em plantas de milho em casa de vegetação.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com cinco repetições. Neste estudo foram estabelecidos 18 tratamentos (Tabela 1), constituídos por inoculação dos isolados de rizóbios UFRGS Vp16 e UFRGS Lc348 ou co-inoculação com as estirpes AbV5 e AbV6 de *A. brasilense* e adição de doses de N (50% e 100%) em conjunto com ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF).

Os tratamentos que foram inoculados com os isolados de rizóbios UFRGS Vp16 e UFRGS Lc348 receberam 2 mL de caldo bacteriano na semeadura das sementes, enquanto os tratamentos inoculados com as estirpes AbV5 e AbV6 de *A. brasilense*, foram inoculados com 1 mL do produto comercial na semeadura das sementes.

Tabela 1. Identificação e descrição dos tratamentos no experimento com plantas de milho.

Tratamento	Descrição
Controle N50	Não inoculado, com 50% N
Controle N100	Não inoculado, com 100% N
N50+AH	Não inoculado, com 50% N + ácidos húmicos
N50+AF	Não inoculado com 50% N + ácidos fúlvicos
N100+AH	Não inoculado, com 100% N + ácidos húmicos
N100+AF	Não inoculado com adubação 100% N + ácidos fúlvicos
N50+Vp16	50% N + inoculação Vp16
N50+Vp16+AH	50% N + inoculação Vp16 + ácidos húmicos
N50+ Vp16+AF	50% N + inoculação Vp16+ ácidos fúlvicos
N50+ Vp16+Az	50% N + inoculação Vp16 + <i>A.brasilense</i>
N50+ Vp16+Az+AH	50% N + inoculação Vp16 + <i>A.brasilense</i> + ácidos húmicos
N50+ Vp16 +Az+AF	50% N + inoculação Vp16 + <i>A.brasilense</i> + ácidos fúlvicos.
N50+Lc348	50% N + inoculação Lc348
N50+ Lc348+AH	50% N + inoculação Lc348 + ácidos húmicos
N50+ Lc348+AF	50% N + inoculação Lc348 + ácidos fúlvicos.
N50+ Lc348+Az	50% N + inoculação Lc348 + <i>A.brasilense</i>
N50+ Lc348+Az+AH	50% N + inoculação Lc348 + <i>A.brasilense</i> + ácidos húmicos
N50+ Lc348+Az+AF	50% N + inoculação Lc348 + <i>A.brasilense</i> + ácidos fúlvicos

As substâncias húmicas AH e AF foram adicionadas segundo o tratamento um dia antes e o nitrogênio na forma de NH_4NO_3 foi adicionado 3 dias após da semeadura das sementes. Uma semana após instalação do experimento foi realizado o desbaste deixando-se uma planta por vaso.

Experimento de aplicação de SH em conjunto com rizóbios inoculados ou co-inoculados com *A. brasilense* em plantas de aveia preta em casa de vegetação

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com cinco repetições. Neste estudo foram estabelecidos 18 tratamentos (Tabela 2), constituídos por inoculação das estirpes SEMIA 587 (*Bradyrhizobium elkanii*) e SEMIA 5080 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*) ou co-inoculação com *A. brasilense* e adição de doses de nitrogênio (N50% e N100%) em conjunto com ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF).

Tabela 2. Identificação e descrição dos tratamentos experimento em plantas de aveia preta.

Tratamento	Descrição
Controle N50	Não inoculado, com 50% N
Controle N100	Não inoculado, com 100% N
N50+AH	Não inoculado, com 50% N + ácidos húmicos
N50+AF	Não inoculado com 50% N + ácidos fúlvicos
N100+AH	Não inoculado, com 100% N + ácidos húmicos
N100+AF	Não inoculado com 100% N + ácidos fúlvicos
N50+SEMIA 587	50% N + inoculação SEMIA 587
N50+SEMIA 587+AH	50% N + inoculação SEMIA 587 + ácidos húmicos
N50+SEMIA 587+AF	50% N + inoculação SEMIA 587 + ácidos fúlvicos
N50+SEMIA 587+Az	50% N + inoculação SEMIA 587 + <i>A.brasilense</i>
N50+SEMIA 587+Az+AH	50% N + inoculação SEMIA 587 + <i>A.brasilense</i> + ácidos húmicos
N50+SEMIA 587+Az+AF	50% N + inoculação SEMIA 587 + <i>A.brasilense</i> + ácidos fúlvicos
N50+SEMIA 5080	50% N + inoculação SEMIA 5080
N50+SEMIA 5080+AH	50% N + inoculação SEMIA 5080 + ácidos húmicos
N50+SEMIA 5080+AF	50% N + inoculação SEMIA 5080 + ácidos fúlvicos
N50+SEMIA 5080+Az	50% N + inoculação SEMIA 5080 + <i>A.brasilense</i>
N50+SEMIA 5080+Az+AH	50% N + inoculação SEMIA 5080 + <i>A.brasilense</i> + ácidos húmicos
N50+SEMIA 5080+Az+AF	50% N + inoculação SEMIA 5080 + <i>A.brasilense</i> + ácidos fúlvicos

Os tratamentos que foram inoculados com as estirpes de rizóbios SEMIA 587 e SEMIA 5080 receberam 2 mL de caldo bacteriano na sementeira das sementes. Os tratamentos inoculados com *A. brasilense* receberam 1 mL do produto comercial a base das estirpes AbV5 e AbV6 na sementeira das sementes. As substâncias húmicas AH e AF foram adicionadas um dia antes e o nitrogênio na forma de NH_4NO_3 foi adicionado 3 dias após da sementeira das sementes. Uma semana após instalação do experimento foi realizado o desbaste deixando-se uma planta por vaso.

Avaliações realizadas.

Os experimentos foram encerrados após de 45 dias de cultivo, sendo coletadas as plantas. Foi separada a parte aérea do sistema radicular, sendo determinada a massa seca da parte aérea (MSPA), a massa seca da raiz (MSR), e posteriormente foi verificado o N total acumulado (Nac) na parte aérea e a

eficiência relativa (Ef) da inoculação e co-inoculação dos rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com SH na promoção de crescimento das plantas. Para isto, a parte aérea foi acondicionada em sacos de papel e submetida a secagem em estufa de circulação forçada a 65°C, durante três dias e logo foi moída para a quantificação de N pelo método descrito por TEDESCO *et al.*, (1995). Todas as raízes foram lavadas para se retirar partículas de substrato aderidas, sendo secas com papel toalha absorvente para retirar o excesso de água. Em seguida, as raízes foram secas em sacos nas mesmas condições anteriores, sendo determinada a massa. A eficiência relativa (Ef) na massa seca das plantas de milho e aveia preta foi determinado utilizando-se o método de BROCKWELL *et al.*, (1966) modificado. O valor foi calculado, utilizando-se os valores de massa seca de acordo com a seguinte formula:

$$Ef (\%) = (T_{\text{Inoc.}} - TN50) / (TN100 - TN50) \times 100$$

Sendo:

T_{inoc} = tratamento inoculado ou co-inoculado.

TN50 = controle não inoculado que recebeu 50% de N.

TN100 = controle não inoculado que recebeu 100% de N.

Analises dos dados

Os dados obtidos nos dois experimentos foram submetidos separadamente à análise de variância, sendo a comparação de medias realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o programa estadístico SPSS 15.

4. Resultados e Discussão

Efeitos da aplicação de SH em conjunto com rizóbios inoculados ou co-inoculados com *A. brasilense* em plantas de milho em casa de vegetação

Os resultados obtidos na avaliação da promoção de crescimento de plantas de milho em resposta à inoculação e co-inoculação de rizóbios com

A. brasilense em aplicação conjunta de substâncias húmicas e 50% da dose de nitrogênio mineral (N), comparado com os controles que receberam uma dose de N (100% e 50%) com e sem SH, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Produção de Massa seca da parte aérea (MSPA), Massa seca da raiz (MSR) e Nitrogênio acumulado na parte aérea (Nac) em plantas de milho pela inoculação ou co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* em conjunto com substâncias húmicas.

Tratamentos	MSPA	MSR	Nac
	----- g -----		mg
Controle N100	4,98 j	2,31 fg	56,39 k
N100 + AH	5,87 h	2,91 cd	84,98 g
N100 + AF	5,36 i	2,61 def	71,04 i
N50 + Vp16	5,55 i	2,52 def	63,32 j
N50 + Lc348	5,09 j	2,42 ef	56,16 k
N50 + Vp16 + Az	6,34 ef	2,63 def	95,07 f
N50 + Lc348 + Az	6,19 fg	2,34 fg	91,63 f
N50 + Vp16 + AH	6,49 e	3,20 c	102,05 e
N50 + Lc348 + AH	6,15 fg	2,85 cde	90,72 f
N50 + Vp16 + AF	6,08 gh	2,89 cde	80,12 h
N50 + Lc348 + AF	5,91 h	2,74 cdef	75,08 i
N50 + Vp16 + Az + AH	8,73 a	3,72 a	158,34 a
N50 + Lc348 + Az + AH	8,11 b	3,58 ab	141,53 b
N50 + Vp16 + Az + AF	7,63 c	3,50 ab	128,31 c
N50 + Lc348 + Az + AF	7,27 d	3,51 ab	115,36 d
N50 + AF	3,40 l	2,33 def	26,00 l
N50 + AH	3,67 k	2,30 fg	30,49 l
Controle N50	2,99 m	1,94 g	17,35 m

*Letras iguais não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) segundo o teste de Tukey ($n=5$).

Os resultados obtidos no experimento conduzido em casa de vegetação com plantas de milho mostram o potencial que tem a combinação dos efeitos de promoção de crescimento de plantas das substâncias húmicas (AH e AF) e a co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense*.

Neste experimento, evidenciou-se um aumento da massa seca da parte aérea (MSPA), sendo maior quando as plantas foram co-inoculadas com rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com as SH, seguida da co-inoculação rizóbios e *A. brasilense*, e da inoculação de rizóbios em aplicação conjunta de SH, comparando-se com as plantas que receberam a inoculação isolada dos rizóbios, os tratamentos com adubação mineral N100 com SH (AH e AF) e os tratamentos controle N100 e controle N50.

Esses resultados sugerem que a co-inoculação com rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta de SH exerceram maior efeito benéfico na produção de massa seca nas plantas de milho. Os efeitos benéficos que podem exercer a co-inoculação com rizóbios e *A. brasilense* na promoção de crescimento de plantas de milho têm sido relatados, obtendo-se maior crescimento, assimilação dos nutrientes e aumento da produtividade (HAHN *et al.*, 2013; SANTOS, 2018). Também se tem relatos da bioatividade das SH na promoção de crescimento de plantas de milho, que gera um estímulo na fotossíntese por mecanismos aparentemente similares aos fitohormônios (TREVISAN *et al.*, 2011), ativação da atividade H⁺-ATPase da membrana plasmática (FAÇANHA *et al.*, 2002), estimulando a divisão celular, proliferação e alongamento das raízes (NARDI *et al.*, 2002, BARROS *et al.*, 2010, TREVISAN *et al.*, 2010, CANELLAS *et al.*, 2011), além de melhorar a assimilação dos nutrientes pelas raízes pela presença de OH em grupos carboxílicos e fenólicos (MUSCOLO *et al.*, 2013).

