

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

DANILO MESSIAS DE OLIVEIRA

**POTENCIAL DE INSUMOS BIOLÓGICOS NO
DESENVOLVIMENTO DE FORRAGEIRAS**

ALEGRE-ES

2020

DANILO MESSIAS DE OLIVEIRA

**POTENCIAL DE INSUMOS BIOLÓGICOS NO
DESENVOLVIMENTO DE FORRAGEIRAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal na área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Diego Lang Burak
Coorientadora: Dra. Letícia Oliveira da Rocha

ALEGRE-ES

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

O48p Oliveira, Danilo Messias, 1988-
Potencial de insumos biológicos no desenvolvimento de forrageiras / Danilo Messias Oliveira. - 2020.
147 f. : il.

Orientador: Diego Lang Burak.

Coorientadora: Letícia Oliveira Rocha.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Forrageiras. 2. Fixação biológica de nitrogênio. 3. Bactérias promotoras de crescimento vegetal. 4. Substâncias húmicas. 5. Micorriza arbuscular. I. Burak, Diego Lang. II. Rocha, Letícia Oliveira. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 63

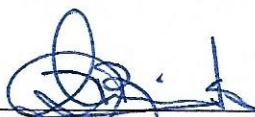
DANILO MESSIAS DE OLIVEIRA

**POTENCIAL DE INSUMOS BIOLÓGICOS NO
DESENVOLVIMENTO DE FORRAGEIRAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Produção Vegetal na área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas.

Aprovada em 15 de abril de 2020

COMISSÃO EXAMINADORA



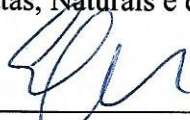
Prof. Dr. Sc. Diego Lang Burak
Centro de Ciências Agrárias e Engenharia – UFES
Orientador



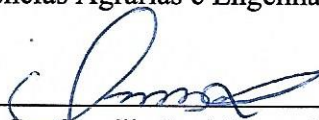
Dra. Letícia Oliveira da Rocha
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF
Coorientadora



Prof. Dr. Sc. Anderson Lopes Peçanha
Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde – UFES



Prof. Dr. Sc. Eduardo de Sá Mendonça
Centro de Ciências Agrárias e Engenharia – UFES



Prof. Dr. Sc. Otacílio José Passos Rangel
Instituto Federal do Espírito Santo – Campus Alegre

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar força e discernimento para concluir mais esta etapa em minha vida;

Aos meus familiares que me incentivaram nesta caminhada;

À minha esposa, Anne Keron Moura Soares de Oliveira, pelo companheirismo, lealdade, amor e incentivo. Obrigado por sempre me acalmar e apoiar meus objetivos!

Às minhas filhas Ana Luíza Soares de Oliveira e Maria Eduarda Soares de Oliveira, vocês sempre serão a base para que eu possa prosseguir novos caminhos;

Aos colegas do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo, especialmente a galera do Posto “Zito Pinel” – Ademar, Allan, Jeangelis, Mateus, Mayara, Raphael, Rogério e Wagner, pela ajuda e incentivo;

Aos colegas de turma e laboratório da UFES - Ronaldo, Eduardo, Luciana, Felipe, Uliana, Raul, Pedro e Sara que contribuíram para desenvolvimento deste trabalho;

À minha nobre colega Lenita que participou desde o início deste projeto, sendo uma pessoa de grande importância. Graças aos seus ensinamentos e ajuda conclui este trabalho. Muito obrigado!

Ao professor Fábio Olivares pela doação das estirpes de *Herbaspirillum* spp e, a toda galera do Laboratório de Biotecnologia da UENF, especialmente a colega Mariana, que além de contribuir para finalização deste projeto, ajudou na permanência em Campos do Goytacazes no período que estive na UENF;

Aos estagiários Udson, José Vinicius e especialmente ao meu amigo Cássio Carlette, por me ajudarem tanto, e por serem sempre prestativos. Sou muito grato a vocês!

Ao meu orientador, Dr Diego Lang Burak, agradeço imensamente pela oportunidade, ensinamentos e parceria;

À coorientadora Dra Leticia Oliveira da Rocha, por quem tenho enorme admiração e respeito. Você foi fundamental para desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por toda ajuda e ensinamentos!

A Total Biotecnologia pela doação do inoculante AzoTotal[®], especialmente ao pesquisador André Nakatani;

A Universidade Federal do Espírito Santo e a todos os meus professores, por transmitirem seus conhecimentos;

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001;

A FAPES, pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| RESUMO..... | xiii |
| INTRODUÇÃO GERAL | xvii |
| OBJETIVOS | xix |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | xx |
| CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE BIOFERTILIZANTE E BIOESTIMULANTE NO CRESCIMENTO DE DOIS GENÓTIPOS DE <i>Urochloa</i> spp CULTIVADOS EM SOLO DE PASTAGEM DEGRADADA | 23 |
| 1.0 – INTRODUÇÃO..... | 25 |
| 2.0 – MATERIAIS E MÉTODOS..... | 27 |
| 3.0 – RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 34 |
| 4.0 – CONCLUSÕES..... | 53 |
| 5.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 54 |
| CAPÍTULO 2: EFEITO DAS BIOTECNOLOGIAS NA ABSORÇÃO DE NITROGÊNIO EM <i>Urochloa brizantha</i> cv. Marandu | 63 |
| 1.0 – INTRODUÇÃO..... | 65 |
| 2.0 – MATERIAIS E MÉTODOS..... | 66 |
| 3.0 – RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 70 |
| 4.0 – CONCLUSÕES..... | 77 |
| 5.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 78 |
| CAPÍTULO 3: EFEITO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EM <i>Arachis pintoi</i> cv. Amarillo MG 100 INOCULADOS COM <i>Bradyrhizobium</i> spp. CULTIVADO EM SOLO DE PASTAGEM DEGRADADA..... | 83 |
| 1.0 - INTRODUÇÃO | 85 |
| 2.0 – MATERIAIS E MÉTODOS..... | 86 |
| 3.0 - RESULTADOS E DISCUSSÕES | 90 |
| 4.0 – CONCLUSÕES..... | 100 |
| 5.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 101 |
| CAPÍTULO 4: POTENCIAL DOS BIOFERTILIZANTES E BIOESTIMULANTE NO CRESCIMENTO DE <i>Arachis pintoi</i> cv. Amarillo MG 100 CULTIVADO EM SOLO DE PASTAGEM DEGRADADA | 107 |
| 1.0 INTRODUÇÃO..... | 109 |
| 2.0 – MATERIAIS E MÉTODOS..... | 110 |
| 3.0 – RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 117 |
| 4.0 – CONCLUSÕES..... | 135 |
| 5.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 136 |
| APÊNDICE | 144 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1:** Caracterização física e química do solo utilizado no experimento em casa de vegetação 28
- Tabela 2:** Registro diário de temperatura no interior da casa de vegetação no decorrer do experimento. 28
- Tabela 3:** Composição média do vermicomposto usado na extração de substâncias húmicas..... 31
- Tabela 4:** Valores de F, níveis de significância, coeficientes de variação e médias dos parâmetros fitotécnicos: altura de planta (AP), diâmetro do colmo (DC), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) em função do manejo, genótipo e biotecnologias..... 35
- Tabela 5:** Média dos valores de altura de planta (cm) em genótipo de *Urochloa brizantha* cv. Marandu e *Urochloa decumbens* cv. Basilisk, com e sem calagem e adubação, cultivadas com diferentes biotecnologias..... 36
- Tabela 6:** Valores de F, níveis de significância, coeficientes de variação e médias do acúmulo de nutrientes na parte aérea de *Urochloa* spp: nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em função do manejo, genótipo e biotecnologias..... 40
- Tabela 7:** Valores de F, níveis de significância e médias dos parâmetros fisiológicos: taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E), concentração interna de CO_2 (C_i), eficiência no uso de água (EUA), rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m) e índice de clorofila falker - teor de clorofila total (Chlt) em função do manejo, genótipo e biotecnologias. 45
- Tabela 8:** Média dos parâmetros fisiológicos: taxa fotossintética (A - $\mu\text{mol } CO_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s - $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiração (E - $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração interna de CO_2 (C_i - $\mu\text{mol mol}^{-1}$), eficiência no uso de água (EUA - $\mu\text{mol } CO_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} / \mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m) e teor de clorofila total (Chlt) em função do manejo e genótipo de *Urochloa* spp..... 46
- Tabela 9:** Valores de F, níveis de significância e médias dos parâmetros: Atividade de hidrólise do diacetado de fluoresceína (FDA) do solo e porcentagem de colonização micorrízicas (CM) em função do manejo, genótipo e biotecnologias..... 50

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Caracterização física e química do solo utilizado no experimento em casa de vegetação 64

Tabela 2: Composição média do vermicomposto usado na extração de substâncias húmicas 67

Tabela 3: Resumo das análises de variância para as variáveis: altura de planta (AP) (cm), diâmetro do colmo (DC) (mm), massa seca da parte aérea (MSPA) (mg vaso⁻¹), massa seca de raiz (MSR) (mg vaso⁻¹) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (N) (mg vaso⁻¹) em *Urochloa brizantha* cv. marandu sob diferentes biotecnologias. 69

Tabela 4: Resumo das análises de variância para as variáveis: taxa de assimilação de CO₂ (A) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (gs) ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração interna de CO₂ (Ci) ($\mu\text{mol mol}^{-1}$), transpiração (E) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), eficiência no uso da água (EUA) [$(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1})/(\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1})$], eficiência instantânea de carboxilação (EiC) [$(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1})/(\mu\text{mol mol}^{-1})$] e rendimento quântico do fotossistema II (F_v/F_M) em *Urochloa brizantha* cv. Marandu sob diferentes biotecnologias. 72

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Caracterização física e química do solo utilizado no experimento em casa de vegetação 85

Tabela 2: Composição média do vermicomposto usado na extração de substâncias húmicas 86

Tabela 3: Médias \pm erro padrão dos teores de nutrientes na parte aérea de *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 aos 60 dias após emergência (DAE) em resposta às doses de substâncias húmicas (0, 20, 40, 60 e 80 mg L⁻¹ C) aplicadas aos 20 e 40 DAE 92

CAPÍTULO 4

Tabela 1: Caracterização física e química do solo utilizado no experimento em casa de vegetação 109

Tabela 2: Composição média do vermicomposto usado na extração de substâncias húmicas 111

Tabela 3: Valores de F, níveis de significância, coeficientes de variação e médias da altura de planta (AP), diâmetro do caule (DC), número de nódulos (NNOD), massa seca de parte aérea (MSPA) e raiz (MSR) de *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100. 116

Tabela 4: Média \pm erro padrão dos teores de nutrientes (g kg^{-1}) em parte aérea de *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 aos 60 dias, cultivados sobre dois manejos com diferentes biotecnologias..... 121

Tabela 5: Valores de F, níveis de significância, coeficientes de variação e médias do acúmulo de N, P, K Ca e Mg na parte aérea de *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100. 122

Tabela 6: Valores de F, níveis de significância, coeficientes de variação e médias das variáveis: hidrólise da atividade do diacetato de fluoresceína (FDA) do solo e taxa de colonização micorrízicas (CM) nas raízes de *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100.... 125

Tabela 7: Valores de F, níveis de significância, coeficientes de variação e médias das variáveis fisiológicas avaliadas: taxa de assimilação de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), concentração interna de CO_2 (C_i), transpiração (E), eficiência no uso de água (EUA), eficiência instantânea de carboxilação (EiC), rendimento quântico máximo (F_v/F_M) e teor de clorofila total – índice de clorofila falker (Chl). 128

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO 1

Figura 1: Massa seca de parte aérea (a), massa seca de raiz (b) de *Urochloa* spp aos 60 dias. SCA: sem calagem e adubação; CCA: com calagem e adubação; AzoTotal[®]: *Azospirillum brasilense*; FMA: *Dentiscutata heterogama*; SH+Herb. spp: substâncias húmicas – 40 mg L⁻¹ C juntamente com estirpes de *Herbaspirillum* spp); Co-inoc.: coinoculação. 38

Figura 2: Acúmulo de nitrogênio (a), fósforo (b) e potássio (c) na parte aérea de *Urochloa* spp aos 60 dias, em função da interação manejo x genótipo. SCA: sem calagem e adubação; CCA: com calagem e adubação. Médias ± erro padrão seguidas da mesma letra maiúscula entre manejos e minúscula entre cultivares, não diferem entre si, pelo teste de Tukey para $p \leq 0,05$ 41

Figura 3: Acúmulo de nitrogênio (a), fósforo (b), potássio (c) e cálcio (d) na parte aérea de *Urochloa* spp. aos 60 dias, em função da interação manejo x biotecnologia. SCA: sem calagem e adubação; CCA: com calagem e adubação. AzoToTal[®]: *Azospirillum brasilense*; FMA: *Dentiscutata heterogama*; SH+Herb. spp (substâncias húmicas - 40 mg L⁻¹ C e *Herbaspirillum* sp); Co-inoc. (coinoculação). Médias ± erro padrão seguidas da mesma letra maiúscula entre manejos e minúscula entre biotecnologias, não diferem entre si, pelo teste Tukey para $p \leq 0,05$ 43

Figura 4: A: taxa de assimilação de CO₂ (a); g_s: condutância estomática; F_v/F_m: rendimento quântico do fotossistema II (c); ICF: Índice de clorofila falker - clorofila total (d). SCA: sem calagem e adubação; CCA: com calagem e adubação. FMA: Fungo micorrízico arbuscular; SH+Herb. spp: substâncias húmicas – 40 mg L⁻¹ C juntamente com estirpes de *Herbaspirillum* spp.); Co-in.: coinoculação. 47

Figura 5: Quantidade de diacetado de fluoresceína (FDA) fluoresceína (FDA) hidrolisada µg⁻¹ solo h⁻¹, em diferentes manejos (a) e genótipos *Urochloa* spp. (b); Taxa de colonização micorrízica em % (c). SCA: sem calagem e adubação; CCA: com calagem e adubação. Cont.: Controle; FMA: Fungo micorrízico arbuscular; SH+Herb. spp.: substâncias húmicas – 40 mg L⁻¹ C juntamente com estirpes de *Herbaspirillum* spp.); Co-in.: coinoculação. 51

CAPÍTULO 2

Figura 1: Massa seca de parte aérea (a), massa seca de raiz (b), altura de planta (c), diâmetro do colmo (d) e acúmulo de nitrogênio (e) na parte aérea de *Urochloa brizantha* cv. Marandu aos 45 dias. Médias ± erro padrão seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey para $p \leq 0,05$ 71

Figura 2: A: taxa de assimilação de CO₂ (a); Ci: concentração interna de CO₂ (b); E: transpiração (c); EiC: eficiência instantânea de carboxilação (d) e F_v/F_m: rendimento

quântico do fotossistema II (e). Médias \pm erro padrão seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey para $p \leq 0,05$ 73

CAPÍTULO 3

Figura 1: Média \pm erro padrão - massa seca de parte aérea (a), massa seca de raiz (b), altura de plantas (c) e número de nódulos (d) em *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 aos 60 dias, em resposta às concentrações de SH (0, 20, 40, 60 e 80 mg L⁻¹ C) aplicadas aos 20 e 40 DAE. Significativo * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: não significativo..... 38

Figura 2: Média \pm erro padrão - acúmulo de nitrogênio (a), acúmulo de fósforo (b), acúmulo de potássio (c), acúmulo de cálcio (d) e acúmulo de magnésio (e) em parte aérea de *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 aos 60 dias, em resposta às doses de SH (0, 20, 40, 60 e 80 mg L⁻¹ C) aplicadas aos 20 e 40 DAE. Significativo * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: não significativo..... 95

Figura 3: Médias \pm erro padrão - rendimento quântico do fotossistema II (a), clorofila total (b), clorofila a (c), clorofila b (d) e relação clorofila a/b (e) de *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 aos 60 dias, em resposta as doses de SH (0, 20, 40, 60 e 80 mg L⁻¹ C) aplicadas aos 20 e 40 DAE. Significativo * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: não significativo. 97

CAPÍTULO 4

Figura 1: Massa seca de parte aérea (a), massa seca de raiz (b), número de nódulos (c) em *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 aos 60 dias. SCA: sem calagem e adubação; CCA: com calagem e adubação; Contr. (controle); Brad. (*Bradyrhizobium* spp); FMA (*Rhizoglossum clarum*); SH+Brad. (Substâncias húmicas - 40 mg L⁻¹ C e *Bradyrhizobium* spp); Co-in. (coinoculação). Médias \pm erro padrão seguidas da mesma letra maiúscula entre manejos e minúscula entre biotecnologias, não diferem entre si, pelo teste Tukey para $p \leq 0,05$ 119

Figura 2: Acúmulo de nitrogênio (a), acúmulo de fósforo (b), acúmulo de potássio (c), acúmulo de cálcio (d) e acúmulo de magnésio (e) em parte aérea de *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 aos 60 dias, cultivados sobre dois manejos com diferentes biotecnologias. SCA: sem calagem e adubação; CCA: com calagem e adubação. Médias \pm erro padrão seguidas da mesma letra maiúscula entre manejos e minúscula entre biotecnologias, não diferem entre si, pelo teste Tukey para $p \leq 0,05$ 123

Figura 3: Quantidade de diacetato de fluoresceína (FDA) hidrolisado μg^{-1} solo h^{-1} (a); taxa de colonização micorrízica em % (b). Contr. (controle); Brady. (*Bradyrhizobium* spp); FMA (*Rhizoglossum clarum*); SH+Brady. (Substâncias húmicas - 40 mg L⁻¹ C e *Bradyrhizobium* spp); Co-in. (coinoculação). Médias \pm erro padrão seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Tukey para $p \leq 0,05$ 126

Figura 4: Taxa de assimilação de CO₂ (a), condutância estomática (b), transpiração (c) e rendimento quântico do fotossistema II (d) em *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 aos 60 dias, cultivados sobre dois manejos com diferentes biotecnologias. Contr.: controle; Brad.: *Bradyrhizobium* spp; FMA: *Rhizoglonus clarum*; SH+Brad.: SH + *Bradyrhizobium* spp; Co-in.: coinoculação. SCA: sem calagem e adubação; CCA: com calagem e adubação. Médias ± erro padrão seguidas da mesma letra minúscula entre biotecnologias, não diferem entre si, pelo teste Tukey para $p \leq 0,05$ 130

Figura 5: Concentração interna de CO₂ (a), eficiência instantânea de carboxilação (b) e clorofila total (d) em *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 aos 60 dias, cultivados sobre dois manejos com diferentes biotecnologias. SCA: sem calagem e adubação; CCA: com calagem e adubação. Médias ± erro padrão seguidas da mesma letra minúscula entre biotecnologias, não diferem entre si, pelo teste Tukey para $p \leq 0,05$ 131

RESUMO

OLIVEIRA, Danilo Messias. **Potencial de insumos biológicos no desenvolvimento de forrageiras**. 2020. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES. Orientador: Diego Lang Burak. Coorientadora: Dra. Letícia Oliveira da Rocha.

A limitação da capacidade produtiva das pastagens devido à excessiva pressão de pastejo aliada à escolha incorreta da forrageira e à baixa disponibilidade de nutrientes no solo favorece a degradação destas áreas. Diante do cenário conservacionista do solo, o uso de plantas forrageiras eficientes na produção de biomassa, microrganismos promotores de crescimento vegetal e fungos micorrízicos arbusculares, juntamente com substâncias húmicas têm sido apontados como pontos chave para recuperação das pastagens degradadas. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar biotecnologias integrando o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e substâncias húmicas (SH), como estratégia para maximização da produtividade das forrageiras em dois manejos (SCA - sem calagem e adubação e, CCA - com calagem e adubação). Os quatro capítulos foram desenvolvidos em casa de vegetação. No capítulo 1, o esquema fatorial 2x2x5 com 4 repetições, composto por genótipos de *Urochloa*: *U. brizantha* cv. Marandu e *U. decumbens* cv. Basilisk inoculados com produto comercial AzoTotal[®] e FMA, isolados ou conjuntamente e, no tratamento com bioestimulante, foi aplicado via spray SH (dose 40 mg L⁻¹ C) extraído de vermicomposto combinado com estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* - HIV206 e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* - HCC101 e controle. No manejo CCA a maior MSPA foi obtida com aplicação de SH+*Herb. spp.* A aplicação de SH+*Herb. spp.* na presença de calagem e adubação revelou maiores acúmulos de N, P, K e Ca. A utilização de biotecnologias influenciou positivamente os parâmetros fisiológicos. No capítulo 2, em bloco casualizado, foi avaliado o efeito de três biotecnologias e um controle em capim-maranduinoculado isolado ou conjuntamente com AzoTotal[®] e SH+*Herb. spp.* (dose 40 mg L⁻¹ C) combinado com estirpes – (HIV206 e HCC101) e controle. O capim-marandu em condições controladas submetido aos tratamentos T3 e T4 apresentou melhor desempenho nos parâmetros avaliados. Houve melhorias nos parâmetros fisiológicos ao aplicar os biofertilizantes e bioestimulantes. No capítulo 3, em bloco casualizado, foi avaliado o efeito dose-resposta em *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 inoculado com *Bradyrhizobium spp.*, onde os tratamentos consistiram em cinco concentrações de substâncias húmicas (SH): 0, 20, 40, 60, 80 mg L⁻¹ de C, aplicadas aos 20 e 40 DAE, sendo avaliado o potencial de produção de biomassa e concentração de nutrientes. A adição de SH possibilitou incremento de produção do amendoim forrageiro, acúmulo de nutrientes e aumento do rendimento quântico do fotossistema II. A concentração de 40 mg L⁻¹ de C possibilitou obter máxima absorção de nutrientes. No capítulo 4, o esquema fatorial 2x5 com 4 repetições, composto por: dois manejos (SCA - sem calagem e adubação e, CCA - com calagem e da recomendação de 40% PK), para as biotecnologias avaliadas testou-se: *Bradyrhizobium spp.*; FMA; SH (dose 40 mg L⁻¹ C aos 20 e 40 DAE) juntamente com

Bradyrhizobium spp. e, coinoculação (*Bradyrhizobium* spp. e FMA). As biotecnologias influenciaram positivamente na massa seca da parte aérea e nas trocas gasosas. As biotecnologias *Bradyrhizobium* spp. e SH+*Brad.* spp. proporcionaram maior massa seca de raiz. As plantas inoculadas com *R. clarum* e coinoculação apresentaram maiores acúmulos de nutrientes. A atividade microbiana foi mais intensa no solo sob manejo SCA.

Palavras-chave: forrageiras, fixação biológica de nitrogênio, bactérias promotoras de crescimento vegetal, substâncias húmicas, micorriza arbuscular.

GENERAL ABSTRACT

OLIVEIRA, Danilo Messias. **Potential of biological inputs in forage development.** 2020. Dissertation (Master in Plant Production) - Federal University of Espírito Santo, Alegre-ES. Advisor: Diego Lang Burak. Co-advisor: Dr. Leticia Oliveira da Rocha.

The limitation of the productive capacity of the pastures due to the excessive pressure of grazing combined with the incorrect choice of forage and the low availability of nutrients in the soil favors the degradation of these areas. In view of the soil conservation scenario, the use of efficient forage plants in the production of biomass, microorganisms that promote plant growth and arbuscular mycorrhizal fungi, together with humic substances have been identified as key points for the recovery of degraded pastures. In this sense, the present study aimed to evaluate biotechnologies integrating the use of plant growth promoting bacteria (BPCV), arbuscular mycorrhizal fungi (FMA) and humic substances (SH), as a strategy to maximize the productivity of forages in two managements (SCA - without liming and fertilization and, CCA - with liming and fertilization). The four chapters were developed in a greenhouse. In chapter 1, the 2x2x5 factorial scheme with 4 repetitions, composed of *Urochloa* genotypes: *U. brizantha* cv. Marandu and *U. decumbens* cv. Basilisk inoculated with commercial product AzoTotal[®] and FMA, isolated or together and, in the treatment with biostimulant, was applied via SH spray (dose 40 mg L⁻¹ C) extracted from vermicompost combined with strains of *Herbaspirillum seropedicae* - HIV206 and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* - HCC101 and control. In CCA management, the highest MSPA was obtained with the application of SH+*Herb.* spp. The application of SH+*Herb.* spp. in the presence of liming and fertilization, showed greater accumulations of N, P, K and Ca. The use of biotechnologies positively influenced the physiological parameters. In chapter 2, in a randomized block, the effect of three biotechnologies and a control in inoculated marandu grass was evaluated isolated or together with AzoTotal[®] and SH+*Herb.* spp (dose 40 mg L⁻¹ C) combined with strains - (HIV206 and HCC101) and control. Marandu grass under controlled conditions submitted to treatments T3 and T4 showed better performance in the evaluated parameters. There were improvements in physiological parameters when applying biofertilizers and biostimulants. In chapter 3, in a randomized block, the dose-response effect on *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 inoculated with *Bradyrhizobium* spp., where the treatments consisted of five concentrations of humic substances (SH): 0, 20, 40, 60, 80 mg L⁻¹ of C, applied at 20 and 40 DAE, being evaluated the potential biomass production and nutrient concentration. The addition of SH enabled increased production of forage peanuts, accumulation of nutrients and increased quantum yield of photosystem II. The concentration of 40 mg L⁻¹ of C made it possible to obtain maximum absorption of nutrients. In chapter 4, the 2x5 factorial scheme with 4 repetitions, consisting of: two managements (SCA - without liming and fertilization and, CCA - with liming and the 40% PK recommendation), for the evaluated biotechnologies, we tested: *Bradyrhizobium* spp.; FMA; SH (dose 40 mg L⁻¹ C at 20 and 40 DAE) together with *Bradyrhizobium* spp. and, co-inoculation (*Bradyrhizobium*

spp. and FMA). Biotechnologies had a positive influence on the dry mass of the aerial part and on gas exchange. The biotechnologies *Bradyrhizobium* spp. and SH+*Brad.* spp. provided greater dry root mass. Plants inoculated with *R. clarum* and co-inoculation showed higher accumulations of nutrients. The microbial activity was more intense in the soil under SCA management.