Os resultados também mostraram que o valor de MSPA foi maior quando as plantas foram co-inoculadas com rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com AH, quando comparada com a co-inoculação com rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com AF. Este fato poder ser explicado pelas diferenças do tipo de SH empregadas, constituição e sua concentração, concordando com o relatado de que os efeitos das SH são dependentes da fonte, características e os tipos (VAUGHAN e MALCOLM, 1985; RODDA *et al.*, 2006; ZANDONADI *et al.*, 2014).

Foi evidenciado que os resultados obtidos pela co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* aumentaram a MSPA das plantas de milho, semelhante à inoculação dos rizóbios Vp16 e LC348 em conjunto com as SH, e à adição conjunta de N100 com SH (AH e AF), em comparação com as plantas inoculadas com os rizóbios e os tratamentos controles N100 e N50. Resultados similares tem sido relatado do aumento da MSPA, modificação da cinética de absorção e assimilação de N em plantas de milho pela inoculação dos rizóbios Vp16 e Lc348 ou em co-inoculação com *A. brasilense* (HAHN *et al.*, 2013; SANTOS, 2018). Em outro estudo, foi relatado que o tratamento combinado do isolado *Rhizobium cellulosityticum* e AH extraídos de estrume de bovino em plantas de milho obteve maior aumento da MSPA comparada com a aplicação e inoculação isolada

destes (MELO *et al.*, 2017). Outros trabalhos utilizando *Herbaspirillum seropedicae* em aplicação conjunta com SH extraídas de vermicomposto em plantas de milho, mostraram um aumento sobre a germinação de sementes de milho, da população microbiana, desenvolvimento e crescimento da planta e, a produtividade do cultivo e rendimento do grão comparada com aplicação isolada (CONCEIÇÃO *et al.*, 2008, MARQUES JUNIOR, 2010; CANELAS *et al.*, 2013; CANELLAS *et al.*, 2015).

Em relação à massa seca da raiz das plantas de milho (Tabela 3), os maiores aumentos (3,51 - 3,72 g) foram obtidos nos tratamentos co-inoculados com os isolados de rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com as SH (AH e AF), mostrando diferenças com os outros tratamentos e o controle N100. Esses resultados mostram a interação que há entre os efeitos dos rizóbios e *A. brasilense* conjuntamente com os AH e AF sobre o desenvolvimento da raiz das plantas de milho. Esses efeitos de têm sido relatados em alguns trabalhos, no caso destas RPCP quando se associam com a planta hospedeira induzem alongamento das raízes, maior densidade, comprimento de raízes e aumento de pelos radiculares pela produção de fitohormônios, refletindo-se no aumento da massa secado sistema radicular (POONGUZHALI *et al.*, 2008; BÁRBARO *et al.*, 2008; BASHAN e DE-BASHAN 2010; HAHN *et al.*, 2013). No caso das SH se tem documentado os efeitos na promoção de emergência de raízes, mudanças morfológicas, aumento da densidade e aumento dos pelos radiculares, o efeito “como auxina” e o desenvolvimento da arquitetura radicular (NARDI *et al.*, 2017, OLIVARES *et al.*, 2017; BALDOTTO *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011; CANELLAS e OLIVARES, 2014). Além disso, também tem sido reportado que os AH aumentam a atividade H⁺-ATPase gerando uma expansão da raiz facilitando sítios de colonização para *Herbaspirillum seropedicae* no milho (MARQUES JUNIOR *et al.*, 2008), sendo corroborado por CANELLAS e OLIVARES (2017) a modulação que exercem ácidos húmicos sobre a produção de células do córtex estimulando maior colonização de *H. seropedicae*.

Os aumentos observados na MSR nas plantas de milho pela co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com SH neste estudo (Tabela 3), diferem dos observados em um trabalho realizado com inoculação de RPCP (*Burkholderia gladioli* e *Rhizobium cellulosilyticum*) em aplicação conjunta com AH em plantas de milho onde não foram evidenciadas

mudanças na MSR comparado com o controle (MELO *et al.*, 2017). Porém, estes resultados foram semelhantes aos obtidos nos outros tratamentos onde foram somente inoculados os rizóbios com SH, os tratamentos co-inoculados com rizóbios e *Azospirillum*, os tratamentos inoculados com rizóbios isoladamente, os tratamentos com N100 mais as SH e os controles N100 que não apresentaram diferenças entre eles.

Em relação ao N acumulado na parte aérea das plantas de milho observou-se que os maiores acúmulos de N foram nos tratamentos co-inoculados com rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com SH (AH e AF), seguido dos tratamentos que foram inoculados com rizóbios em presença de SH, dos tratamentos co-inoculados rizóbios e *Azospirillum*, comparado com os tratamentos inoculados isoladamente com rizóbios, os tratamentos com adição de N100 em conjunto com SH e o controle N100. Esses resultados evidenciam o potencial que tem a aplicação conjunta das SH e a co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* que promovem aumentos de até três vezes o acúmulo de N na parte aérea da planta. Relatos semelhantes sobre os efeitos no aumento na absorção de nutrientes tanto das RCPS avaliadas neste estudo (rizóbios Vp16 e Lc348 e *A. brasilense*) como as SH (AH e AF). Em relação aos isolados de rizóbios Vp16 e Lc348 contribuem no aumento geral da absorção de macro e micronutrientes (HAHN *et al.*, 2013; SANTOS, 2018), havendo evidências que quando inoculados isoladamente o co-inoculados com *A. brasilense* podem modificar a cinética absorção de $N-NH_4^+$ e $N-NO_3^-$ (SANTOS, 2018). Da mesma maneira, tem sido evidenciada a capacidade de *A. brasilense* de fixar nitrogênio e suprir parcialmente a necessidade das plantas de milho (QUADROS, 2009; HUNGRIA *et al.*, 2010; MARINI *et al.*, 2015; MULLER *et al.*, 2016; SANTOS, 2018).

Efeitos da bioatividade das SH na absorção de nutrientes pelas plantas também tem sido relatados, devido à indução da atividade da H^+ -ATPase, estimulando a codificação de um dos genes principais como o Mh2 que é expressado nas células das raízes de milho (QUAGGIOTTI *et al.*, 2004), além de energizar transportadores de íons secundários e promover absorção de nutrientes como no caso do nitrato por meio de canais iônicos estabelecidos na membrana plasmática e, transportado de maneira assimétrica por prótons ($2:1 H^+:NO_3^-$) (CANELLAS *et al.*, 2015). Também, tem sido relatado, o aumento

no transporte de nitratos pela atividade de SH em plantas de milho (NARDI *et al.*, 2000). Tais evidências poderiam explicar os resultados obtidos neste estudo no tratamento de adição de N100+AH e N100+AF onde se observou aumento no acúmulo de N nas plantas de milho quando comparado com o controle N100 (Tabela 3). Porém nos tratamentos de aplicação conjunta de SH em co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* a quantidade de N foi reduzida em 50% obtendo-se maior acúmulo de N nas plantas, concordando com o relatado em alguns estudos, que afirmam que os resultados positivos de inoculação ou co-inoculação de RPCP são mais evidentes com a redução e uso de doses médias de N aplicado (ROESCH *et al.*, 2006; VERESOGLOU e MENEXES, 2010; LANA *et al.*, 2012; SKONIESKI, 2015, SANTOS, 2018).

Em trabalhos de inoculação de RPCP em conjunto com substâncias húmicas tem sido relatado também os efeitos sinérgicos sob o acúmulo de N em plantas de milho. Foi avaliado o efeito da inoculação de *H. seropedicae* estirpe HRC54 (450L.ha⁻¹) e aplicação foliar de AH (50mg C de AH) extraídos de vermicomposto em campo com utilizando diferentes quantidade de fertilidade com N (0-200 kg de N.ha⁻¹) em parcelas, obtendo-se um aumento do rendimento de grãos até 75 kg N.ha⁻¹, não havendo efeitos da combinação da RPCP e AH nas concentrações mais altas (CANELLAS *et al.*, 2015). Outro estudo relatou que a combinação de *H. seropedicae* e diferentes concentrações de AH induziram a atividade da enzima nitrato redutase de 120-230 % quando comparado com tratamento controle, considerada importante para redução de nitrato a amônio (CANELLAS *et al.*, 2013)

Os efeitos diferenciados da inoculação ou co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* em conjunto com substâncias húmicas (AH e AF) na promoção de crescimento de plantas de milho podem ser visualizados pelo índice eficiência relativa (Ef) na massa seca da parte aérea (Figura 1).

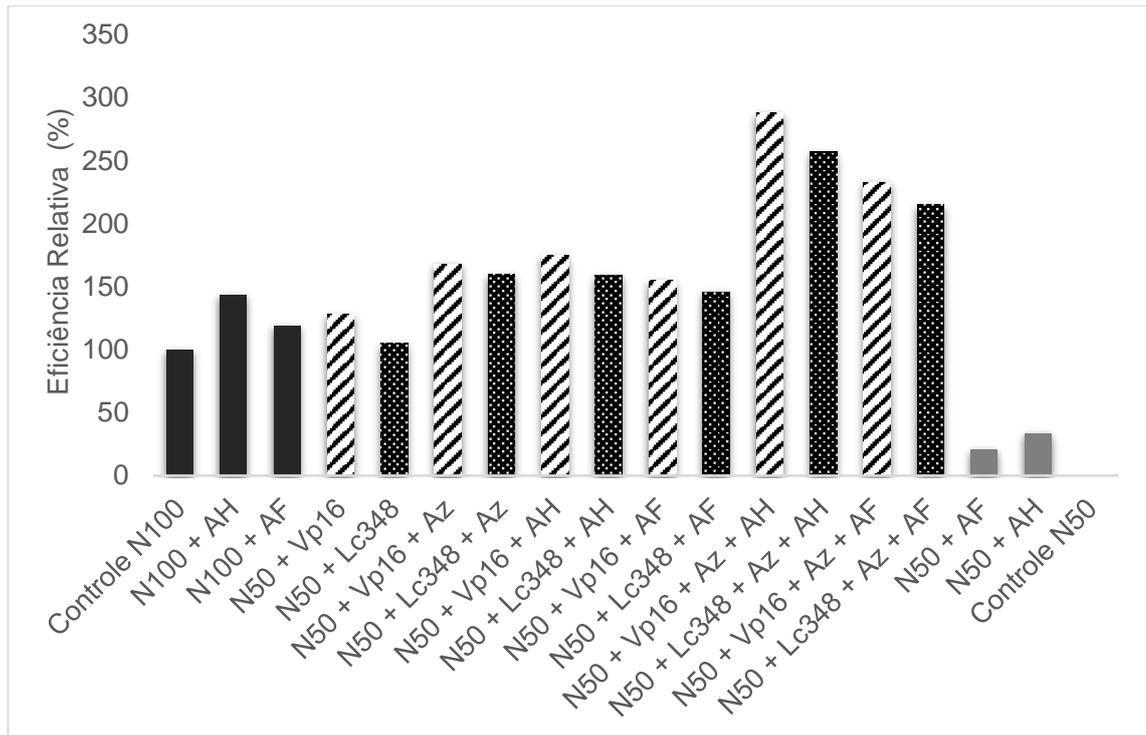


Figura 1. Eficiência relativa da inoculação ou co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* em conjunto com substâncias húmicas na produção de massa seca da parte aérea nas plantas de milho.