Keyword: forage, biological nitrogen fixation, plant growth promoting bacteria, humic substances, arbuscular mycorrhiza.

INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, a pastagem em sistemas extensivos é a principal fonte do alimento do gado (ALVIM et al., 2002), sendo considerada a forma mais econômica e prática de produzir e oferecer alimentos para os bovinos, garantindo baixo custo de produção (DIAS-FILHO, 2014). Por outro lado, a falta de manejo de pastagens em decorrência do baixo investimento no uso de tecnologias e insumos, associado à escolha incorreta da forrageira, vem ocasionando a degradação destas áreas (BRAZ et al., 2004; DIAS-FIALHO, 2017), comprometendo a qualidade dos solos e da água, elevando o custo de produção e aumentando a pressão do desmatamento para abertura de novas áreas de cultivo. Desta forma, alternativas de cultivo associando biotecnologias podem ser adotadas, vislumbrando sistemas produtivos de menor impacto ao meio ambiente e eficientemente produtivos.

Atualmente em todo território brasileiro estima-se que cerca de 120 milhões de ha cultivados com pastagem apresentem algum grau de degradação (HUNGRIA et al., 2016). Somente no Estado do Espírito Santo cerca de 18,10 % da área total (238.943,66 ha) cultivados com pastagem encontram-se em degradação (BARRETO; SARTORI, 2012). Uma das principais causas da degradação é a falta de cuidados com a fertilidade do solo, tornando-se um grande obstáculo para a sustentabilidade deste sistema de produção (MARTHA JÚNIOR; VILELA, 2002).

Dentre os fatores que limitam o desenvolvimento das pastagens, favorecendo o processo de degradação, tem-se a baixa disponibilidade do nitrogênio (BODDEY et al., 2004), um elemento primordial para potencializar a produção de matéria seca, aumentar o vigor de rebrota e promover o crescimento rápido de forrageiras (TEIXEIRA et al., 2011). Associado ao nitrogênio, o fósforo, embora seja exportado em menor quantidade pelas plantas, também é considerado fator limitante na capacidade produtiva das pastagens (BRAZ et al., 2004), comprometendo o desenvolvimento radicular e o perfilhamento da cultura, conseqüentemente, a absorção dos demais nutrientes, devido ao menor volume de solo explorado pelo sistema radicular (IEIRI et al., 2010; SANTOS et al., 2002). Embora o potássio possa ser absorvido por forrageiras no compartimento não-trocável, devido à exsudação de ácido orgânico ou acidificação da rizosfera (VOLF et al., 2018), a produção das pastagens pode ser comprometida sob baixa disponibilidade deste elemento, tendo em vista, o elevado poder de extração de K em produções elevadas de forragem (PRIMAVESI et al., 2006).

O aporte do nitrogênio e fósforo nos solos ocorre principalmente por meio de fertilizantes sintéticos (DAWSON; HILTON, 2011). No entanto, perdas econômicas e poluição ambiental decorrem da aplicação de fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA et al., 2016). De forma similar, o fósforo também apresenta problemas de disponibilidade nos solos tropicais, devido à sua alta afinidade com óxidos de Fe e Al presentes nestes solos, tornando-o indisponível para plantas (NOVAIS et al., 2007). Associados a estas problemáticas, observa-se que produtores de baixo nível tecnológico nem sempre realizam a correção do pH, tampouco, a aplicação de fertilizantes adequadamente, contribuindo para o aumento do processo de degradação destas áreas.

Nesse contexto, a utilização de biotecnologias capazes de incorporar nutrientes no sistema solo-planta e eficientes em promover crescimento vegetal, através de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV); fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e, substâncias húmicas (SH) (BERRUTI et al., 2016; CANELLAS et al., 2015; GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016), vêm sendo amplamente estudados quanto ao potencial de utilização nos sistemas de produção agrícola, visando à sustentabilidade do modelo atual (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010), diminuindo a dependência de insumos químicos com a substituição parcial ou total por biofertilizantes e bioestimulante.

Através da inoculação de BPCV em cultivos agrícolas há o suprimento de nitrogênio e fósforo, devido à capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) e solubilização de fosfato inorgânico, tornando-os disponíveis às plantas (OLIVEIRA et al., 2014). Além do mais, o potencial promotor de crescimento vegetal, decorrente da produção de fitormônios, é outro benefício bem documentado (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016). De modo paralelo, as micorrizas arbusculares têm influência positiva no crescimento das plantas, por meio da capacidade de fornecer nutrientes, além de outros benefícios às mesmas (BERRUTI et al., 2016).

De forma complementar aos efeitos dos microrganismos promotores de crescimento vegetal, têm-se as substâncias húmicas, reconhecidas pelos efeitos bioestimulantes, possibilitando melhorias no aumento da absorção de nutrientes (DU JARDIN et al., 2015). Outrossim, contribui para o estímulo da H^+ -ATPases presente na membrana plasmática, favorecendo a extrusão de H^+ , e conseqüentemente, no relaxamento da parede celular, permitindo o crescimento vegetal (CANELLAS et al., 2002).

Diante do exposto, o desenvolvimento de sistemas de produção sustentáveis, dos quais a ciclagem de nutrientes pela fixação biológica de nitrogênio e uso de substâncias húmicas devido ao potencial bioestimulante no crescimento vegetativo e associações com micorrizas arbusculares, avançam como promissores para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis. Como hipótese do presente trabalho, acredita-se que a utilização de estirpes de bactérias diazotróficas e FMAs em forrageiras, associadas à aplicação de SH, atende à necessidade parcial de N e P, permitindo um maior desenvolvimento das plantas, conseqüentemente, um melhor potencial produtivo.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar em ambiente controlado biotecnologias integrando o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal, fungos micorrízicos arbusculares e substâncias húmicas fisiologicamente ativas, como estratégia para maximização da produtividade de forrageiras.

Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial das biotecnologias sobre os parâmetros fitotécnicos e fisiológicos dos genótipos de *Urochloa brizantha* cv. Marandu e *Urochloa decumbens* cv. Basilisk associados a dois níveis de manejo;
- Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de substâncias húmicas extraídas de vermicomposto sobre os parâmetros fitotécnicos e fisiológicos em *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100;
- Avaliar o potencial das biotecnologias sobre os parâmetros fitotécnicos e fisiológicos de *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 associado a dois níveis de manejo;
- Determinar a estratégia de melhor potencialização dos efeitos das biotecnologias na melhoria da produtividade de forrageiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVIM, M. J.; BOTREL, M. DE A.; XAVIER, D. F.. **As principais espécies de *Brachiaria* utilizadas no país.** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. In: Documentos 22. 4 p. Juiz de Fora, MG, 2002.

BARRETO, P.; SARTORI, M.; DADALTO, G. G.. **Levantamento de áreas agrícolas degradadas no Estado do Espírito Santo.** Vitória: Centro de Desenvolvimento do Agronegócio (CEDAGRO), 2012.

BERRUTI, A.; LUMINI, E.; BALESTRINI, R.; BIANCIOTTO, V.. Arbuscular Mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: Let's benefit from past successes. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 6, p.1-13, 19 jan. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.01559>.

BODDEY, R. M.; MACEDO, R.; TARRÉ, R. M.; FERREIRA, E.; OLIVEIRA, O. C., REZENDE, C. P.; CANTARUTTI, R. B.; PEREIRA, J. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.. Nitrogen cycling in *Brachiaria* pastures: the key to understanding the process of pasture decline. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [s.l.], v. 103, n. 2, p.389-403, jul. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2003.12.010>.

BRAZ, S. P.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J.; BODDEY, R. M. **Degradação de Pastagens, Matéria Orgânica do Solo e a Recuperação do Potencial Produtivo em Sistemas de Baixo “Input” Tecnológico na Região dos Cerrados.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2004. 8 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico, 9).

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; AGUIAR, N. O.; JONES, D. L.; NEBBIOSO, A.; MAZZEI, P.; PICCOLO, A.. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 196, p.15-27, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L.; FAÇANHA, A. R.. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 130, n. 4, p.1951-1957, 14 nov. 2002. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.007088>.

CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M.. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, [s.l.], v. 103, p.117-130, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020>.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A.. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, [s.l.], v. 42, n. 5, p.669-678, maio 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>.

DAWSON, C. J.; HILTON, J.. Fertiliser availability in a resource-limited world: Production and recycling of nitrogen and phosphorus. **Food Policy**, [s.l.], v. 36, p.14-22, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodpol.2010.11.012>.

DIAS-FILHO, M. B. **Degradação das pastagens: o que é e como evitar**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2017. 24p. (Embrapa Amazônia Oriental).

DIAS-FILHO, M. B. **Diagnóstico das Pastagens no Brasil**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2014. 36p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 402).

DU JARDIN, P.. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 196, p.3-14, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>.

GOSWAMI, D.; THAKKER, J. N.; DHANDHUKIA, P. C.. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. **Cogent Food & Agriculture**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.1-19, 19 jan. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [s.l.], v. 221, p.125-131, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2016.01.024>.

IEIRI, A. Y.; LANA, R. M. Q.; KORNDÖRFER, G. H.; PEREIRA, H. S. Fontes, doses e modos de aplicação de fósforo na recuperação de pastagem com brachiaria. **Ciência e Agrotecnologia**, [s.l.], v. 34, n. 5, p.1154-1160, out. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-70542010000500011>.

MARTHA JÚNIOR, G. B.; VILELA, L.. **Pastagem do Cerrado: Baixa produtividade pelo uso limitado de fertilizantes**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 32p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 50).

NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L.. (Eds.) **Fertilidade do Solo**. Viçosa: SBCS, 2007.1017 p.

OLIVEIRA, A. L. M., COSTA, K. D. R.; FERREIRA, D. C.; MILANI, K. M. L.; SANTOS, O. J. A. P.; SILVA, M. B.; ZULUAGA, M. Y. A.. Biodiversity of soil bacteria and its applications for a sustainable agriculture. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.56-77, 22 set. 2014. Universidade Estadual de Londrina. <http://dx.doi.org/10.5433/2316-5200.2014v3n1p56>.

PRIMAVESI, A. C.; PRIMAVESI, O.; CORRÊA, L. A.; SILVA, A. G.; CANTARELLA, H.. Nutrientes na fitomassa de capim-marandu em função de fontes e doses de nitrogênio. **Ciência e Agrotecnologia**, [s.l.], v. 30, n. 3, p.562-568, jun. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-70542006000300024>.

SANTOS, H. Q.; FONSECA, D. M.; CANTARUTTI, R. B.; ALVAREZ, V. H.; JÚNIOR, D. N.. Níveis críticos de fósforo no solo e na planta para gramíneas forrageiras tropicais, em diferentes idades. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.173-182, mar. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-06832002000100018>.

TEIXEIRA, F. A.; BONOMO, P.; PIRES, A. J. V.; SILVA, F. F.; FRIES, D. D.; HORA, D. S.. Produção anual e qualidade de pastagem de *Brachiaria decumbens* diferida e estratégias de adubação nitrogenada. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, [s.l.], v. 33, n. 3, p.241-248, 8 jun. 2011. Universidade Estadual de Maringá. <http://dx.doi.org/10.4025/actascianimsci.v33i3.10194>.

VOLF, M. R.; GUIMARÃES, T. M.; SCUDELETTI, D.; CRUZ, I. V., ROSOLEM, C. A.. Potassium dynamics in Ruzigrass rhizosphere. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s.l.], v. 42, p.1-12, 14 nov. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/18069657rbc20170370>.

CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE BIOFERTILIZANTE E BIOESTIMULANTE NO CRESCIMENTO DE DOIS GENÓTIPOS DE *Urochloa* spp CULTIVADOS EM SOLO DE PASTAGEM DEGRADADA

RESUMO

A pastagem em sistemas extensivos é a principal fonte de alimento do gado, sendo considerada a forma mais econômica e prática de produzir forrageira, garantindo baixo custo de produção. No entanto, o baixo investimento tecnológico e de insumos, ocasionam a degradação destas áreas, assim, a introdução de biotecnologias é um caminho promissor para sustentabilidade do setor pecuário. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes biotecnologias nos atributos fitotécnicos, nutricionais e fisiológicos em genótipos de *Urochloa* spp e seus efeitos sobre a atividade microbiológica do solo. O experimento foi realizado em casa de vegetação, em delineamento experimental de blocos casualizados, em um fatorial 2x2x5, em 4 repetições. Os fatores consistiram de dois manejos, agrupados de acordo com a adição de calcário e adubação (SCA – sem calagem e adubação; CCA – com calagem e adubação); dois genótipos de *Urochloa* spp: *U. brizantha* cv. Marandu e *U. decumbens* cv. Basilisk, associados a quatro biotecnologias mais a testemunha: 1) AzoTotal[®]; 2) Fungo micorrízico arbuscular (FMA); 3) Substâncias húmicas combinadas com estirpes *Herbaspirillum* spp: *H. rubrisubalbicans* - HCC 101 e *H. seropedicae* – HIV 206; 4) Coinoculação - AzoTotal[®] e FMA e 5) Testemunha sem inoculação. Aos 60 dias após emergência, foram avaliados os parâmetros: trocas gasosas, rendimento quântico do fotossistema II (Fv/F_M), teor de clorofila total (ICF), massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR), altura total das plantas, diâmetro do colmo, taxa de colonização de FMA, atividade microbiana no solo e acúmulos de N, P, K, Ca e Mg no tecido da parte aérea. As plantas cultivadas no manejo CCA demonstraram superioridade nos parâmetros fitotécnicos. No manejo CCA a maior MSPA foi obtida com aplicação de SH+*Herb.* spp. A aplicação de SH+*Herb.* spp. na presença de calagem e adubação revelou maiores acúmulos de N, P, K e Ca. A utilização de biotecnologias influenciou positivamente os parâmetros fisiológicos. A atividade microbiana foi mais intensa na ausência de calagem e adubação.

Palavras-chave: braquiária, bactérias promotoras de crescimento vegetal, fungo micorrízico, substâncias húmicas.

ABSTRACT

Pasture in extensive systems is the main source of livestock feed, being considered the most economical and practical way of producing forage, ensuring low production cost. However, the low technological and input investment, cause the degradation of these areas, thus, the introduction of biotechnologies is a promising path for the sustainability of the livestock sector. The aim of this work was to evaluate the effect of different biotechnologies on phytotechnical, nutritional and physiological attributes in *Urochloa* spp genotypes and their effects on soil microbiological activity. The experiment was carried out in a greenhouse, in a randomized block design, in a 2x2x5 factorial, in 4 repetitions. The factors consisted of two managements, grouped according to the addition of limestone and fertilization (SCA - without liming and fertilization; CCA - with liming and fertilization); two genotypes of *Urochloa* spp: *U. brizantha* cv. Marandu and *U. decumbens* cv. Basilisk, associated with four biotechnologies plus the witness: 1) AzoTotal[®]; 2) Arbuscular mycorrhizal fungus (AMF); 3) Humic substances combined with strains *Herbaspirillum* spp: *H. rubrisubalbicans* - HCC 101 and *H. seropedicae* - HIV 206; 4) Co-inoculation - AzoTotal[®] and FMA and 5) Control without inoculation. At 60 days after emergence, the parameters were evaluated: gas exchange, quantum yield of photosystem II (F_v/F_m), total chlorophyll content (ICF), dry mass of the aerial part (MSPA) and root (MSR), total height of the plants, stem diameter, AMF colonization rate, microbial activity in the soil and accumulations of N, P, K, Ca and Mg in the area tissue. Plants grown in CCA management showed superior phytotechnical parameters. In CCA management, the highest MSPA was obtained with the application of SH+*Herb.* spp. The application of SH+*Herb.* spp. in the presence of liming and fertilization, showed greater accumulations of N, P, K and Ca. The use of biotechnologies positively influenced the physiological parameters. The microbial activity was more intense in the absence of liming and fertilization.

Keywords: brachiaria, plant growth promoting bacteria, mycorrhizal fungus, humic substances.

1.0 – INTRODUÇÃO

O setor pecuário brasileiro, para alcançar os níveis atuais no mercado internacional de maior produtor e exportador de carne bovina (DIAS-FILHO, 2014), teve sua história marcada a partir da década de 60, com incentivo do governo brasileiro em sistemas extensivos de produção. Nesta época, dentro do pacote tecnológico apresentado estava a introdução de espécies forrageiras, a exemplo do gênero *Urochloa* (syn. *Brachiaria*) (BRAZ et al., 2004; MARTHA JÚNIOR; VILELA, 2002), por demonstrar elevado potencial produtivo.

Destacadas por possuírem boa adaptabilidade, tolerância a solos de baixa fertilidade e ácidos e bom valor forrageiro (GOMES, 2017), além de apresentar baixo custo de produção (DIAS-FILHO, 2014), as pastagens em sua maioria são constituídas por *Poaceae* do gênero *Urochloa* (SANTANA et al., 2016). Paralelo a esta expressiva área de cultivo, vieram os problemas com a degradação, principalmente em sistemas de baixo nível tecnológico, devido ao manejo inadequado destas pastagens e da rara utilização de insumos (BRAZ et al., 2004).

A degradação das pastagens é um processo de declínio de produtividade que avança com o tempo (DIAS-FILHO, 2017), diminuindo o vigor da forrageira, aumentando a incidência de plantas invasoras, pragas e doenças, comprometendo o desempenho animal e culminando na degradação do solo e recursos naturais (ZIMMER et al., 2012), em função da escolha incorreta da espécie forrageira, manejo inadequado, excessiva taxa de lotação e a baixa fertilidade dos solos, em associação com o uso limitado de corretivos e fertilizantes (MARTHA JÚNIOR; VILELA, 2002).

A possibilidade de sustentabilidade econômica de um sistema em que as pastagens estão degradadas é pequena e dependente principalmente de fatores econômicos, a exemplo da aquisição de insumos, tornando-se um problema para recuperação das pastagens (OLIVEIRA; CORSI, 2005). O fornecimento adequado de nutrientes, em especial nitrogênio e fósforo, é comprovadamente um dos fatores de destaque para explicar a manutenção adequada das pastagens (TEIXEIRA et al., 2018). No entanto, para sistemas de cultivo de baixo nível tecnológico, a aplicação de fertilizantes e corretivos não é realizada. Alternativas viáveis do ponto de vista ambiental e econômico, as biotecnologias são capazes de estimular o crescimento vegetal e incorporar nutrientes no sistema solo-planta, especialmente em condições de baixa fertilidade (HUNGRIA et al., 2013), tornando a prática sustentável.

Os efeitos promissores das bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) em poaceas vêm sendo documentados há vários anos, confirmando o potencial destes microrganismos. A exemplo da associação entre a forrageira e estirpes de *Azospirillum brasiliense* avaliadas como componente favorável ao meio ambiente na recuperação de pastagens degradadas, possibilitando ganho médio de produção de biomassa de 20%, quando aplicadas menores doses N-fertilizante combinado com *A. brasiliense*, proporcionando a equivalente adubação adicional de 40 kg ha⁻¹ de N-fertilizante (HUNGRIA et al., 2016; LEITE et al., 2019).

O potencial do uso de insumos biológicos na agricultura é demonstrado em diversos estudos. Destacam-se as substâncias húmicas, que são obtidas das transformações químicas e biológicas da matéria vegetal e animal e do metabolismo microbiano (DU JARDIN et al., 2015). As SH são capazes de reduzir as taxas de aplicação de fertilizantes, melhorar a eficiência do uso de nutrientes e aumentar a tolerância ao estresse hídrico, além de funcionar como portadoras para introduzir microrganismos benéficos em sistemas de cultivo (CANELLAS et al. 2015).

O efeito positivo da aplicação de SH no desenvolvimento das plantas foi relatado por Pinheiro et al., (2018) avaliando o efeito da aplicação de diferentes concentrações de ácidos húmicos e tempo de aplicação sob o *Urochloa decumbens*. Os autores observaram que a concentração de 40 mg L⁻¹ C, aplicados aos 15 dias após a emergência, promoveu aumento na produção de forragem.

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são simbioses obrigatórios, formando relação interdependente com a maioria das espécies de plantas terrestres (BERRUTI et al., 2016). A correlação entre planta hospedeira e FMA é baseada na disponibilidade de carboidrato pelas plantas, em contrapartida as micorrizas arbusculares proporcionam melhorias no crescimento dos vegetais, por meio do aumento substancial da absorção de nutrientes pelas plantas, a exemplo do fósforo, zinco e cobre (ORTAS; KAYA; ÇAKMAK, 2001; TAMAYO et al., 2014), que apresentam baixa difusão no solo.

Além do suprimento considerável de nutrientes, as interações de FMA promovem aumento no volume de solo explorado, permitindo maior tolerância a estresses bióticos e abióticos (POZO; AZCÓN-AGUILAR, 2007; PORCEL et al., 2011). Possibilita também maior estabilidade dos agregados do solo (LEIFHEIT et al., 2013). Ademais, os FMA contribuem para o armazenamento do carbono e nitrogênio no solo, o que favorece o processo de recuperação de áreas degradadas (FOKOM et al., 2012). A

abundância de FMA possibilita o crescimento de bactérias diazotróficas no solo (LIANG et al., 2016). Entretanto, os benefícios finais desta interação podem variar entre plantas hospedeiras e espécies de FMA (CHEN et al., 2017).

Existem vários estudos demonstrando o sinergismo entre bactérias e FMA (ARTURSSON et al., 2006; RAMASAMY et al., 2011), que favorece a absorção de P pelas plantas, e proporciona melhores condições de associação e atuação das bactérias diazotróficas, no qual demandam alto gasto energético, que é fornecido pelo vegetal como ATP, para conversão do N_2 a NH_3 . Além do aporte nutricional proporcionado pelos FMA às plantas, respostas positivas na microbiota do solo mediadas pela presença de FMA também foram relatadas, devido a melhora na estabilidade dos agregados, permitindo maior ocupação por bactérias entre os espaços porosos, aumentando a sobrevivência de rizobactérias (ANDRADE et al., 1998), a exemplo das bactérias do gênero *Azospirillum*, capazes de contribuir com inúmeros benefícios para as plantas (GUIMARÃES et al., 2018).

Sendo assim, torna-se importante conhecer os efeitos da interação dos microrganismos e da substância húmica em genótipos de *Urochloa* spp sobre diferentes níveis de fertilidade do solo, avaliando além dos parâmetros fitotécnicos, nutricionais, e fisiológicos sobre as forrageiras, mas também, efeitos sobre a atividade microbiológica do solo. Como hipótese do presente trabalho, acredita-se que a utilização de estirpes de BPCV, FMA e aplicação de SH em forrageiras, atende à necessidade parcial de N e P, permitindo um maior desenvolvimento das plantas, conseqüentemente, um melhor potencial produtivo.

2.0 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Caracterização física e química do solo

O solo utilizado foi representativo de uma área de pastagem degradada na região de Jerônimo Monteiro-ES, sendo retirado do terço médio do relevo, na profundidade de 0-20 cm, classificado regionalmente como Argissolo vermelho-amarelo distrófico (CUNHA et al. 2016). Posteriormente, o solo foi seco ao ar e peneirado em peneira com malha de 2,0 mm para obtenção da terra fina seca ao ar (TFSA) e caracterização física e química (Tabela 1).