Verificaram-se os maiores índices com a co-inoculação rizóbios e *A. brasilense* em conjunto com AH, seguido da co-inoculação rizóbios e *A. brasilense* em conjunto com AF, a inoculação de rizóbios com SH, quando comparada com a inoculação isolada e o controle N100. Esses resultados comprovam a eficácia da co-inoculação de rizóbios (Vp16 e Lc348) e *A. brasilense* em conjunto com substâncias húmicas (AH e AF) na promoção de crescimento de plantas de milho cultivadas com redução da dose de N em 50%. Nesse sentido, os resultados obtidos neste experimento na eficiência relativa, na massa seca da parte aérea, na massa seca da raiz e o nitrogênio acumulado na parte aérea das plantas de milho sugerem a co-inoculação rizóbios (Vp16 e Lc348) e *A. brasilense* em conjunto com AH em plantas de milho é maior na promoção de crescimento de plantas de milho cultivadas com redução em 50% de N, do que quando se faz a inoculação ou co-inoculação das RPCP, a adição de SH de forma isolada no cultivo em casa de vegetação, assim como também com adição da dose 100N.

Efeitos da aplicação de SH em conjunto com rizóbios inoculados ou co-inoculados com *A. brasilense* em plantas de aveia preta em casa de vegetação

Os resultados obtidos na avaliação da promoção de crescimento de plantas de aveia preta em resposta à inoculação e co-inoculação de rizóbios (SEMIA 587 e SEMIA 5080) com *A. brasilense* em aplicação conjunta de substâncias húmicas (AH e AF) e cultivadas com 50% da dose de nitrogênio mineral (N), comparado com os controles não inoculados que receberam uma dose de 100%N e 50%N com e sem SH, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Produção de Massa seca da parte aérea (MSPA), Massa seca da raiz (MSR) e Nitrogênio acumulado na parte aérea (Nac) em plantas de aveia preta pela inoculação ou co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* em conjunto com substâncias húmicas.

Tratamentos	MSPA	MSR	Nac
	----- g -----		----- mg-----
Controle N100	2,33 f	1,24 f	49,43 h
N100 + AH	2,89 cd	1,53 e	72,61 de
N100 + AF	2,71 e	1,55 de	66,28 fg
N50 + SEMIA 587	2,29 f	1,32 f	48,64 h
N50 + SEMIA 5080	2,38 f	1,22 f	52,76 h
N50 + SEMIA 587 + Az	2,80 de	1,64 cde	63,91 g
N50 + SEMIA 5080 + Az	2,99 c	1,71 bc	69,49 df
N50 + SEMIA 587 + AH	3,04 c	1,65 cd	78,05 c
N50 + SEMIA 5080 + AH	2,95 cd	1,63 cde	74,59 cd
N50 + SEMIA 587 + AF	2,91 cd	1,68 c	73,57 cde
N50 + SEMIA 5080 + AF	2,91 cd	1,62 cde	72,30 de
N50 + SEMIA 587 + Az + AH	4,03 a	1,84 a	114,45 a
N50 + SEMIA 5080 + Az + AH	4,10 a	1,90 a	115,41 a
N50 + SEMIA 587 + Az + AF	3,44 b	1,82 ab	92,56 b
N50 + SEMIA 5080 + Az + AF	3,46 b	1,88 a	94,60 b
N50 + AH	1,51 g	0,51 g	24,50 i
N50 + AF	1,42 g	0,50 g	22,18 i
Controle N50	1,23 h	0,41 g	14,60 j

*Letras iguais não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) segundo o teste de Tukey ($n=5$).

Observou-se que em plantas de aveia preta cultivadas com 5% da dose recomendada de N, a co-inoculação com rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com AH induziu o maior aumento da massa seca da parte

aérea (MSPA) das plantas, seguido da co-inoculação com rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com AF e adubação de N50, a co-inoculação de rizóbios *A. brasilense* sem SH, e a inoculação de rizóbios com SH, quando comparada com a inoculação isolada dos rizóbios, os tratamentos com adição N100 com SH (AH e AF) e os tratamentos controle N100 e controle N50. Esses resultados comprovam o potencial que tem a integração dos efeitos da co-inoculação com rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta de SH em plantas de aveia preta.

Resultados dos efeitos benéficos de aumento da massa seca da parte aérea de plantas de aveia preta tem sido observado na aplicação das SH (AH e AF) isoladamente, como também da inoculação ou co-inoculação de RPCP no desenvolvimento na MSPA em plantas de aveia preta. Foram observadas, em estudo de diferentes tipos de SH extraídas de diferentes carvões e aplicadas em diferentes concentrações comprovou-se que as SH exerceram maior aumento até 170% na produção de massa seca em plantas de aveia preta quando a dose aplicada foi de 30 mg.L⁻¹ de SH, em comparação com o tratamento controle (SILVA *et al.*, 2000b). Também tem sido relatado que os efeitos das SH dependem da fonte, do tipo e suas características (VAUGHAN e MALCOLM, 1985; RODDA *et al.*, 2006; ZANDONADI *et al.*, 2014), o que permite explicar que as diferenças em relação ao tipo e concentração das SH comerciais utilizada neste experimento refletem nos resultados dos efeitos nas plantas de aveia preta, sendo maior os efeitos dos AH do que os AF em co-inoculação rizóbios e *A. brasilense* (Tabela 4).

No caso das RPCP, a estirpe SEMIA 587 (*Bradyrhizobium elkanii*) simbiote de soja foi reportada sua capacidade de aumentar a MSPA de plantas de aveia preta em casa de vegetação. Já a estirpe SEMIA 5080 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*) influenciou a produção da MSPA nas plantas de aveia preta semelhante ao tratamento controle N100 (CASTILHO, 2019). No caso de *A. brasilense* é conhecido como promotor de crescimento vegetal em gramíneas incluindo a aveia preta, influenciando aumento da MSPA pela sua capacidade de fixar nitrogênio e de produzir fitohormônios (BALDANI e BALDANI, 2005; PERRIG *et al.*, 2007).

Em relação a massa seca da raiz (MSR) nas plantas de aveia preta observou-se que a co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* em aplicação

conjunta com SH (AH e AF), a co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* sem SH, a inoculação de rizóbios com aplicação de SH, e a adição de 100%N e SH induziram o aumento da MSR, em comparação inoculação dos rizóbios ou aplicação de uma dose de 100N isoladamente. Esses resultados sugerem o uso potencial que tem a aplicação conjunta das SH (AH e AF) em co-inoculação com rizóbios (SEMIA 587 e SEMIA 5080) e *A. brasilense*. Resultados de aplicação isolada de diferentes fontes e doses de SH em plantas de aveia preta comprovaram que há maior desenvolvimento das raízes em presença das SH sugerindo uma dose de 30 mg.L⁻¹ (SILVA *et al.*, 2000b).

Observou-se que o acúmulo de N nas plantas na aveia preta foi maior quando as plantas foram co-inoculadas com rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com AH que quando se faz com AF, o que poderia ser atribuída à bioatividade das SH que está relacionada às suas características como tipo e composição (VAUGHAN e MALCOLM, 1985; RODDA *et al.*, 2006; ZANDONADI *et al.*, 2014), o que diferenciado nas SH (AH e AF) empregadas neste experimento. Em seguida, os maiores aumentos no acúmulo de N foram evidenciados nas plantas de aveia preta co-inoculadas com rizóbios e *A. brasilense* sem SH, logo nas plantas inoculadas com rizóbios com SH, e as que foram tratadas com N100 em presença de SH, quando comparados com as plantas inoculadas com rizóbios e as tratadas com N100 isoladamente. Resultados sobre o efeito que tem diferentes tipos de SH extraídas de diferentes carvões, em uma dose de 30mg.L⁻¹ têm sido relatados que aumentaram o acúmulo de N nas plantas de aveia preta (SILVA *et al.*, 2000b). Enquanto os efeitos pela inoculação de rizóbios tem sido relatado que não aumentam o acúmulo de N em plantas de aveia preta comparado com o controle 50N (CASTILHO, 2019) diferindo dos resultados obtidos neste experimento, provavelmente pelas condições do cultivo, a forma de inoculação e semeadura da semente, evidenciando-se que as plantas inoculadas com rizóbios isoladamente obtiveram um acúmulo de N nas plantas, sendo maior em presença das SH e semelhante ao obtido pelas plantas adubadas com uma dose 100 de N (Tabela 4).

Em plantas de aveia preta, a eficiência relativa da inoculação ou co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* em conjunto com substâncias húmicas (AH e AF) na produção de massa seca (Figura 2) observou-se que os maiores

índices foram obtidos com a co-inoculação rizóbios e *A. brasilense* em conjunto com AH, seguido da co-inoculação rizóbios e *A. brasilense* em conjunto com AF.

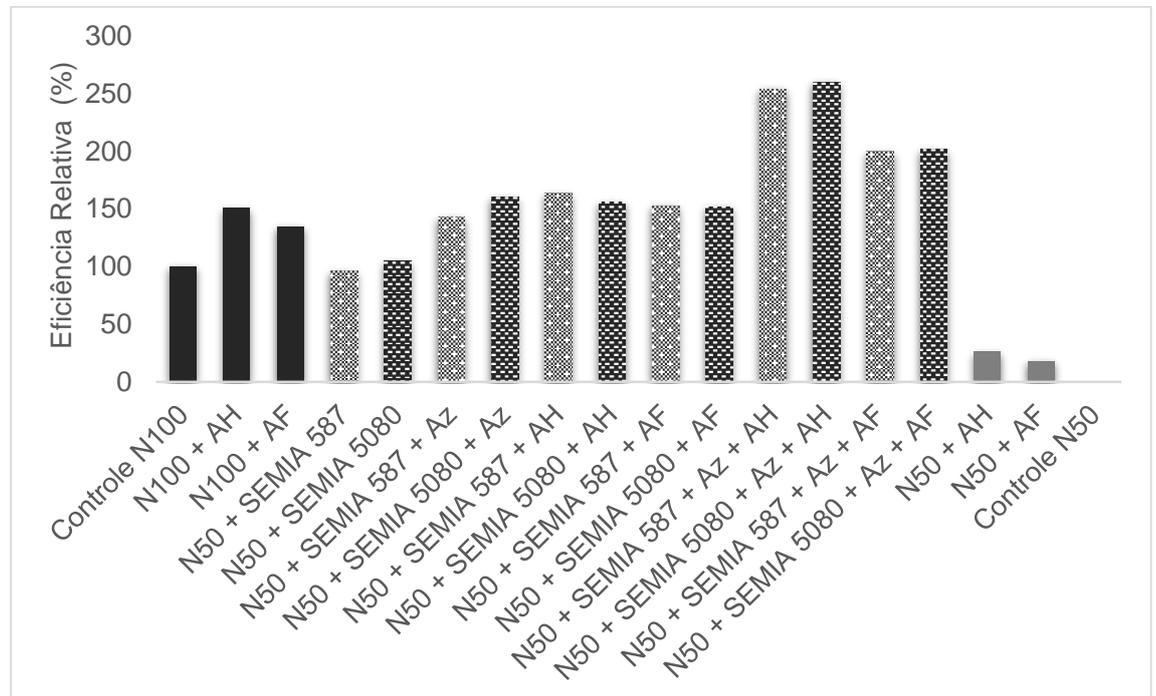


Figura 2. Eficiência relativa da inoculação ou co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* em conjunto com substâncias húmicas na produção de massa seca em plantas de aveia preta.

Esses resultados também mostram os benefícios da co-inoculação de rizóbios simbiotes de soja (SEMIA 587 e SEMIA 580) e *A. brasilense* em conjunto com substâncias húmicas (AH e AF) na produção de massa seca de plantas cultivadas com 50% da dose de N, o que pode ser importante em sistema de sucessão do cultivo da soja com aveia preta.

5. Conclusões

A promoção de crescimento de plantas de milho cultivadas com 50% da dose de nitrogênio é maior quando as plantas são co-inoculadas com rizóbios (Vp16 ou Lc348) e *A. brasilense* em conjunto com substâncias húmicas (ácidos húmicos e ácidos fúlvicos), refletindo-se no aumento da massa seca da parte aérea, a massa seca da raiz, o acúmulo de N e eficiência relativa nas plantas.

A co-inoculação das plantas de milho com rizóbios e *A. brasilense*, assim como a inoculação de rizóbios em presença das substâncias húmicas

(ácidos húmicos e ácidos fúlvicos) aumenta o crescimento de plantas de milho cultivadas com 50% da dose de N.

O aumento da promoção de crescimento de plantas de aveia preta cultivadas com 50% da dose de nitrogênio é maior quando as plantas são co-inoculadas com rizóbios SEMIA 587 ou SEMIA 5080 simbiotes da soja, e *A. brasilense* em aplicação conjunta com substâncias húmicas (ácidos húmicos e ácidos fúlvicos), evidenciado na massa seca da parte aérea, a massa seca da raiz, o acúmulo de N e eficiência relativa nas plantas.

A co-inoculação dos rizóbios SEMIA 587 ou SEMIA 5080 e *A. brasilense* estimula o aumento do crescimento das plantas de aveia preta, semelhante à inoculação de rizóbios em presença de ácidos húmicos e ácidos fúlvicos.

Os aumentos observados em milho e aveia preta pela co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* em conjunto com substâncias húmicas indicam uma estratégia promissora para futuros estudos do crescimento de plantas de milho e aveia preta em condições de campo.

CAPITULO IX – Conclusões gerais

A co-inoculação de rizóbios e *Azospirillum brasilense* em conjunto com substâncias húmicas promovem maior crescimento das leguminosas feijão-fava e leucena e das gramíneas milho e aveia preta.

Em plantas de feijão-fava, a co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com substâncias húmicas (ácidos húmicos e ácidos fúlvicos) exercem maior promoção de crescimento das plantas, proporcionando o aumento da massa seca, a massa seca da raiz, o nitrogênio acumulado na parte aérea e na eficiência relativa da fixação biológica de nitrogênio das plantas. Destaca-se a inoculação do isolado de rizóbio Plu14 e aplicação de AH.

A promoção de crescimento de plantas de leucena é maior quando as plantas são co-inoculadas com rizóbios e *A. brasilense* em aplicação conjunta com SH (AH e AF) favorecendo os aumentos da massa seca, a massa seca da raiz, o nitrogênio acumulado na parte aérea e na eficiência relativa da fixação biológica de nitrogênio.

Nas leguminosas, feijão fava e leucena a aplicação conjunta de SH e rizóbios em co-inoculação com *A. brasilense* exercem maior aumento da massa seca dos nódulos secos em feijão-fava e maior número de nódulos em leucena.

Em plantas de feijão-fava como leucena a co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* assim como a inoculação de rizóbios com SH aumentam o crescimento das plantas.

A promoção de crescimento de plantas de milho cultivadas com 50% da dose de nitrogênio é maior quando as plantas são co-inoculadas com rizóbios (Vp16 ou Lc348) e *A. brasilense* em conjunto com substâncias húmicas (ácidos húmicos e ácidos fúlvicos), proporcionando maior aumento da massa seca da parte aérea, a massa seca da raiz, o acúmulo de N e eficiência relativa nas plantas.

O aumento da promoção de crescimento de plantas de aveia preta cultivadas com 50% da dose de nitrogênio é maior quando as plantas são co-inoculadas com rizóbios (SEMIA 587 ou SEMIA 5080) simbiotes da soja, e *A. brasilense* em aplicação conjunta com substâncias húmicas (ácidos húmicos e ácidos fúlvicos), evidenciado na massa seca da parte aérea, a massa seca da raiz, o acúmulo de N e eficiência relativa nas plantas.

Em plantas de milho, a co-inoculação das plantas com rizóbios (Vp16 ou Lc348) e *A. brasilense*, assim como a inoculação de rizóbios em presença das substâncias húmicas aumenta o crescimento das plantas cultivadas com 50% da dose de nitrogênio.

A co-inoculação dos rizóbios (SEMIA 587 ou SEMIA 5080) e *A. brasilense* estimula o aumento do crescimento das plantas de aveia preta, semelhante à inoculação de rizóbios em presença de ácidos húmicos e ácidos fúlvicos.

Os aumentos observados nas leguminosas feijão-fava e leucena como nas leguminosas milho e aveia preta por co-inoculação de rizóbios e *A. brasilense* em conjunto com substâncias húmicas indicam que poderia ser uma estratégia promissora para futuros estudos em solos em casa de vegetação e no campo.

Os rizóbios obtidos de solos do estado Rio Grande do Sul isolados Plu03 e Plu14 são eficientes na fixação biológica de nitrogênio em plantas de feijão-fava.

Os rizóbios isolados no estado do Rio Grande do Sul Leu01 e Leu02 são simbiotes de plantas de leucaena, com capacidade de formar nódulos y eficientemente.

Referências Bibliográficas

- ADANI, F. *et al.* The effect of commercial humic acid on tomato plant growth and mineral nutrition. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 21, p. 561-575, 1998.
- ADESMOYE, A. O.; KLOEPPER, J. W. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer use efficiency. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 85, n. 1, p. 1-12, 2009.
- AGUIRRE, E. *et al.* The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Bari, v. 47, n. 3, p. 215-223, 2009.
- AGUIRRE-MEDINA, J. F. *et al.* Crecimiento de *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit inoculada con hongo micorrízico y bacteria fijadora de nitrógeno en vivero. **Quehacer Científico en Chiapas**, Chiapas, v. 10, n. 1, p. 15-22, 2015.
- AHMAD, M. *et al.* The combined application of rhizobial strains and plant growth promoting rhizobacteria improves growth and productivity of mung bean (*Vigna radiata* L.) under saltstressed conditions. **Annals of Microbiology**, Milano, v. 62, p.1321–1330, 2012.
- AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS E SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 26, p. 241-248, 2002.
- AMARAL FILHO, J. P. R. *et al.* Espaçamento, densidade populacional e adubação nitrogenada na cultura do milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 29, p. 467-473, 2005.
- ANTOUN, H. *et al.* Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growthpromoting rhizobacteria on non-legumes: effects on radishes (*Raphanus sativus*L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 204, p. 57-67, 1998.
- ANTUNES, J. E. L. **Diversidade genética e eficiência simbiótica de isolados de rizóbios nativos em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.)**. 2010. 108 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010.
- ANTUNES, J. E. L. *et al.* Eficiência simbiótica de isolados de rizóbio noduladores de feijão-fava (*Phaseolus luntaus* L.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 35, p. 751-757, 2011.
- ALMEIDA, A. P. M. *et al.* Avaliação do efeito tóxico de *Leucaena leucocephala* (Leg. *Mimosoideae*) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 3, p. 190-194, 2006.

- ARAUJO, A. S. F. *et al.* Diversity of native rhizobia-nodulating *Phaseolus lunatus* in Brazil. **Legume Research**, Teresina, v. 38, n. 5, p. 653-657, 2015.
- ARAUJO, A. S. F. *et al.* Nodulation ability in different genotypes of *Phaseolus lunatus* by rhizobia from California agricultural soils. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 73, n.1, p. 7–14, 2016.
- ARANCON, N. Q. *et al.* Effects of humic acids derived from cattle, food and paper-waste vermicomposts on growth of greenhouse plants. **Pedobiologia**, Jena, v. 47, p. 741-744, 2003.
- ARGENTA, G. *et al.* Resposta de híbridos simples de milho à redução do espaçamento entre linhas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 1, p. 71-78, 2001.
- ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W. T. Jr. Microbial biosynthesis of ethylene and its influence on plant growth. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v. 12, p. 69-111, 1992.
- ATIYEH, R. M. *et al.* The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. **Bioresource Technology**, Barking, v. 84, p. 7-14, 2002.
- AYDIN, A.; KANT, C.; TURAN, M. Humic acid application alleviates salinity stress of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants decreasing membrane leakage. **African Journal of Agricultural Research**, Victoria Island, v. 7, n. 7, p. 1073–1086, 2012.
- BALA, A.; GILLER, K. E. Symbiotic specificity of tropical tree rhizobia for host legumes. **New Phytologist**, Cambridge, v. 149, n. 3, p. 495-507, 2001.
- BALA, A. *et al.* Nodulation of tree legumes and the ecology of their native rhizobial populations in tropical soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 211-223, 2003.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 77, p. 549-579, 2005.
- BALDANI, J. I. *et al.* Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 29, n. 5/6, p. 911-922, 1997.
- BALDOTTO, M. A. *et al.* Frações da matéria orgânica e propriedades redox de substâncias húmicas em sedimentos de oceanos profundos. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 9, p. 1288-1295, 2013.
- BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B. Ácidos húmicos. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 61, p. 856–881, 2014. Suplemento.

BALDOTTO, M. A. *et al.* Propriedades redox e grupos funcionais de ácidos húmicos isolados de adubos orgânicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 3, p. 465-475, 2007.

BALDOTTO, L. E. B. *et al.* Desempenho do abacaxizeiro vitória em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante a aclimação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 33, p. 979-990, 2009.

BALDOTTO, M. A. *et al.* Root growth of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. treated with humic acids isolated from typical soils of Rio de Janeiro state, Brazil. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 58, p. 504-511, 2011.

BÁRBARO, I. M. *et al.* Técnica alternativa: co-inoculação de soja com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* visando incremento de produtividade. 2008. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/20084/coinoculacao/index.htm>. Acesso em: 15 maio 2019.

BARRETO, M. D. J. *et al.* Utilização da leucena (*Leucaena leucocephala*) na alimentação ruminantes. **Revista Verde**, Mossoró, v. 5, n. 1, p. 7-16, 2010.

BARROS, L. *et al.* Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 58, p. 3681–3688, 2010.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. **Advances in Agronomy**, San Diego, v.108, p. 77–136, 2010.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relations physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, p. 521-577, 2004.