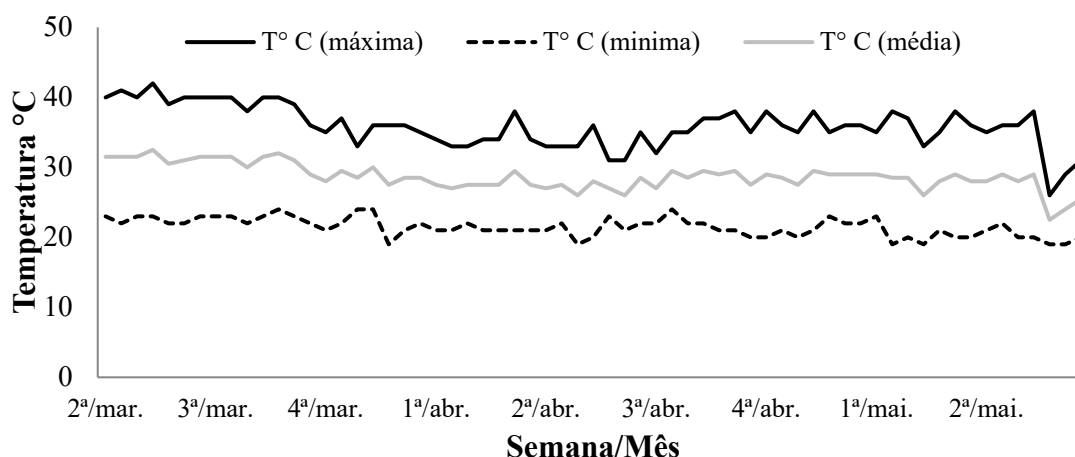
Tabela 1: Caracterização física e química do solo utilizado no experimento em casa de vegetação

| pH em H ₂ O | pH em KCl | P | K | Ca | Mg | Al | H | H+Al | SB | T | t | |
|------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------------|------|-----------------------------------|-------|-------------|------|------|-------|-------|--------|
| 4,10 | 3,88 | --mg dm ⁻³ -- | | | -----cmolc dm ⁻³ ----- | | | | | | | |
| V | m | MO | P-rem | S | B | Fe | Cu | Mn | Zn | Areia | Silte | Argila |
| -----%----- | g kg ⁻¹ | mgL ⁻¹ | -----mg dm ⁻³ ----- | | | | -----%----- | | | | | |
| 6,46 | 67,8 | 7,4 | 26,28 | 24,8 | 0,55 | 48,73 | 0,15 | 1,74 | 0,66 | 54,36 | 2,96 | 42,68 |

pH em água: potenciometria em solução solo-água 1:2,5; fósforo e potássio disponível: extraído por Mehlich-1; cálcio, magnésio e alumínio extraível: extraídos com solução de KCl 1 mol L⁻¹; SB = Ca + Mg + K; CTC = SB + (H + Al); V% = SB x 100/CTC; MO: teor de C do solo x 1,724.

2.2 – Experimentação em casa de vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no período de março a maio de 2019, localizada na área experimental do Centro de Ciências Agrárias de Alegre, pertencente a Universidade Federal do Espírito Santo (latitude 20° 45' Sul, longitude 41° 29' Oeste, com elevação de 112 metros). De acordo com o Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural a precipitação pluviométrica é de 1.200mm/ano e o clima da região é quente úmido. Segundo a Classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Aw, clima tropical, caracterizado pelo inverno seco e verão chuvoso. Diariamente foram registrados os valores de temperatura máxima e mínima no interior da casa de vegetação (Tabela 2).

Tabela 2: Registro diário de temperatura no interior da casa de vegetação no decorrer do experimento.

O delineamento experimental foi de blocos casualizados com fatorial 2x2x5, com 4 repetições. Os fatores consistiram em 2 manejos, agrupados de acordo com calagem e

adubação (SCA – sem calagem e adubação; CCA – com calagem e adubação), 2 genótipos de *Urochloa* spp: *U. brizantha* cv. Marandu e *U. decumbens* cv. Basilisk, selecionados previamente, com base na eficiência de produção de biomassa e contribuição do sistema de fixação biológica de nitrogênio (GOMES, 2017). Para biotecnologias os tratamentos consistiram: 1) Inoculação via semente com produto comercial líquido AzoTotal[®], a base de *Azospirillum brasilense*, estirpes AbV5 e AbV6; 2) Inoculação via solo com fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Dentiscutata heterogama* (T.H. Nicolson & Gerd.) Sieverd., F.A. Souza & Oehl (2008) (CNPAB 002) (COSTA et al., 2012); 3) Aplicação foliar com substâncias húmicas (SH) (dose 40 mg L⁻¹ C) extraídas de vermicomposto combinadas com estirpes (*Herbaspirillum rubrisubalbicans* - HCC 101 e *Herbaspirillum seropedicae* – HIV 206), sendo realizada a pulverização aos 20 e 40 dias após emergência; 4) Coinoculação - AzoTotal[®] e FMA em que no momento foi realizada de forma similar aos tratamentos 1 e 2; e 5) Testemunha sem inoculação.

No manejo CCA (com calagem e adubação) as unidades experimentais receberam calagem determinada pelo método da saturação por bases, para elevar o valor V a 50%, utilizando-se o produto comercial GEOX HD (PRNT = 134%) e, incubado por 21 dias em sacos plásticos. Durante a reação do GEOX no solo, a umidade foi mantida a 60% do volume total de poros (VTP).

Transcorrido o período de incubação do solo, foi realizada a adubação de implantação com macro e micronutrientes. As doses de nitrogênio, fósforo, potássio e enxofre utilizadas foram de 40, 120, 60 e 40 mg dm⁻³, respectivamente, em que N, P e K correspondem a 40% do recomendado por Novais et al. (1991). Para adubação com micronutrientes, foram aplicadas as doses de 0,81 mg dm⁻³ B; 1,33 mg dm⁻³ Cu; 1,55 mg dm⁻³ Fe; 3,66 mg dm⁻³ Mn; 0,15 mg dm⁻³ Mo e 4,00 mg dm⁻³ Zn (NOVAIS et al., 1991), sendo utilizados para fornecimento de macro e micronutrientes os seguintes reagentes pa: CH₄N₂O; NH₄H₂PO₄; KH₂PO₄; CaHPO₄; KCl; (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; H₃BO₃; CuSO₄.5H₂O; MnSO₄.H₂O; Na₂SO₄; (NH₄)₂Fe(SO₄)₂.6H₂O; ZnSO₄.7H₂O. A adubação nitrogenada foi parcelada em duas vezes, sendo aplicada aos 20 e 40 dias após emergência (DAE). A umidade do solo foi mantida em 60% do volume total de poros (VTP).

2.3 – Obtenção e inoculação de BPCV e FMA

Inicialmente, as sementes foram desinfestadas superficialmente com álcool etílico a 70% v/v por 1 min e hipoclorito de sódio a 2% por 20 min. Em seguida foram lavadas 10 vezes com água deionizada, para retirada de resíduos dos tratamentos anteriores (HUNGRIA et al., 2010). Para inoculação do AzoTotal[®] a base de estirpes de *Azospirillum brasiliense* – AbV5 e AbV6, foram utilizados 15 mL kg⁻¹ de semente, conforme recomendação do fabricante, objetivando a população mínima de 2×10^8 células por mL de inoculante. A inoculação das sementes foi realizada misturando o inoculante com as sementes e deixando-as secar na sombra por 15 minutos. Posteriormente, foi realizado plantio em bandeja de 128 células, sendo semeadas 3 sementes de cada genótipo por célula. Após 10 dias de emergência foram transplantadas 10 mudas para cada vaso definitivo com capacidade de 5 dm³, sendo realizado o desbaste aos 15 DAE, selecionando 8 plantas por vaso, que apresentavam melhor homogeneidade, vigor e tamanho.

Para os tratamentos onde foram realizadas a inoculação com FMA isoladamente ou coinoculado, as micorrizas arbusculares foram inoculadas no momento do transplante das mudas, sendo colocados a 5 cm abaixo do nível de transplante, cerca de 4,35 g de inóculo/vaso (solo+esporos+raízes) de *Dentiscutata heterogama* (T.H. Nicolson & Gerd.) Sieverd., F.A. Souza & Oehl (2008), conforme recomendado pela Embrapa Agrobiologia. Nos tratamentos sem inóculo, foram colocados 4,35 g de solo-inóculo autoclavado, visando à padronização entre os tratamentos, conforme metodologia de Miranda et al. (2008).

2.4 – Extração e aplicação de substâncias húmicas conjuntamente com *Herbaspirillum* spp

As substâncias húmicas foram isoladas de vermicomposto, sendo utilizados 200 g de vermicomposto (Tabela 3) e 1,8 L de água deionizada (relação vermicomposto: solvente de 1:9). O material foi agitado por um período de 6 horas, e após 12 horas de repouso o extrato solúvel foi retirado por decantação e armazenado. Posteriormente, foi determinado o teor de carbono (C) das substâncias húmicas, com base na metodologia adaptada de Mendonça; Matos (2005).

As estirpes de HIV206 e HCC101 foram obtidas na coleção do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Darcy Ribeiro. Para atingir a densidade ótica da suspensão de células bacterianas (10^8) por

mL, conforme descrito por Döbereiner et al., (1995), foi necessário o crescimento das bactérias em meio líquido DYGS por 24 h a 30° C sob agitação a 180 rpm. De acordo com a metodologia de Canellas et al., (2012), o inoculante a base de *Herbaspirillum* spp foi preparado diluindo 200 mL de bactérias em 800 mL (água + substâncias húmicas) a pH 7,0, ajustado com hidróxido de sódio, de modo a obter concentração final de 40 mg L⁻¹ de C das SH. Para pulverização foliar aos 20 e 40 dias após emergência das plantas foi aplicada a concentração de 40 mg L⁻¹ de C das SH conforme descrito por Pinheiro et al. (2018), juntamente com 10⁸ células mL⁻¹ das estirpes HIV206 e HCC101.

A primeira aplicação da combinação SH + *Herbaspirillum* spp foi realizada aos 20 DAE, em que a temperatura máxima e mínima diária encontravam-se a 40° C e 24° C, respectivamente. A aplicação foi realizada entre às 18 e 19 h, pulverizando 12 mL vaso⁻¹ com auxílio de um pulverizador manual de pressão com bico regulável, correspondendo a 1,5 mL planta⁻¹. Transcorrido 40 DAE, foi realizada a segunda aplicação da combinação SH + *Herbaspirillum* spp, acompanhando o mesmo horário da 1ª aplicação. No decorrer do dia a temperatura máxima e mínima diária encontravam-se a 31° C e 23° C, respectivamente. Utilizando o mesmo equipamento de aplicação, foi aplicado 24 mL vaso⁻¹, correspondendo a 3,0 mL planta⁻¹. Para ambas as aplicações, objetivando a padronização da umidade na superfície da folha, foram realizadas aplicações com mesmo volume em água nos demais tratamentos.

Tabela 3: Composição média do vermicomposto usado na extração de substâncias húmicas.

| pH | C | P | K ⁺ | Ca ²⁺ | Mg ²⁺ | Al ³⁺ | H+Al | SB | CTC |
|------|--------------------|---------------------|---|------------------|------------------|------------------|------|-------|-------|
| | g kg ⁻¹ | mg dm ⁻³ | -----cmol _c dm ⁻³ ----- | | | | | | |
| 6,29 | 60,4 | 987,50 | 2,57 | 7,71 | 8,25 | 0,0 | 1,80 | 18,52 | 20,32 |

pH em H₂O; SB: soma de bases trocáveis; CTC: capacidade de troca de cátions.

2.5 – Avaliação dos atributos fisiológicos, fitotécnicos e nutricional

Aos 60 dias após a emergência foram analisadas medidas de trocas gasosas, rendimento quântico do fotossistema II, teor de clorofila total (Índice de Clorofila Falker), produção de massa seca da parte aérea e raiz, altura total das plantas, diâmetro do colmo, acúmulo de nutrientes na parte aérea, taxa de colonização de FMA e atividade microbiana no solo.

2.5.1 – Trocas gasosas

A medição das trocas gasosas foi realizada na folha totalmente expandida, em duas plantas de cada um dos quatro vasos, em cada tratamento, entre 7:30 e 11:30 horas, por meio do analisador a gás infravermelho portátil (IRGA), modelo LI 6400 XT Portable Photosynthesis System (LI-COR, Lincoln, NE, USA), utilizando uma fonte luminosa fixa em $1000 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidade de fluxo de fótons fotossintéticos. Foram obtidas as seguintes variáveis: A – Taxa de assimilação líquida de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); E – Taxa de transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); g_s – Condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); C_i – Concentração interna de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$). De posse desses dados foi quantificada a eficiência no uso da água (EUA) (A/E) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} / \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (KONRAD, et al., 2005).

2.5.2 – Teor total de clorofila e rendimento quântico do fotossistema II (PSII)

A estimativa do teor de clorofila, através do índice de clorofila falker (ICF), foi realizada no terço mediano da folha totalmente expandida, em duas plantas de cada um dos quatro vasos, em cada tratamento, por meio do medidor portátil de clorofila, ClorofiLOG (Falker Automação Agrícola, Brasil), entre 8:00 e 11:00 horas.

A determinação do rendimento quântico do fotossistema II – PSII - (F_v/F_m) foi quantificada com utilização de fluorômetro portátil de luz modulada (PSI FluorPen, modelo FP 100, Drasov, República Checa), após adaptação das folhas ao escuro por 15 minutos. As medições foram realizadas no mesmo horário e mesmas folhas, nas quais realizou-se a leitura do teor de clorofila.

2.5.3 – Massa seca, altura das plantas e diâmetro do colmo

A determinação da altura total das plantas foi realizada com régua graduada. Para a determinação do diâmetro do colmo foi utilizado um paquímetro digital. Em ambas as avaliações utilizaram-se quatro plantas de cada um dos quatro vasos, em cada tratamento, ao final do experimento.