BAUDOIN, J. P. *et al.* **Ecogeography, demography, diversity and conservation of *Phaseolus lunatus* L in the Central Valley of Costa Rica**. Rome: Plant Genetic Resources Institute, 2004. (Systematic and ecogeographic studies on crop gene pools, 12).

BÉCQUER, C. J. *et al.* Selection of rhizobium strains, inoculated in corn (*Zea mays*, L.), in field conditions in cattle ecosystems of Sancti Spiritus, Cuba. **Cuban Journal of Agricultural Science**, La Habana, v. 45, n. 4, p. 445-449, 2011.

BERNARDES, J. M.; REIS, J. M. R.; RODRIGUES, J. F. Efeito da aplicação de substância húmica em mudas de tomateiro. **Global Science and Technology**, Rio Verde, v. 4, n. 3, p. 92 – 99, 2011.

BISWAS, J. C. *et al.* Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v. 92, p. 880–886, 2000.

BOHRER, T. R. J.; HUNGRIA, M. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica do nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 33, p. 937-952, 1998.

BOTTOMLEY, W. B. Some accessory factors in plant growth and nutrition. **Proceedings of the Royal Society of London (Biology)**, London, v. 88, p. 237–247, 1914a.

BOTTOMLEY, W. B. The significance of certain food substances for plant growth. **Annals of Botany**, London, v. 28, p. 531–540, 1914b.

BOTTOMLEY, W. B. Some effects of organic growth-promotion substances (auximones) on the growth of *Lemma minor* in mineral cultural solutions. **Proceedings of the Royal Society of London (Biology)**, London, v. 89, p. 481–505, 1917.

BOTTOMLEY, W. B. The effect of organic matter on the growth of various plants in culture solutions. **Annals of Botany**, London, v. 34, p. 353–365, 1920.

BROCKWELL, J.; HELY, F. W.; NEAL-SMITH, C. A. Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of *Lotus hispidus*. **Australian Journal of Experimental Agricultural and Animal Husbandry**, Melbourne, v. 6, n. 23, p. 365-370, 1966.

BUCK, J. D.; CLEVERDON, R. C. The spread plate as a method for the enumeration of marine bacteria. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 5, p. 78-80, 1960.

BUENO-LÓPEZ, L.; CAMARGO, J. C.G. Nitrógeno edáfico y nodulación de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit en sistemas silvopastoriles. **Acta Agronómica**, Palmira, v. 64, n. 4, p. 349-354, 2015.

BURDMAN, S.; KIGEL, J.; OKON, Y. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 29, p. 923–929, 1997.

CACCO, G.; DELL'AGNOLA, G. Plant growth regulator activity of soluble humic complex. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 62, p. 306–310, 1984.

CÂMARA, G. M. S. **Fixação biológica de nitrogênio em soja**. Piracicaba: IPNI, 2014. 9 p. (Informações Agronômicas, 147).

CANCELLIER, L. L. *et al.* Eficiência no uso de nitrogênio e correlação fenotípica em populações tropicais de milho no Tocantins. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 1, p. 139-148, 2011.

CANELLAS, L. P. *et al.* Avaliação de características de ácidos húmicos de resíduos de origem urbana: I. Métodos espectroscópicos (UV-Vis, IV, RMN ¹³C-CP/MAS) e microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 24, p. 741-750, 2000.

CANELLAS, L. P. *et al.* Distribuição da matéria orgânica e características de ácidos húmicos em solos com adição de resíduos de origem urbana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 12, p. 1529-1538, dez. 2001.

CANELLAS, L. P. *et al.* Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane h⁺-atpase activity in maize roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, n. 4, p.1951-1957, 2002.

CANELLAS, L. P.; FAÇANHA, A. R. Relationship between natures of soil humic fractions and their bioactivity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, p. 233-240, 2004.

CANELLAS, L. P. *et al.* Bioactivity and chemical characteristics of humic acids from tropical soils sequence. **Soil Science**, Philadelphia. v. 173, p. 624–637, 2008.

CANELLAS, L. P. *et al.* Probing the hormonal activity of fractionated molecular humic components in tomato auxin mutants. **Annals of Applied Biology**, Newport, v. 159, n. 2, p. 202-211, 2011.

CANELLAS, L. P. *et al.* Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. **European Journal of Soil Science**, Exeter, v. 63, p. 315–324, 2012.

CANELLAS, L. P. *et al.* A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 366, p.119–132, 2013.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, Heidelberg, v.1, p. 1–11, 2014.

CANELLAS, L. P. *et al.* Foliar application of *Herbaspirillum seropedicae* and humic acid increase maize yields. **Journal of Food Agriculture and Environment**, Helsinki, v. 13, p. 146-153, 2015.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES F. L. Production of border cells and colonization of maize root tips by *Herbaspirillum seropedicae* are modulated by humic acid. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 417, p. 403–413, 2017.

CANELLAS, L. P. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 196, p. 15-27, 2015.

CALEGARI, A. *et al.* Adubação verde no sul do Brasil. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1992. 346 p.

CASSÁN, F.; DÍAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: from the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 103, p.117–130, 2016.

CHAMINADE, R.; BOUCHER, I. Recherches sur la présence de substances rhizogènes dans certains milieux naturels. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Académie d' Agriculture de France**, Paris, n. 26, p. 66, 1940.

CHASSAPIS, K.; ROULIA, M. Evaluation of low-rank coals as raw material for Fe and Ca organomineral fertilizer using a new EDXRF method. **International Journal of Coal Geology**, Beijing, v. 75, n. 3, p. 185–188, 2008.

CHEN, Y.; AVIAD, T. Effects of humic substances on plant growth. *In*: MACCARTHY, P. *et al.* (ed.). **Humic substances in soils and crop science: selected readings**. Madison: Soil Science Society of America, 1990. cap. 7, p. 161-186.

CHEN, J. *et al.* The roles of natural organic matter in chemical and microbial reduction of ferric iron. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 307, n. 1/3, p. 167-178, 2003

CHEN, Y. *et al.* Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: the role organo-iron complexes. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 50, n. 7, p.1089-1095, 2004.

CHI, F. *et al.* Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 71, n. 11, p. 7271–7278, 2005.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Safra 2019/2020: nono levantamento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**, Brasília, DF, v. 7, n. 9, p. 1-69, jun. 2020.

CONCEIÇÃO, P. M. *et al.* Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, p. 545-548, 2008.

CONRAD, K. A. *et al.* Soil nitrogen status and turnover in subtropical leucaena-grass pastures as quantified by $\delta^{15}\text{N}$ natural abundance. **Geoderma**, Amsterdam, v. 313, p. 126–134, 2018.

CORREA, O. S. *et al.* *Azospirillum brasilense*-plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. *In*: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (ed.). ***Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. [Buenos Aires, Argentina]: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 87-95.

COSGROVE, D. J. Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 7, p. 1031–1041, 1997.

COSTA, J. N. M. N.; DURIGAN, G. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Fabaceae): invasora ou ruderal? **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 34, n. 5, p. 825-833, 2010.

COSTA NETO, V. P. C. *et al.* Symbiotic performance, nitrogen flux and growth of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) varieties inoculated with different indigenous strains of rhizobia. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 73, n. 2, p. 117–124, 2017.

COSTA NETO, V. P. C. **Nodulação e fixação biológica de nitrogênio em feijão-fava inoculado com rizóbios isolados de solos da microrregião do Médio Parnaíba Piauiense**. 2016. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

CUBILLOS-HINOJOSA, J. G.; VALERO, N. O.; MELGAREJO, L. M. Assessment of a low rank coal inoculated with coal solubilizing bacteria as an organic amendment for a saline-sodic soil. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, Heidelberg, v. 2, [art.] 21, 2015.

CUBILLOS-HINOJOSA, J. G. *et al.* Biological fixation of nitrogen by native isolates of *Rhizobium* sp. symbionts of *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit. **Acta Agronômica**, Palmira, v. 68, n. 2, p. 75–83, 2019.

DARTORA, J. *et al.* Co-inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* in maize. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 20, n. 6, p. 545-550, 2016.

DEKHILL, S. B.; CAHILL, M.; STACKBRANDT, E. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *Parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 20, p. 72-77, 1997.

DELL'AGNOLA, G.; NARDI, S. Hormone-like effect of enhanced nitrate uptake induced by depolycondensed humic fractions obtained from *Allolobophora rosea* and *A. caliginosa* faeces. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 4, p. 115–118, 1987.

DIAS, P. F.; SOUTO, S. M. Mudanças de leguminosas arbóreas introduzidas sem proteção em pastagem na presença do gado. **Agronomia**, Seropédica, v. 39, n. 1/2, p. 34-41, 2005.

DICK, D. P. *et al.* Química da matéria orgânica do solo. *In*: MELO, V. F. **Química e mineralogia do solo**. Parte II. Aplicações. Viçosa, MG: SBCS, 2009. cap. 1, p. 1-68.

DIOUF, A. *et al.* Response of *Gliricidia sepium* tree to phosphorus application and inoculations with *Glomus aggregatum* and rhizobial strains in a sub-Saharan sandy soil. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 7, n. 6, p. 766-771, 2008.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 22, p.107-149, 2003.

DÖBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. **Nature**, London, v. 210, p. 850-852, 1966.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 196, p. 3–14, 2015.

DUARTE, C. B. V. **Caracterização de genótipos de feijão-lima (*Phaseolus lunatus* L.) na região de pelotas – Rio Grande do Sul**. 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

DURÁN, D. *et al.* *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 64, p. 2072-2078, 2014.

ECKERT, B. *et al.* *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 17-26, 2001.

EKIN, Z. Integrated use of humic acid and plant growth promoting rhizobacteria to ensure higher potato productivity in sustainable agriculture. **Sustainability**, Basel, v. 11, n. 12, p. 3417, 2019.

EL-GHAMRY, A. M.; EL-HAI, K. M.; GHONEEM, K. M. Amino and humic acids promote growth, yield and disease resistance of faba bean cultivated in clayey soil. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, Faisalabad, v. 3, n. 2, p. 731–739, 2009.

EL KADER, D. A. *et al.* Datos analíticos de la goma de la semilla de *Leucaena leucocephala*. **Revista de la Facultad de Agronomía de La Universidad del Zulia**, Maracaibo, v. 25, n. 1, p. 95-118, 2008.

ERUM, E.; BANO, A. Variation in phytohormone production in *Rhizobium* strains at different altitudes of north areas of Pakistan. **International Journal of Agriculture and Biology**, Faisalabad, v. 10, p. 536-540, 2008.

ESCALANTE, E. E. Use and performance of *leucaena* (*Leucaena leucocephala*) in Venezuelan animal production systems. **Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales**, Cali, v. 7, n. 4, p. 407–409, 2019.

FAÇANHA, A. R. *et al.* Bioatividade de ácidos húmicos: efeito sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 9, p. 1301-1310, 2002.

FARIA, S. M.; FRANCO, A. A. **Identificação de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies leguminosas arbóreas.** Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 2002. 16 p. (Documentos, 158).

FERRARA, G.; BRUNETTI, G. Influence of foliar applications of humic acids on yield and fruit quality of Table grape cv. Itália. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, Talence, v. 42, p. 79-87, 2008.

FERREIRA, A. N. *et al.* Estirpes de *Rhizobium tropici* na inoculação do feijoeiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 507-512, 2000.

FOFANA, B. *et al.* Genetic diversity in lima (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 95, p. 157-165, 1997.

FONTANELLI, R. S.; PIOVEZAN, A. J. Efeitos de cortes no rendimento de forragem e grãos de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, n. 5, p. 691-697, 1991.

FRANCO, M. C. *et al.* Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, p. 1145-1150, 2002.

FRIAS, I. *et al.* A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: characterization and induction the maize plasma membrane H⁺-ATPase: characterization and induction auxin in coleoptiles. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p.1533-1544, 1996.

GARCIA, A. C. *et al.* Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. **Ecological Engineering**, Praha, v. 47, p. 203-208, 2012.

GARCIA, A. C. *et al.* Potentialities of vermicompost humic acids to alleviate water stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 136, p. 48-54, 2014.

GARCIA-MINA, J. M. Technical and commercial questions associated with the use of humic substances in European Mediterranean countries. *In*: ENCONTRO BRASILEIRO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 6., 2005, Rio de Janeiro. **Anais** [...]. Rio de Janeiro: Embrapa-CNPS, UFRRJ, UENF, PUC, 2005. p. 24-27.

GIANNOULI, A. *et al.* Evaluation of greek low-rank coals as potential raw material for the production of soil amendments and organic fertilizers. **International Journal of Coal Geology**, Beijing v. 477, n. 3/4, p. 383-393, 2009.

GILLER, K. E.; WILSON, K. J. **Nitrogen fixation in tropical cropping systems**. Wallingford: CAB, 1993. 313 p.

GONZÁLEZ, J.; MARKETON, M. M. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 67, p. 574 – 592, 2003.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, p. 872-877, 2003.

GUERRA, J. G. M. *et al.* Macromoléculas e substâncias húmicas. *In*: SANTOS, G. A. **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. 2. ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008. p. 27.

GUTIERREZ-ZAMORA, M. L.; ROMERO, E. M. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 117-126, 2001.

HAGER, A. Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 116, p. 483–505, 2003.

HAHN, L. **Promoção de crescimento de plantas gramíneas e leguminosas inoculadas com rizóbio e bactérias associativas**. 2013. 171 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

HAHN, L. *et al.* Growth promotion in maize with diazotrophic bacteria in succession with ryegrass and white clover. **American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science**, Faisalabad, v. 14, n. 1, p. 11-16, 2014.

HALVORSON, A. D.; PETERSON, G. A.; REULE, C. A. Tillage system and crop rotation effects on dry land crop yields and soil carbon in the Central Great Plains. **Agronomy Journal**, Madison, v. 94, p. 1429-1436, 2002.

HERNANDEZ, J.; MILIAN, P. **Aislamiento y evaluación de cepas nativas de *Rhizobium sp* específicos para Matarratón (*Gliricidia sepium*) y *Leucaena* (*Leucaena leucocephala*) en el Centro Biotecnológico del Caribe**. 2010. 137 f. Trabajo de Grado (Programa de Microbiología) - Universidad Popular del Cesar, Valledupar, 2010.

HERNÁNDEZ, J. L.; CUBILLOS-HINOJOSA, J. G.; MILIAN, P. E. Aislamiento de cepas de *Rhizobium sp.*, asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. **Revista Colombiana de Microbiología Tropical**, Valledupar, v. 2, p. 51–62, 2012.

HILLITZER, A. Über den einfluss der humusstoffe auf das wurzelwachstum. **Beihefte zum Botanischen Centralblatt**, Cassel, v. 49, p. 467–480, 1932.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method of growing plants without soil**. Berkeley: University of California, 1950. 32 p.

HUNGRIA, M.; BOHRER T. R. J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 31, p. 45-52, 2000.

HUNGRIA, M. *et al.* Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 32, p. 1515–1528, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 39, p. 51–61, 2003.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: EMBRAPA Soja, 2011. 37 p. (EMBRAPA Soja. Documentos, 325).

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 49, p. 791-801, 2013.

INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E. W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, n. 10, p. 1078-1085, 2004.

JETANA, T. Potential benefits from the utilization of *Leucaena leucocephala* in thai swamp buffaloes production. *In*: INTERNATIONAL SEMINAR ON LIVESTOCK PRODUCTION AND VETERINARY TECHNOLOGY, 2016, Bali. **Proceedings** [...]. Pasarminggu, Jakarta : IAARD Press, 2016. p. 90-103.

JINDO, K. *et al.* Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 353, p. 209-220, 2012.

KAZEMI, M. Effect of foliar application of humic acid and potassium nitrate on cucumber growth. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, Agra, v. 2, n. 11, p. 3-6, 2013.

KAMINSKI, P. E.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; PAIM, N. R. Growth and survival of a range of *Leucaena* species in southern Brazil. **Tropical Grasslands**, Cali, v. 39, p. 1-8, 2005.

KANG, X. *et al.* Inoculation of *Sinorhizobium saheli* YH1 leads to reduced metal uptake for *Leucaena leucocephala* grown in mine tailings and metal-polluted soils. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, [art.] 1853, 2018.

KANT, R.; BISHIST, R.; KUMAR, M. Effect of supplementation of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Leucaena) leaves on growth profile of crossbred calves. **International Journal of Livestock Research**, Rishikesh, v. 9, n. 5, p. 154-159, 2019.

KHAMMAS, K. M. *et al.* *Azospirillum irakense* sp. nov. a nitrogenfixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 140, p. 679-693, 1989.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *In*: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 4., 1978, Angers. **Proceedings of the [...]**. Angers: INRA, 1978. v. 2, p. 879-882.

KONONOVA, M. Bioquímica del proceso de formación del humus. *In*: KONONOVA, M. M.; MUNTAN, E. B. **La materia orgánica del suelo: su naturaleza, propiedades y métodos de investigación**. Vilassar de Mar: Oikos-Tau, 1982. p. 63-109.

KUMAR, R.; CHANDRA, R. Influence of PGPR and PSB on *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain competition and symbiotic performance in lentil. **World Journal of Agricultural Sciences**, Faisalabad, v. 4, n. 3, p. 297–301, 2008.

LACERDA, A. M. *et al.* Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 51, p. 67-82, 2004.

LANA, M. C. *et al.* Arranjo espacial e adubação nitrogenada em cobertura na cultura do milho. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 3, p. 433-438, 2009.

LANGE, A.; MOREIRA, F. M. S. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de *Orchidaceae* e de outras famílias vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 26, p. 529-533, 2002.

LAVRINENKO, K. *et al.* *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 60, n. 12, p. 2832-2837, 2010.

LIN, S. Y. *et al.* *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, p. 761-765, 2009.

LÓPEZ-LÓPEZ A. *et al.* Native bradyrhizobia from los Tuxtlas in Mexico are symbionts of *Phaseolus lunatus* (lima bean). **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 36, n. 1, p. 33–38, 2013.

LOPES, M. L. T. *et al.* Sistema de integração lavoura-pecuária: efeito do manejo da altura em pastagem de aveia preta e azevém anual sobre o rendimento da cultura da soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1499-1506, 2009.

LUCAS, Y. The role of plants in controlling rates and products of weathering: importance of biological pumping. **Annual Review Earth and Planetary Sciences**, Palo Alto, v. 29, p. 135–163, 2001.

LÜDTKE, A. C. **Matéria orgânica do solo e produção de alface e cebolinha em Argissolo vermelho com adição de fertilizantes alternativos**. 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

MACHADO, R. G. **Promoção de crescimento em gramíneas forrageiras por rizóbios isolados de *Lotus corniculatus***. 2011. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MACHADO, R. G. **Seleção de bactérias promotoras de crescimento para plantas forrageiras**. 2015. 123 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

MACHADO, R. G. *et al.* Rhizobia isolation and selection for serradella (*Ornithopus micranthus*) in Southern Brazil. **African Journal of Agricultural Research**, Victoria Island, v. 10, p. 1894-1907, 2016.

MAHECHA, L. El silvopastoreo: una alternativa de producción que disminuye el impacto ambiental de la ganadería bovina. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 15, p. 226-231, 2002.

MAGALHÃES, F. M. M. A new acid- tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417-430, 1983.

MALIK K.; AZAM F. Effect of humic acid on wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling growth. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 25, p. 245-252, 1985.

MARINI, D. *et al.* Growth and yield of corn hybrids in response to association with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 62, n. 1, p. 117-123, 2015.

MARQUES JUNIOR, R. B. *et al.* Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 32, p. 1121-1128, 2008.

MARQUES JUNIOR, R. B. **Uso de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas na produção de milho e cana-de-açúcar**. 2010. 110f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2010.

MATSUMURA, E. E. *et al.* Composition and activity of endophytic bacterial communities in field-grown maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Annals of Microbiology**, Milano, v. 65, p. 21877-2200, 2015.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogenfixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 620–624, 2007a.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 2805–2809, 2007b.

MENEGHETTI A. M. **Manual de procedimentos de amostragem e análise química de plantas, solo e fertilizantes**. Curitiba: EDUTFPR, 2018. 251 p.

MELO, A. P. *et al.* Mixed rhizobia and *Herbaspirillum seropedicae* inoculations with humic acid-like substances improve water-stress recovery in common beans. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, Heidelberg, v. 4, [art.] 6, 2017.

MILES, A. A.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Epidemiology & Infection**, Cambridge, v. 38, n. 6, p. 732-749, 1938.

MIRANSARI, M.; SMITH, D.L. Rhizobial lipo-chitooligosaccharides and gibberellins enhance barley (*Hoedum vulgare* L.) seed germination. **Biotechnology**, Faisalabad, v. 8, p. 270–275, 2009.

MONTAÑEZ, A. *et al.* Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by 15N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 45, p. 253-263, 2009.

MOREIRA, F. M. S.; HAUKKA, K.; YOUNG, J. P. W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 7, p. 889-895, 1998.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Fixação biológica do nitrogênio. *In*: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006. p. 501-529.

MORSOMME, P.; BOUTRY, M. The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1465, p. 1-16, 2000.

MULDER, L. *et al.* Integration of signaling pathways in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 123, p. 207-218, 2005.

MÜLLER, T. M. *et al.* Combination of inoculation methods of *Azospirillum brasilense* with broadcasting of nitrogen fertilizer increases corn yield. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 2, p. 210-215, 2016.

MURGAS, E.; FALLA, A. **Influencia de ácidos húmicos y bacterias diazotróficas sobre la germinación de las semillas y crecimiento temprano de plantas forrajeras**. 2016. 81 f. Trabajo de Grado (Programa de Microbiología) - Universidad Popular del Cesar, Valledupar, 2016.

MURGUEITIO, E. *et al.* **Establecimiento y manejo de sistemas silvopastoriles intensivos con Leucaena**. Cali: CIPAV, 2016. 220 p.

MUSCOLO, A. *et al.* Effect of earthworm humic substances on esterase and peroxidase activity during growth of leaf explants of *Nicotiana plumbaginifolia*. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 15, p. 127–131, 1993.