A parte aérea e a raiz foram coletadas, armazenadas em sacos de papel e colocadas em estufa a 65° C durante 72 horas (até atingir peso constante) para determinação da massa seca.

2.5.4 – Análise nutricional

Após a secagem em estufa da parte aérea e raiz, as amostras foram submetidas à trituração em moinho de facas para posterior determinação dos teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg).

A análise química do N foi realizada por digestão sulfúrica seguida de destilação Kjeldahl, de acordo com Embrapa (2000). Para análise química foliar de P, K, Ca e Mg foi realizada digestão nítrica. A leitura do P foi realizada por espectrofotômetro a 725 nm; K por fotômetro de chama e as leituras de Ca e Mg por espectroscopia de absorção atômica, de acordo com Johnson e Ulrich, (1959) e Malavolta et al. (1997).

2.5 – Avaliação de parâmetro microbiológico

2.5.1 – Taxa de colonização micorrízica

A taxa de colonização micorrízica foi determinada pela avaliação da presença ou ausência de colonização em 10 segmentos de raízes, por repetição, com aproximadamente 1 cm de comprimento, montados em lâminas para microscopia.

As amostras de raízes obtidas foram coletadas, lavadas com água corrente e as raízes finas foram cortadas e armazenadas em álcool etílico 50% para a avaliação sequencial da porcentagem de colonização micorrízica. A coloração das raízes em azul de tripano foi efetuada de acordo com a metodologia descrita por Grace e Stribley (1991), adaptada com KOH (5%) a 70° C por 5 minutos em banho-maria para clarificação. Depois, o material foi lavado em água corrente e deixado em HCl por 5 min, em seguida transferido para o corante azul de tripano em banho-maria a 70° C por 10 min. Após a coloração com azul de tripano, 10 segmentos de raízes foram depositados, com o auxílio de uma pinça, sobre lâminas, onde foram adicionadas algumas gotas de glicerol ácido sobre as raízes, sendo posteriormente cobertas por uma lamínula. Para determinar a porcentagem de colonização micorrízica, os segmentos de raízes foram levados ao microscópio óptico para a observação da presença de estruturas de FMA.

2.5.2 – FDA - Hidrólise de diacetato de fluoresceína

A atividade microbiana foi identificada a partir da atividade do diacetato de fluoresceína (FDA) no solo. O FDA foi dissolvido em acetona, para a obtenção da solução estoque $1,0 \text{ g L}^{-1}$. Para demonstração da atividade microbiana foram pesados 0,5 g de solo de cada amostra, ao qual foi acrescentado 6 mL de tampão fosfato 50 mM pH 7,6 autoclavado e 120 μL da solução de FDA. A amostra foi incubada por 1 hora, em shaker rotativo 180 rpm a 32° C ao abrigo da luz, em tubo Falcon de 15 mL. O controle negativo foi obtido a partir de 0,5 g de solo autoclavado e deixado nas mesmas condições descritas acima. Após este período, o material foi centrifugado a 5000 rpm por 20 min, uma alíquota de 200 μL do sobrenadante foi retirada da amostra e distribuída em placas de 96 poços em triplicata. Posteriormente, foi realizada a leitura no espectrofotômetro *Hidex Chameleon Multilabel Detection Platform* com absorvância de 492 nm pelo programa *MikroWin 2000*.

2.6 – Análises estatísticas

Os dados foram analisados quanto a sua normalidade e homogeneidade de variância, em seguida foram feitas análises de variância e o teste Tukey em 5% de probabilidade para separação das médias pelo programa R (ExpDes) (R Development Core Team, 2016). Para confecção dos gráficos utilizou-se o software SigmaPlot® versão 10 (SYSTAT SOFTWARE Inc, 2006).

3.0 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 – Atributos fitotécnicos

Na Tabela 4, são apresentados os valores de F obtidos na análise de variância dos parâmetros fitotécnicos em função do manejo e biotecnologias empregadas em dois genótipos de *Urochloa* spp. Houve interação entre as diferentes combinações de fatores: manejo (M), genótipo (G) e biotecnologia (B). Para as variáveis - altura de planta (AP), diâmetro do colmo (DC) e massa seca de raiz (MSR). Houve interação fortemente significativa entre MxG ($p \leq 0,01$), indicando que os genótipos respondem de forma diferenciada ao manejo.

A interação GxB foi significativa ($p \leq 0,05$) no parâmetro AP. O efeito simples da biotecnologia foi observado na variável DC ($p \leq 0,01$), diferentemente da MSR em que

não houve efeito significativo ($p > 0,05$). Efeito significativo da interação MxB ($p \leq 0,05$) foi observado na massa seca da parte aérea (MSPA), mostrando que o comportamento das biotecnologias depende do manejo. Analisando de forma simples o fator genótipo, não houve significância ($p > 0,05$) para MSPA.

Tabela 4: Valores de F, níveis de significância, coeficientes de variação e médias dos parâmetros fitotécnicos: altura de planta (AP), diâmetro do colmo (DC), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) em função do manejo, genótipo e biotecnologias.

| Fonte Variação | AP | DC | MSPA | MSR |
|------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| Bloco | 2,81* | 2,52 ^{ns} | 4,59** | 5,43** |
| Man. (M) | 6431,3** | 1934,0** | 10122,2** | 3631,0** |
| Gen. (G) | 216,0** | 1152,9** | 2,37 ^{ns} | 114,0** |
| Biot. (B) | 5,05** | 4,12** | 3,34* | 2,14 ^{ns} |
| M*G | 27,1** | 447,5** | 0,88 ^{ns} | 104,31** |
| M*B | 0,71 ^{ns} | 0,667 ^{ns} | 2,53* | 2,05 ^{ns} |
| G*B | 2,76* | 1,98 ^{ns} | 0,30 ^{ns} | 1,67 ^{ns} |
| M*G*B | 1,51 ^{ns} | 1,89 ^{ns} | 0,24 ^{ns} | 1,53 ^{ns} |
| Média | 66,28 | 1,99 | 20,25 | 7,97 |
| CV (%) | 12,87 | 84,12 | 13,07 | 17,73 |

Man.: Manejo; Gen.: Genótipo; Biot.: Biotecnologia. Significativo pelo teste F: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: não significativo.

Independente do genótipo e da biotecnologia empregada, as plantas cultivadas no manejo com calagem e adubação (CCA) demonstraram superioridade significativa ($p \leq 0,01$) nas médias dos parâmetros fitotécnicos. Esses resultados já eram esperados, haja vista que a calagem e adubação são fundamentais para recuperação de pastagens degradadas em solos ácidos e de baixa fertilidade.

No desdobramento da interação MxG, independente do manejo empregado, a altura das plantas cv. Marandu demonstrou ser superior a cv. Basilisk (Tabela 5). De forma semelhante, na interação GxB observou-se o mesmo comportamento do genótipo *U. brizantha* cv. Marandu. Analisando a influência das biotecnologias dentro de cada nível dos genótipos, de modo geral, constatou-se efeito positivo das biotecnologias com incremento médio de 5,22% (cv. Marandu) e 10,48% (cv. Basilisk) em relação ao controle (sem inoculação), embora para cv. Marandu não seja observado diferença entre as médias, ao passo que na cv. Basilisk os melhores resultados tenham ocorrido nas plantas inoculadas conjuntamente com AzoTotal[®] e FMA.

Tabela 5: Média dos valores de altura de planta (cm) em genótipo de *Urochloa brizantha* cv. Marandu e *Urochloa decumbens* cv. Basilisk, com e sem calagem e adubação, cultivadas com diferentes biotecnologias.

| Manejos* | Genótipos | |
|-------------------------|-------------|--------------|
| | cv. Marandu | cv. Basilisk |
| SCA | 33,82 Ab | 25,11 Bb |
| CCA | 112,23 Aa | 93,95 Ba |
| Biotecnologias** | | |
| AzoTotal [©] | 74,82 Aa | 59,49 Babc |
| FMA | 72,53 Aa | 61,19 Bab |
| SH+Herb. spp | 74,69 Aa | 57,65 Bbc |
| Co-inoculação | 73,04 Aa | 64,39 Ba |
| Testemunha | 70,09 Aa | 54,92 Bc |

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula entre genótipos e minúscula entre manejos, não diferem entre si, pelo teste Tukey para $p \leq 0,05$.

**Médias seguidas da mesma letra maiúscula entre genótipos e minúscula entre biotecnologias, não diferem entre si, pelo teste Tukey para $p \leq 0,05$.

A altura das plantas foi similar ao observado no estudo de Martuscello et al. (2009), em que obtiveram na cv. Marandu (86,70 cm) em relação à cv. Basilisk (65,06 cm). Nota-se que a menor AP da cv. Basilisk provavelmente está relacionada ao hábito de crescimento das cultivares. Plantas decumbentes geralmente apresentam menores alturas comparadas às plantas cespitosas, quando conduzidas sob o mesmo manejo (MARTUSCELLO et al., 2009). O comportamento das biotecnologias sobre as cultivares demonstra que a expressão da potencialidade do inóculo está fortemente relacionada com a interação planta-microrganismo.

A produtividade de massa seca apresenta forte relação com altura das plantas, sendo uma forma simples de estimar a disponibilidade de forragem (COSTA et al., 2004). Neste sentido, o uso de microrganismos promotores de crescimento vegetal e substâncias húmicas, além das melhorias no aporte nutricional, auxilia no estímulo ao crescimento vegetal (JÚNIOR et al., 2008).

Apesar de não ser observada diferença significativa entre os genótipos, a maior produção de MSPA foi obtida na cv. Marandu. O valor médio da MSPA, obtido no cv. Marandu (20,549 g vaso⁻¹) e cv. Basilisk (19,949 g vaso⁻¹) foi próximo ao obtido por Silva et al. (2016), que relataram maiores respostas da cv. Basilisk (21,49 g vaso⁻¹) enquanto a cv. Marandu (17,75 g vaso⁻¹), porém, o comportamento das cultivares difere entre os trabalhos.

Na omissão de calagem e adubação, não houve diferença significativa entre as médias das biotecnologias, embora a utilização das biotecnologias tenha possibilitado incremento médio de 48,11% comparado à testemunha (0,494 g vaso⁻¹).

De modo geral, no manejo CCA as biotecnologias demonstraram as médias superiores ao controle. A maior produção de MSPA foi obtida com a biotecnologia - SH+*Herb. spp* (42,077 g vaso⁻¹), seguida da coinoculação (39,979 g vaso⁻¹) e FMA (39,964 g vaso⁻¹) (Figura 1a). A expressão da potencialidade dos inóculos está diretamente relacionada à melhoria dos atributos químicos do solo, refletindo positivamente no desenvolvimento vegetal, neste caso, acúmulo de massa seca de parte aérea.

A ação benéfica do conjunto substâncias húmicas (SH) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) vem sendo observada em outras culturas - alface (MEIRELLES; BALDOTTO; BALDOTTO, 2017); cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2018) e; milho (MELO et al., 2018).

O aumento na MSPA no tratamento com SH+*Herb. spp*, é atribuído ao efeito bioestimulante vegetal semelhantes a hormônios ou das alcaloides ligadas à bioatividade da SH e do estímulo da H⁺-ATPases da membrana plasmática, no qual há maior permeabilidade da parede celular e estímulo da atividade microbiana (ZANDONADI et al., 2019). Ademais, a inoculação da *Herbaspirillum spp.* capaz de colonizar o tecido vascular em folhas, favorece a boa localização para fixação do N₂ e produção de fitormônios (JAMES et al., 1997; CANELLAS, OLIVARES et al., 2014).

O efeito da interação manejo e genótipo para parâmetro MSR (Figura 1b), revelou que a prática de calagem e adubação em ambas as cultivares elevou cerca de 46 vezes a produção de MSR, comparado ao tratamento SCA. Esses efeitos podem ser explicados pela redução da espécie de alumínio de maior fitotoxicidade em razão da prática de calagem, associada à adubação, favorecendo o crescimento radicular, a absorção de água e nutrientes (PRIMAVESI et al., 2004).

Na ausência de calagem e adubação, não se observou diferença significativa entre os genótipos, embora cv. Marandu (0,393 g vaso⁻¹) tenha apresentado superioridade na produção de MSR 1,42 vezes em relação à cv. Basilisk. A maior MSR, no manejo CCA foi observada na cv. Marandu (18,26 g vaso⁻¹), diferindo estatisticamente do tratamento cv. Basilisk (12,66 g vaso⁻¹). Martuscello et al. (2009) observaram valor médio de MSR - 15,44 e 11,43 g vaso⁻¹ nas cv. Marandu e Basilisk, respectivamente. De forma similar

Rao et al. (1996) relataram 16,2 g vaso⁻¹ cv. Marandu e 10,2 g vaso⁻¹ cv. Basilisk na média da MSR.