MUSCOLO, A.; NARDI, S. Effetti di due frazioni umiche sul metabolismo azotato di cellule di *Daucus carota*. *In*: CONVEGNO NAZIONALE DELL' IHSS: LE RICERCHE DI BASE E LE APPLICAZIONI DELLE SOSTANZE UMICHE ALLE SOGLIE DEL 2000, 4., 1999, Alghero, Italy. [Anali...]. [Alghero]: IHSS, 1999. p. 103–106.

MUSCOLO, A. *et al.* The auxin-like activity of humic substances is related to membrane interactions in carrot cell cultures. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 33, p.115-129, 2007.

MUSCOLO, A.; SIDARI, M.; NARDI, S. Humic substance: relationship between structure and activity. Deeper information suggests univocal findings. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 129, p. 57–63, 2013.

NARDI, S.; ARNOLDI, G.; DELL'AGNOLA, G. Release of the hormone-like activities from *Allolobophora rosea* and *A. caliginosa* faeces. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 68, p. 563–567, 1988.

NARDI, S. *et al.* Nitrate uptake and ATPase activity in oat seedlings in the presence of two humic fractions. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 23, p. 833–836, 1991.

NARDI, S. *et al.* A low molecular weight humic fraction on nitrate uptake and protein synthesis in maize seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 32, p. 415–419, 2000.

NARDI, S. *et al.* Physiological effects of humic substances on higher plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 34, p. 1527-1536, 2002.

NARDI, S.; ERTANI, A.; ORNELLA, F. Soil root crosstalk: the role of humic substances. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 180, p. 5–13, 2017.

NARDI, S. *et al.* Chemical characteristics and biological activity of organic substances extracted from soils by root exudates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 69, p. 2012-2019, 2005.

NASCIMENTO, J. T.; SILVA, I. F. Avaliação quantitativa e qualitativa da fitomassa de leguminosas para uso como cobertura de solo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 3, p. 947-949, 2004.

NICODEMO, M. L. F. *et al.* **Desempenho, saúde e conforto animal em sistemas silvipastoris no Brasil**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2018. (Documentos, 129).

NOEL, T. C. *et al.* *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 279-283, 1996.

NUNES, F. S.; RAIMONDI, A. C.; NIEDWIESKI, A. C. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 872-879, 2003.

O'DONNELL, R. W. The auxin-like effects of humic preparations from leonardite. **Soil Science**, Philadelphia, v. 116, p. 106–112, 1973.

OHNO, T. *et al.* Molecular characterization of plasma membrane H⁺-ATPase in a carrot mutant cell line with enhanced citrate excretion. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, p. 265–274, 2004.

OKON, Y.; HEYTLER, P.; HARDY, W. N₂ fixation by *Azospirillum brasilense* and its incorporation into host *Setaria italica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 46, n. 3, p. 694-697, 1983.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, DC, v. 6, n. 7, p. 366-370, 1997.

OLIVARES, F. L. *et al.* Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, Heidelberg, v. 4, n. 1, [art.] 30, 2017.

ORMEÑO-ORRILLO, E. *et al.* Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, p. 253-262, 2006.

ORMEÑO-ORRILLO, E. *et al.* Draft genome sequence of *Bradyrhizobium paxllaeri* LMTR 21 T isolated from Lima bean (*Phaseolus lunatus*) in Peru. **Genomics Data**, New York, v. 13, p. 38–40, 2017.

ORMEÑO-ORRILLO, E. *et al.* *Phaseolus lunatus* is nodulated by a phosphate solubilizing strain of *Sinorhizobium meliloti* in a Peruvian soil. In: VELÁZQUEZ, E. I.; RODRÍGUEZ-BARRUECO, C. (ed.). **Developments in plant and soil sciences**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 243–247.

OSORIO FILHO, B. D. *et al.* Rhizobia enhance growth in rice plants under flooding conditions. **American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science**, Faisalabad, v. 14, n. 8, p. 707-718, 2014.

PEDRAZA, R. O.; BELLONE, C. H.; BELLONE, S.C. *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 45, n. 1, p. 36-43, 2009.

PEDRAZA, R. O. *et al.* Diferenciación de rizobios nativos que nodulan cuatro leguminosas forrajeras en Tucumán, Argentina. **Ciencia del Suelo**, Buenos Aires, v. 19, n. 1, p. 79-81, 2001.

PENG, G. *et al.* *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses Grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 1263–1267, 2006.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 64, p. 180-201, 2000.

PERRIG, D. *et al.* Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 75, p. 1143–1150, 2007.

PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 26, p. 189-199, 2003.

PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. Structural characteristics of humus and biological activity. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 24, p. 273–380, 1992.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 75, p. 57–154, 2002.

PIETERSE, C. M. J. *et al.* Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 35, p. 39-54, 2003. Supl. 1/3.

PINTON, R. *et al.* Soil humic substances affect transport properties of tonoplast vesicles isolated from oat roots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 142, p. 203-210, 1992.

PINTON, R. *et al.* Water-extractable humic substances enhance iron deficiency responses by Fe-deficient cucumber plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 210, p.145–157, 1999.

POONGUZHALI, S.; MADHAIYAN, M.; SA, T. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from Chinese cabbage and their effect on growth and phosphorus utilization of plants. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 18, p. 773-777, 2008.

POVINELI, V. O. **Fixação biológica de nitrogênio por *Azospirillum brasilense* na cultura do milho**. 2012. 27 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia em Mecanização em Agricultura de Precisão) - Faculdade de Tecnologia “Shunji Nishimura”, Pompéia, 2012.

PUGLISI, E. *et al.* Carbon deposition in soil rhizosphere following amendments with compost and its soluble fractions, as evaluated by combined soil-plant rhizobox and reporter gene systems. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 73, p. 1292–1299, 2008.

QUADROS, P. D. **Inoculação de *Azospirillum* spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul**. 2009. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

QUAGGIOTTI, S. *et al.* Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 803-813, 2004.

RAMÍREZ-BAHENA, M. H. *et al.* The Mimosoid tree *Leucaena leucocephala* can be nodulated by the *symbiovar genistearum* of *Bradyrhizobium canariense*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 43, [art.] 126041, 2020.

RAYLE, D. L.; CLELAND, R. E. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 99, n. 4, p. 1271-1274, 1992.

REDDY, P. M. *et al.* Rhizobial communication with rice roots: induction of phenotypic changes, mode of invasion and extent of colonization. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, p. 81-98, 1997.

REICHEMBACK, M. P. *et al.* Inoculação de *Azospirillum brasilense* e fontes de nitrogênio mineral em arroz de terras altas irrigado por aspersão. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO ARROZ IRRIGADO, 7., 2011, Balneário Camboriú. **Anais** [...]. Itajaí: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, 2011. v. 2, p. 259-262.

REINHOLD, B. *et al.* *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogenfixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L) Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 37, p. 43-51, 1987.

REIS, V. M. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 22 p. (Documentos, 232).

REIS, V. M. *et al.* **Recomendação de uma mistura de estirpes de cincobactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação de cana-de-açúcar: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Azospirillum amazonense* (BR 11145) e *Burkholderia tropica* (BR11366)**. Seropédica: Embrapa, 2009. 4 p. (Embrapa Circular Técnica, 29).

REY, A. M.; CHAMORRO, D. R.; RAMÍREZ, M. Efecto de la doble inoculación de rizobios y micorrizas sobre la producción y calidad del forraje de *Leucaena leucophala*. **Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, Bogotá, v. 6, n. 2, p. 52-59, 2005.

RINCÓN, J. *et al.* Efecto de la inoculación con cepas nativas e introducidas de *Rhizobium* sobre la fijación de nitrógeno en *Leucaena* (*Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit). **Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia**, Maracaibo, v. 17, n. 4, p. 342-357, 2000.

RIBEIRO, V. M. *et al.* Efeito alelopático de *Leucaena leucocephala* e *Hovenia dulcis* sobre germinação de *Mimosa bimucronata* e *Peltophorum dubium*. **Iheringia, Série Botânica**, Porto Alegre, v. 74, [art.] e2019006, 2019.

RODDA, M. R. C. *et al.* Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. I - Efeito da concentração. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 30, p. 649-656, 2006.

ROESCH, L. F. W. *et al.* Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 22, p. 967-974, 2006.

ROSA, C. M. *et al.* Efeito de substâncias húmicas na cinética de absorção de potássio, crescimento de plantas e concentração de nutrientes em *Phaseolus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 33, p. 959-967, 2009.

SANTAMARÍA, R. I. *et al.* Narrow-host-range bacteriophages that infect *Rhizobium etli* associate with distinct genomic types. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 80, p. 446–454, 2014.

SANTOS, F. L. **Inoculação e coinoculação de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas de arroz, milho e trigo**. 2018. 106 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

SANTOS, J. O. **Divergência genética em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.): diversidade genética entre isolados nativos de rizóbios noduladores do feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.).** 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2008.

SANTOS, J. O. *et al.* Ontogenia da nodulação em feijão-fava (*Phaseolus lunatus*). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 4, n. 4, p. 426–429, 2009.

SANTOS, J. O. *et al.* Genetic diversity among isolates of Rhizobia from *Phaseolus lunatus*. **Annals of Microbiology**, Milano, v. 61, p. 437-444, 2011.

SARRUGE, J. R. Soluções nutritivas. **Summa Phitopathologica**, Piracicaba, v. 1, p. 231-234, 1975.

SCALCO, M. S. *et al.* Produtividade e qualidade industrial do trigo sob diferentes níveis de irrigação e adubação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 2, p. 400-410, 2002.

SCHER, F. M.; BAKER, R. Effect of pseudomonas putida and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt Pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, p. 1567-1573, 1982.

SENESE, N. *et al.* A comparative survey of recent results on humic-like fractions in organic amendments and effects on native soil humic substances. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 39, p. 1244–1262, 2007.

SERRANO-SERRANO, M. L. *et al.* Gene pools in wild Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Americas: evidences for an Andean origin and past migrations. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Washington, DC, n. 54, p. 76-87, 2010.

SERVÍN-GARCIDUEÑAS, L. E. *et al.* Symbiont shift towards *Rhizobium* nodulation in a group of phylogenetically related *Phaseolus* species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Washington, DC, v. 79, p. 1–11, 2014.

SESSITSCH, A. *et al.* Advances in *Rhizobium* research. **Critical Reviews in Plant Science**, Abingdon, v. 21, p. 323-378, 2002.

SHAH, Z. H. *et al.* Humic substances: determining potential molecular regulatory processes in plants. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 9, p. 263, 2018.

SHELTON, H. M.; BREWBAKER, J. L. *Leucaena leucocephala*-the most widely used forage tree legume. *In*: MATHISON, G. W. (ed.). **Forage tree legumes in tropical agriculture**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 21-33.

SILVA, R. M. *et al.* Desenvolvimento radicular e produção de aveia preta até o estágio de grão pastoso, cultivada em solução nutritiva completa com adição de substâncias húmicas. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 6, n. 1, p. 53-58, 2000a.

SILVA, R. M. *et al.* Desenvolvimento das raízes de azevém cultivado em solução nutritiva completa, adicionada de substâncias húmicas, sob condições de casa de vegetação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 29, p.101-110, 2000b.

SILVA, A. C. *et al.* Promoção do crescimento radicular de plântulas de tomateiro por substâncias húmicas isoladas de turfeiras. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 35, p. 1609-1617, 2011.

SILVA, K. *et al.* *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 35, n. 3, p. 175-182, 2012.

SILVA FILHO, A. V.; SILVA, M. I. V. **Importância das substâncias húmicas para a Agricultura**, 2009. Disponível em: <http://www.emepa.org.br/anais/volume2/av209.pdf>. Acesso em: 25 maio 2019.

SILVEIRA, J. A. G. *et al.* Phosphoenolpyruvate carboxylase and glutamine synthetase activities in relation to nitrogen fixation in cowpea nodules. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 10, p. 9-23, 1998.

SKONIESKI, F. R. **Inoculação de *Azospirillum brasilense* e doses de nitrogênio em milho para produção de silagem e grãos**. 2015. 94 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

SOARES, A. L. D. L. *et al.* Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG): II-feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 30, n. 5, p. 803-811, 2006.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Handbook for rhizobia: methods in legume-rhizobium technology**. New York: Springer-Verlag, 1994. 450 p.

SONDERGAARD, T. E.; SCHULZ, A.; PALMGREN, M. G. Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H⁺ - ATPase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, p. 2475–2482, 2004.

SOUSA, F. B. **Leucena: produção e manejo no nordeste brasileiro**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2005. (Circular Técnica, 18).

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

SPACCINI, R. *et al.* Bioactivity of humic substances and water extracts from compost made by ligno-cellulose wastes from biorefinery. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 646, p. 792–800, 2019.

STEVENSON, F. J. Biochemistry of the formation of humic substances. *In*: STEVENSON, F. J. **Humus chemistry, genesis, composition, reactions**. New York: John Wiley, 1994. p. 188–211.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews of Plant Sciences**, Boca Raton, v. 19, p. 1-30, 2000.

SZOTT, L. T.; PALM, C. A.; SANCHEZ, P. A. Agroforestry in acid soils of humid tropics. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 45, p. 275-301, 1991.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 24, p. 976-980, 1978.

TEDESCO, M. J. *et al.* **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174 p.

TEJADA, M.; GONZALEZ, J. L. Effects of foliar application of a byproduct of the two- step olive oil mill process on rice yield. **European Journal of Agronomy**, Helsinki, v. 21, p. 31-40, 2004.

THENG, B. Humic substances. *In*: THENG, B. K. G. (ed.). **Formation and properties of clay-polymer complexes**. Amsterdam: Elsevier, 2012. (Development in clay science, v. 4). cap. 12, p. 391–456.

TILMAN, D. The greening of the green revolution. **Nature**, London, v. 396, p. 211-221, 1998.

TIAN, G.; KANG, B. T.; BRUSSAARD, L. Biological effects of plant residues with contrasting chemical compositions under humid tropical conditions- decomposition and nutrient release. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 24, n. 10, p. 1051-1060, 1992.

TILBA, V. A.; SINEGOVSKAYA, V. T. Role of symbiotic nitrogen fixation in increasing photosynthetic productivity of soybean. **Russian Agricultural Sciences**, Moscow, v. 38, p. 361–363, 2012.

TITTONELL, P. Ecological intensification of agriculture – sustainable by nature. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, Amsterdam, v. 8, p. 53–61, 2014.

TREVISAN, S. *et al.* Humic substances biological activity at the plant-soil interface from environmental aspects to molecular factors. **Plant Signaling and Behavior**, Abingdon, v. 5, n. 6, p. 635-643, 2010.

TREVISAN, S. *et al.* Humic substances affect Arabidopsis physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 74, p. 45–55, 2011.

TRINICK, M. J. Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 49, n. 1, p. 39-53, 1980.

TZEC-GAMBOA, M. *et al.* Biochemical and molecular characterization of native rhizobia nodulating *Leucaena leucocephala* with potential use as bioinoculants in Yucatan, Mexico. **Chiang Mai Journal of Science**, Chiang Mai, v. 47, n. 1, p.1-15, 2020.

VALERO, N.; MELGAREJO, L. M.; RAMÍREZ, R. Effect of low-rank coal inoculated with coal solubilizing bacteria on edaphic materials used in post-coal-mining land reclamation: a greenhouse trial. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, Heidelberg, v. 3, [art.] 20, 2016.

VALERO, N. O.; GOMEZ, L. C.; MELGAREJO, L. M. Supramolecular characterization of humic acids obtained through the bacterial transformation of a low rank coal. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 29, n. 9, p. 1842-1853, 2018.

VARANINI, Z.; PINTON, R. Direct versus indirect effects of soil humic substances on plant growth and nutrition. *In*: PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. (ed.). **The rhizosphere**. Basel: Marcel Dekker, 2001. p. 141–158.

VARGAS, L. K. *et al.* Diversidade genética e eficiência simbiótica de rizóbios noduladores de acácia-negra de solos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 31, p. 647-654, 2007.

VAUGHAN, D.; MALCOLM, R. E. Influence of humic substances on growth and physiological process. *In*: VAUGHAN, D.; MALCOLM, R. E. (ed.). **Soil organic matter and biological activity**. Amsterdam: Kluwer Academic, 1985. p. 37–75.

VELÁZQUEZ, E. *et al.* Current status of the taxonomy of bacteria able to establish nitrogen-fixing legume symbiosis. *In*: ZAIDI, A.; KHAN, M. S.; MUSARRAT, J. (ed.). **Microbes for legume improvement**. 2nd ed. Cham: Springer, 2017. p. 1-43.

VERESOGLOU, S. D.; MENEXES, G. Impact of inoculation with *Azospirillum* spp. on growth properties and seed yield of wheat: a meta-analysis of studies in the ISI Web of Science from 1981 to 2008. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 337, p. 469–480, 2010.

VIEIRA, R. F. A cultura do feijão-fava. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 16, n. 174, p. 30-37, 1992.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164 p. (International Biological Programme Handbook 15).

WANG, E. T.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; MARTINEZ-ROMERO, E. Genetic diversity of rhizobia from *Leucaena leucocephala* nodules in Mexican soils. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 5, p. 711-724, 1999.

WANG, E. T. *et al.* Diverse *Mesorhizobium plurifarum* populations native to Mexican soils. **Archives of Microbiology**, New York, v. 180, n. 6, p. 444-454, 2003.

WANG, F. Q. *et al.* Characterization of rhizobia isolated from *Albizia* spp. in comparison with microsymbionts of *Acacia* spp. and *Leucaena leucocephala* grown in China. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, n. 6, p. 502-517, 2006.

WEBSTER, G. *et al.* Interactions of rhizobia with rice and wheat. **Plant and Soil**, The Hague, v. 194, p. 115-122, 1997.

WILMOTH, J. *et al.* População mundial deve chegar a 9,7 bilhões de pessoas em 2050, diz relatório da ONU. **Nações Unidas Brasil**, n. 17, p. 1, 2019. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/populacao-mundial-deve-chegar-a-97-bilhoes-de-pessoas-em-2050-diz-relatorio-da-onu/>. Acesso em: 29 fev. 2020

XAVIER, G. R. *et al.* Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. **Caatinga**, Mossoró, v. 19, p. 25-33, 2006.

XIE, C.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1435-1438, 2005.

XU, K. W. *et al.* Symbiotic efficiency and phylogeny of the rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* in arid-hot river valley area in Panxi, Sichuan, China. **Applied microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, n. 2, p. 783-793, 2013.

YADEGARI, M. *et al.* Evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds inoculation with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 11, n. 15, p.1935–1939, 2008.

YAKHIN, O. I. *et al.* Biostimulants in plant science: a global perspective. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v.7, p. 2049, 2017.

YANNI, Y. G. *et al.* Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessments of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, p. 99-114, 1997.

YANNI, Y. G. *et al.* The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 28, n. 9, p. 845-870, 2001.

YOUNG, C. C. *et al.* *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 959–963, 2008.

ZAKHIA, F.; LAJUDIE, P. Taxonomy of rhizobia. **Agronomie**, Paris, v. 21. n. 6, p. 569- 576, 2001.

ZANDONADI, D. B. **Bioatividade de ácidos húmicos: promoção do desenvolvimento radicular e atividade das bombas de H⁺**. 2006. 161 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2006.

ZANDONADI, D. B.; CANELLAS, L. P.; FAÇANHA, A. R. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. **Planta**, Berlin, v. 225, p.1583-1595, 2007.

ZANDONADI, D. B.; BUSATO, J. G. Vermicompost humic substances: technology for converting pollution into plant growth regulators. **International Journal of Environmental Science and Engineering Research**, Tehran, v. 3, p. 73-84, 2012.

ZANDONADI, D. B. *et al.* Plant physiology as affected by humified organic matter. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, Campo dos Goytacazes, v. 25, n. 1, p. 12-25, 2013.

ZANDONADI, D. B. *et al.* Ação da matéria orgânica e suas frações sobre a fisiologia de hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, p. 14-20, 2014.

ZHOU, Y. *et al.* *Azospirillum palatum* sp. nov., isolated from forest soil in Zhejiang province, China. **Journal of General Applied Microbiology**, Tokyo, v. 55, p. 1-7, 2009.

ZILLI, J. E. *et al.* Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em Caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, p. 811-818, 2006

Resumo Biográfico

Juan Guillermo Cubillos Hinojosa, filho de Gonzalo Antonio Cubillos e Antonia Isabel Hinojosa, nasceu em 28 de junho de 1986, em Valledupar, Cesar, Colômbia. Estudou no Colégio “Fundación Manuela Beltrán” e no Colégio “Nacional Loperena”, onde completou seus estudos de ensino fundamental e médio. Em 2003 ingressou no curso de graduação em Microbiologia da “Universidad Popular del Cesar” da Colômbia, onde trabalhou desde o sétimo semestre no grupo de iniciação científica “Germinar” anexo ao grupo de pesquisa em microbiologia agrícola e ambiental – MAGYA, graduando-se como Microbiologista com ênfase Agroindustrial em 2008. Começou sendo assistente de docência da Professora Margarita Perea Dallos no laboratório de biotecnologia vegetal da Universidade Nacional da Colômbia. De abril de 2009 a dezembro de 2010 ingressou como professor de microbiologia em programas tecnológicos do “Servicio Nacional de Aprendizaje – SENA” sede Valledupar, Colômbia. Em 2011 ingressou no SENA sede Bogotá (Colômbia) como professor de Microbiologia e ao mesmo tempo começou os seus estudos de mestrado em Ciências Agrárias na “Universidad Nacional de Colombia” sede Bogotá, na linha de pesquisa Solos e Aguas. Durante o curso de mestrado foi bolsista pelo programa jovem pesquisador de Colciencias em duas oportunidades (2011 e 2012), no grupo de excelência “Fisiología do Estres y Biodiversidad en Plantas y Microorganismos” da Universidad Nacional de Colombia. Em agosto de 2014 ingressou como professor nos programas de graduação em Microbiologia da Universidad Popular del Cesar e “Universidad Libre de Colombia” sede Barranquilla. Em março 2016, através do programa de bolsas da Organização de Estados Americanos - OEA e o Grupo de Universidades Brasileiras - COIMBRA iniciou seus estudos de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na área de Microbiologia do Solo, sob a orientação do Professor Enilson Luiz Saccol de Sá.