Há uma correlação entre parte aérea e raiz, em que o aumento do crescimento radicular está interligado ao balanço de açúcar da planta. Normalmente, a maioria do carboidrato acumulado pela parte aérea é utilizado para crescimento e brotações, sendo direcionado em menor quantidade para as raízes (BROUWER, 1962). Desta forma, a maior taxa de perfilhamento da cv. Basilisk, cerca de 46,73% superior a cv. Marandu (dados não apresentados) possibilita inferir que os perfilhos atuaram como maior dreno de carboidrato, limitando seu suprimento nas raízes, demonstrando um possível equilíbrio funcional entre perfilhamento e crescimento radicular, justificando a menor produção de MSR pela cv. Basilisk.

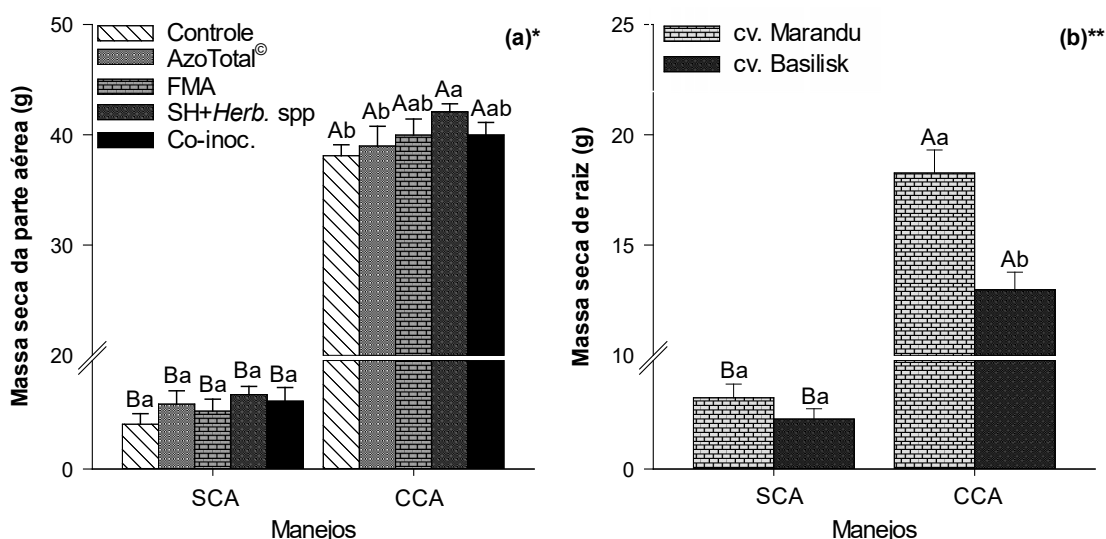


Figura 1: Massa seca de parte aérea (a), massa seca de raiz (b) de *Urochloa* spp aos 60 dias após emergência. SCA: sem calagem e adubação; CCA: com calagem e adubação; AzoTotal[®]: *Azospirillum brasilense*; FMA: *Dentiscutata heterogama*; SH+Herb. spp: substâncias húmicas – 40 mg L⁻¹ C juntamente com estirpes de *Herbaspirillum* spp); Co-inoc.: coinoculação.

* Médias ± erro padrão seguidas da mesma letra maiúscula entre manejos e minúscula entre biotecnologias, não diferem entre si, pelo teste de Tukey para $p \leq 0,05$.

** Médias ± erro padrão seguidas da mesma letra maiúscula entre manejos e minúscula entre genótipos, não diferem entre si, pelo teste de Tukey para $p \leq 0,05$.

3.2 – Atributos nutricionais

As médias dos teores de macronutrientes N (nitrogênio), P (fósforo), K (potássio), Ca (cálcio) e Mg (magnésio) na parte aérea dos genótipos de *Urochloa* spp, revelaram

que os maiores teores de N e K foram observados no manejo SCA. De modo geral, independente do manejo utilizado, as biotecnologias influenciaram de forma positiva no teor de nutrientes na parte aérea da braquiária.

Na ausência de calagem e adubação as médias dos teores de nutrientes na parte aérea da cv. Marandu foram: N (25,79 g kg⁻¹); P (0,33 g kg⁻¹); K (30,53 g kg⁻¹); Ca (1,55 g kg⁻¹) e Mg (2,21 g kg⁻¹), ao passo que na cv. Basilisk observaram valores: N (21,65 g kg⁻¹); P (0,23 g kg⁻¹); K (25,45 g kg⁻¹); Ca (1,68 g kg⁻¹) e Mg (2,32 g kg⁻¹). Os maiores teores dos macronutrientes foram observados na cv. Marandu, exceto Ca e Mg. Ao realizar a prática de calagem e adubação, observaram teores médios de nutrientes na cv. Marandu - N (6,45 g kg⁻¹); P (0,94 g kg⁻¹); K (12,22 g kg⁻¹); Ca (2,92 g kg⁻¹) e Mg (3,32 g kg⁻¹). Para a cv. Basilisk foram observados os seguintes valores médios: N (7,77 g kg⁻¹); P (0,67 g kg⁻¹); K (13,43 g kg⁻¹); Ca (2,83 g kg⁻¹) e Mg (3,04 g kg⁻¹).

Os resultados obtidos dos teores foliares de N, P, K, Ca e Mg nos genótipos de *Urochloa* spp. foram comparados às faixas adequadas de nutrientes para cultura relatadas por Werner et al., (1996) e Oliveira et al., (2007), sendo eles: N (12 a 20 g kg⁻¹); P (0,8 a 3,0 g kg⁻¹); K (12 a 25 g kg⁻¹); Ca (2 a 6 g kg⁻¹) e Mg (1,5 a 4 g kg⁻¹). Na análise geral do estado nutricional das cultivares verificou-se que os teores de P e Ca, tanto da cv. Marandu quanto da cv. Basilisk mostraram-se abaixo do nível adequado no manejo sem calagem e adubação, enquanto que no manejo CCA os teores de N encontram-se abaixo do nível considerado adequado para cultura, ademais, na cv. Basilisk observou teor de P inferior a faixas adequadas.

As variações observadas neste trabalho decorrem da ausência de calagem e adubação no manejo SCA e, para os tratamentos no manejo CCA decorrem da redução de 60% na dose de N, P e K, sendo que os demais nutrientes foram fornecidos na dose recomendada. Provavelmente, a redução nos teores de N, P e K mesmo com aplicação destes nutrientes, embora em menores doses, está relacionada ao efeito diluição com aumento na produção de forragem. Outra provável hipótese para a redução dos teores destes nutrientes está associada à diminuição na dose de P, conforme relatado por Costa et al. (2004b), uma vez que o fósforo é um dos nutrientes mais limitantes à produção de forragem, com reflexos negativos nos teores e quantidades acumuladas de N e P.

Na Tabela 6, são apresentados os valores de F decorrentes da análise de variância do acúmulo de nutrientes: N, P, K, Ca e Mg na parte aérea de dois genótipos de *Urochloa* spp (cv. Marandu e cv. Basilisk), bem como as médias dos níveis de cada fator, nível de significância e o coeficiente de variação.

Tabela 6: Valores de F, níveis de significância, coeficientes de variação e médias do acúmulo de nutrientes na parte aérea de *Urochloa* spp: nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em função do manejo, genótipo e biotecnologias.

| Fonte Variação | N | P | K | Ca | Mg |
|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Bloco | 3,42* | 2,28 ^{ns} | 6,03** | 3,90* | 1,52 ^{ns} |
| Man. (M) | 5426,02** | 3496,34** | 9994,49** | 10131,81** | 11048,38** |
| Gen. (G) | 2,07 ^{ns} | 120,13** | 1,64 ^{ns} | 7,49** | 19,20** |
| Biot. (B) | 9,76** | 14,42** | 8,80** | 7,13** | 7,66** |
| M*G | 53,19** | 114,22** | 31,31** | 2,27 ^{ns} | 0,008 ^{ns} |
| M*B | 3,88** | 14,02** | 5,03** | 5,63** | 1,13 ^{ns} |
| G*B | 0,77 ^{ns} | 2,34 ^{ns} | 0,17 ^{ns} | 1,13 ^{ns} | 0,33 ^{ns} |
| M*G*B | 0,56 ^{ns} | 2,28 ^{ns} | 0,75 ^{ns} | 1,01 ^{ns} | 0,23 ^{ns} |
| Média | 152,31 | 16,98 | 266,69 | 58,57 | 67,29 |
| CV (%) | 18,84 | 14,42 | 12,67 | 23,08 | 17,73 |

Man.: Manejo; Gen.: Genótipo; Biot.: Biotecnologia. Significativo pelo teste F: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: não significativo.

Houve interação do manejo x genótipo fortemente significativa ($p \leq 0,01$) para os macronutrientes avaliados, exceto para o acúmulo Ca e Mg. Para a interação manejo x biotecnologia, constatou-se efeito significativo ($p \leq 0,01$) no acúmulo de N, K e Ca, para acúmulo de P ($p \leq 0,05$). Quanto ao acúmulo de Mg, não se observou significância nas diferentes interações.

Efeito simples dos fatores manejo, genótipo e biotecnologia foi observado no acúmulo de Mg ($p \leq 0,01$), bem como para o acúmulo de Ca no fator genótipo ($p \leq 0,01$). Os maiores acúmulos de nutrientes foram verificados nas plantas submetidas ao manejo CCA, demonstrando que, independente do genótipo e da biotecnologia, houve aumento da absorção do nutriente.

Analisando o efeito do manejo sobre os genótipos, nota-se que os maiores acúmulos dos macronutrientes avaliados foram observados nas plantas cultivadas com calagem e adubação. Na omissão de calagem e adubação, a cv. Marandu foi superior no acúmulo de N, P e K cerca de 2,0 vezes, comparada a cv. Basilisk, demonstrando a maior eficiência na aquisição de nitrogênio, potássio e fósforo mesmo em condições limitadas de nutrientes no solo.

As taxas de absorção de nutrientes podem ser reguladas por um controle no tipo ou na atividade do transportador, logo o acúmulo de nutrientes é afetado pela disponibilidade dos elementos e o tipo de transporte, influenciando diretamente a taxa

de absorção (CARVALHO et al., 2007). Ademais, a cinética de absorção de nutrientes pode variar entre espécies ou até mesmo entre cultivares (PEREIRA et al., 2008).

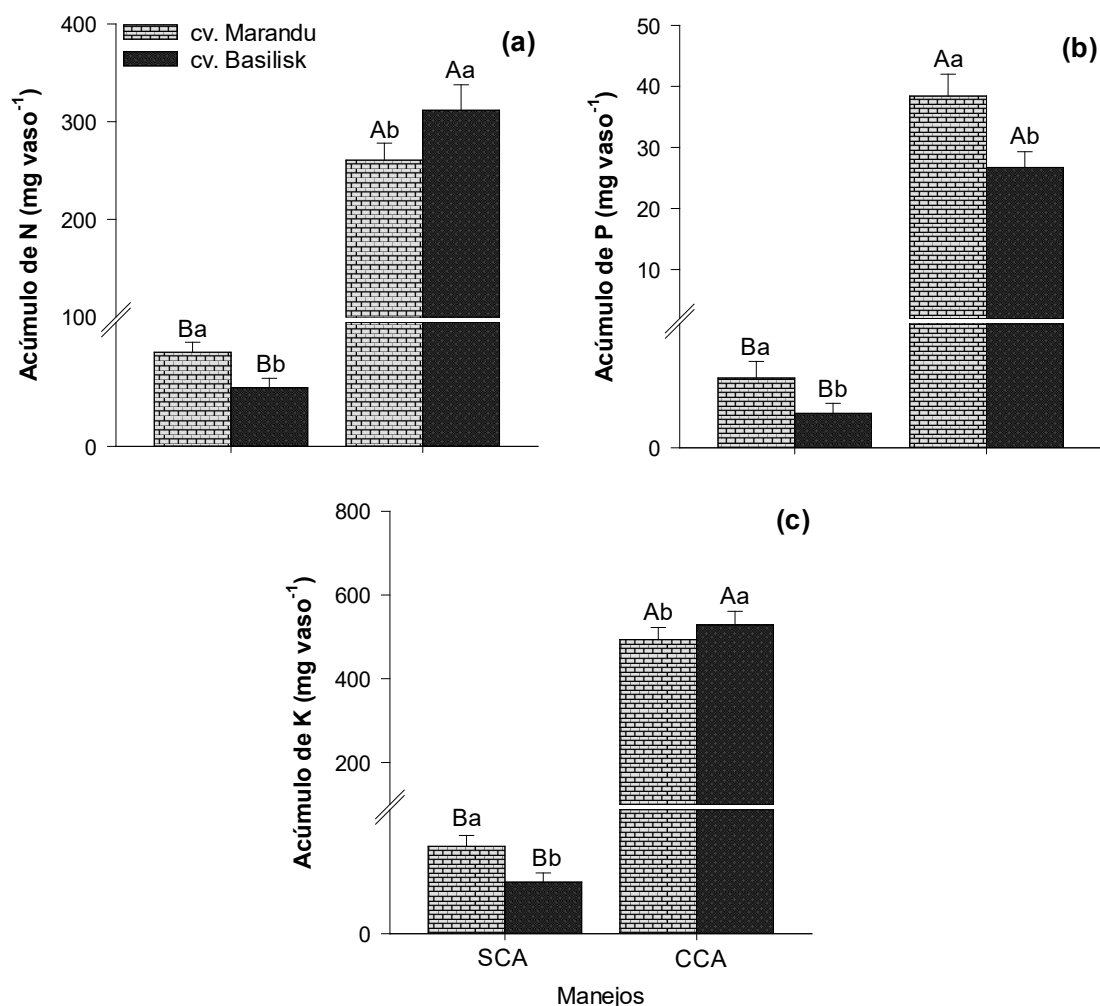


Figura 2: Acúmulo de nitrogênio (a), fósforo (b) e potássio (c) na parte aérea de *Urochloa* spp aos 60 dias após emergência, em função da interação manejo x genótipo. SCA: sem calagem e adubação; CCA: com calagem e adubação. Médias \pm erro padrão seguidas da mesma letra maiúscula entre manejos e minúscula entre cultivares, não diferem entre si, pelo teste de Tukey para $p \leq 0,05$.

Nota-se que ao realizar a prática de calagem e adubação, ocorreram comportamentos distintos entre os genótipos para acúmulo de nutrientes (Figura 2). Observaram que as médias mais expressivas no acúmulo de N (311,70 mg vaso⁻¹) e K (528,46 mg vaso⁻¹) decorrem da cv. Basilisk, correspondendo a um acréscimo de 19,61% e 7,08%, respectivamente, em relação à cv. Marandu. De forma contrária ocorreu no acúmulo de fósforo, em que a cv. Marandu demonstrou maior aproveitamento do P (38,41 mg vaso⁻¹).

Os valores observados ratificam parcialmente os dados apresentados por Rao et al., (1996), avaliando a influência do tipo de solo e doses de fertilizantes no acúmulo de nutrientes na parte aérea de diferentes cultivares de *Urochloa* spp., onde os autores observaram maiores valores de acúmulo de N e P na cv. Basilisk.

O comportamento da cv. Basilisk no maior acúmulo de N e K foi relatado por outros autores. Silva et al. (2016) relataram acúmulo de N na cv. Basilisk 27% superior a cv. Marandu sobre condições de adubação e calagem. Cabral et al. (2013), avaliando genótipos de *Urochloa* spp., observaram maior eficiência na absorção de N na cv. Basilisk. Estudando as respostas de espécies forrageiras cultivadas isoladas e/ou em consórcio com *Hymenaea courbaril* Gandini et al. (2011) verificaram maior acúmulo de K na cv. Basilisk, correspondendo a 25,78% superior ao observado na cv. Marandu. Para Fernandes (2016), a elevação nos teores de K se deve à alta correlação entre N e K, onde há existência de sinergismo entre o N aplicado e o K foliar.

Os maiores acúmulos de P em *U. brizantha* cv. Marandu foram relatados por Corrêa; Haag (1993), ao avaliarem o nível crítico de P para estabelecimento de gramíneas forrageiras em Latossolo vermelho-amarelo álico. Os autores verificaram aumento significativo no acúmulo de fósforo na massa seca da parte aérea ao elevarem as doses de P, sendo o acúmulo de fósforo mais acentuado em *U. brizantha* e *Panicum maximum* e menos expressivo na *U. decumbens*, evidenciando a elevada exigência de P da cv. Marandu em relação à cv. Basilisk. Silva (1996), em estudo com doses de P sobre parâmetros fitotécnicos e nutricionais na cv. Basilisk e Marandu, relatou maior incremento no acúmulo de fósforo na cv. Marandu.

Nota-se que não houve interação significativa ($p > 0,05$) entre manejo e genótipo para acúmulo de Ca e Mg. O efeito simples do genótipo revelou que o acúmulo de Ca e Mg foi maior na cv. Marandu, sendo superiores 7,85 e 18%, respectivamente. O menor acúmulo de Ca na cv. Basilisk pode ser explicado pelo maior acúmulo de N, em virtude do estímulo no crescimento da forrageira mesmo com a redução na dose de N. Costa et al. (2008) relataram que aumentos na adubação nitrogenada interferiu de forma negativa no teor de Ca, de forma que a absorção de Ca não acompanhou o crescimento da planta, causando um efeito diluição. O maior acúmulo de K na cv. Basilisk, influenciou no menor acúmulo de Mg. Segundo Oliveira et al. (2001), o aumento do K disponível no solo intensifica o efeito competitivo sobre a absorção do Ca e do Mg.

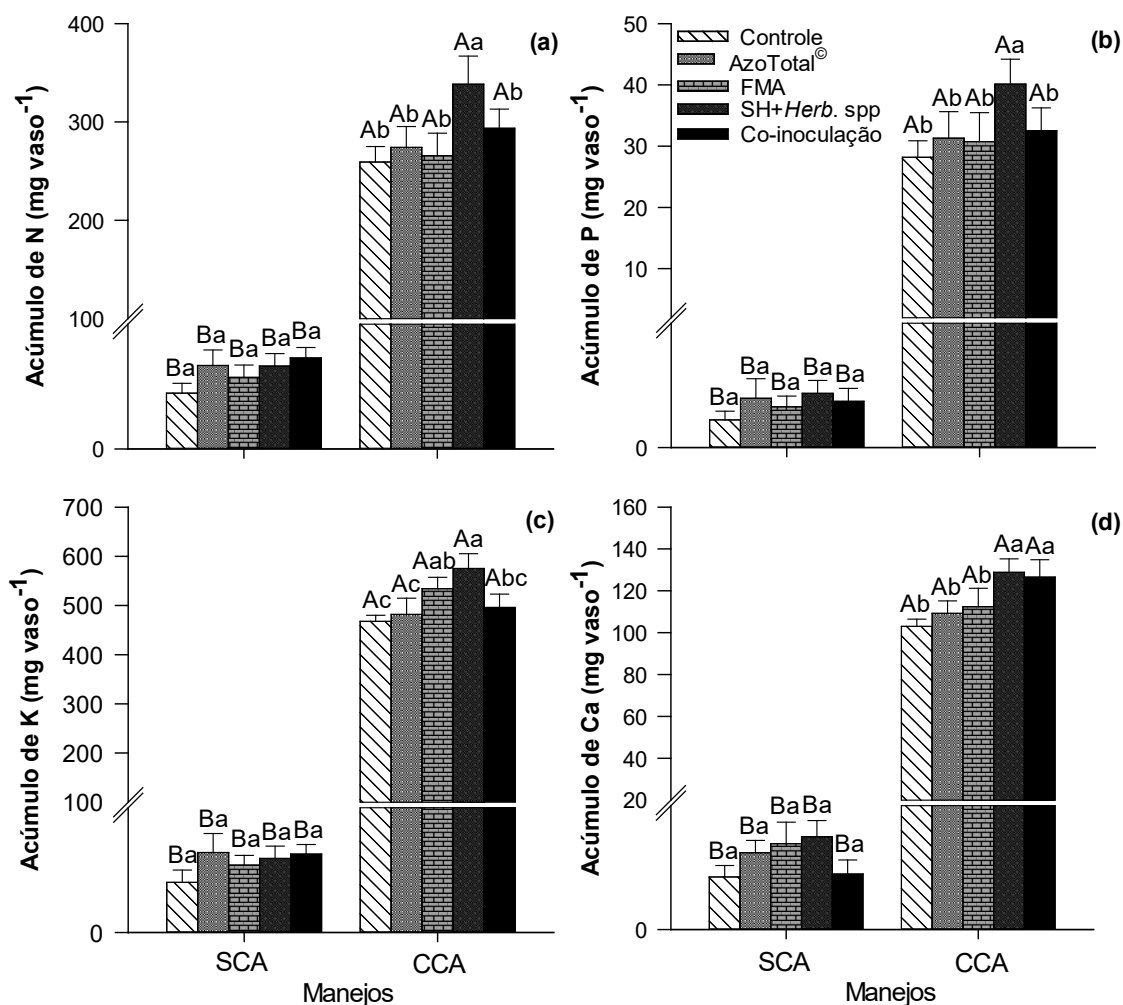


Figura 3: Acúmulo de nitrogênio (a), fósforo (b), potássio (c) e cálcio (d) na parte aérea de *Urochloa* spp. aos 60 dias após emergência, em função da interação manejo x biotecnologia. SCA: sem calagem e adubação; CCA: com calagem e adubação. AzoToTal[®]: *Azospirillum brasilense*; FMA: *Dentiscutata heterogama*; SH+Herb. spp (substâncias húmicas - 40 mg L⁻¹ C e *Herbaspirillum* sp); Co-inoc. (co-inoculação). Médias ± erro padrão seguidas da mesma letra maiúscula entre manejos e minúscula entre biotecnologias, não diferem entre si, pelo teste Tukey para $p \leq 0,05$.

Na Figura 3 são apresentadas as interações significativas entre manejo e biotecnologia para os acúmulos de N, P, K e Ca na parte aérea dos genótipos de *Urochloa* spp. Na ausência de calagem e adubação as biotecnologias não diferiram estatisticamente entre si, no entanto, a utilização de biotecnologias favoreceu o incremento de nutrientes na seguinte em média: N (47,31%), P (72,37%), K (49,45%) e Ca (47,83%), comparada à testemunha (sem inoculação). Estes resultados demonstram que mesmo em condições onde o fator abiótico (baixo pH e menor disponibilidade nutrientes) e biótico (competitividade entre inóculo e microbiota nativa do solo) atuaram sobre o comportamento dos microrganismos, houve incrementos no acúmulo

de nutrientes com adição das biotecnologias, possivelmente em decorrência da máxima potencialidade das biotecnologias, mesmo em condições adversas, ao desenvolvimento das plantas e dos microrganismos inoculados.

De maneira geral, o acúmulo de N, P, K e Ca na parte aérea de *Urochloa* spp. cultivada sobre calagem e adubação foi influenciado positivamente pelas biotecnologias. O tratamento com SH+*Herb.* spp. revelou maiores incrementos de N (338,37 mg vaso⁻¹), P (40,13 mg vaso⁻¹), K (575,33 mg vaso⁻¹) e Ca (128,79 mg vaso⁻¹), correspondendo a ganhos de 30, 42, 23 e 25%, respectivamente, comparado à testemunha (sem inoculação) (Figura 3). Resultado semelhante foi observado por Baldotto et al. (2010), em que a inoculação de *Burkholderia* spp. conjunta com ácido húmico aumentou o acúmulo de N (115%), P (112%) e K (69%) nas folhas do abacaxi.

No acúmulo de K, as plantas inoculadas com FMA, e no acúmulo de Ca a coinoculação, apresentaram médias estatisticamente semelhantes ao tratamento SH+*Herb.* spp. Por outro lado, a inoculação das plantas com demais tratamentos revelou médias estatisticamente semelhantes à testemunha, apesar de serem observados incrementos médios de 7,12% N; 11,90% P, 4,48% K e 7,61% Ca em relação ao controle.

Os resultados indicam que a aplicação de SH conjuntamente com *Herb.* spp. em *Urochloa* spp. cultivadas mediante a prática de calagem e adubação, mesmo com redução de 60% na dose de N, P e K, contribui significativamente no acúmulo de N, P, K e Ca na parte aérea da forrageira. Azevedo et al. (2019) relataram aumento do fluxo de H⁺ na zona de alongamento das raízes na presença conjunta de ácido húmico e *Herb.* spp, devido à ativação das H⁺-ATPases em resposta às auxinas secretadas pelas bactérias, resultando em maior número de raízes laterais e maior capacidade de absorção de nutrientes. Os autores evidenciaram mudanças fisiológicas que podem ajudar as plantas a sustentar o impacto da redução do N. Ademais, Zanin et al. (2018) propuseram que a SH extraída de água promove e acelera a aquisição de nitrato pelas plantas em virtude da forte modulação de genes envolvidos no transporte e assimilação de nitratos.

3.3 – Atributos fisiológicos

Na Tabela 7, são apresentados os valores de F obtidos na análise de variância dos atributos fisiológicos dos genótipos de *Urochloa* spp., bem como as médias e o nível de

significância. Observou-se interação ($p \leq 0,05$) entre os fatores manejo e biotecnologia sobre a variável teor de clorofila total (ICF) (Chl). O Efeito simples significativo dos manejos ($p \leq 0,01$) foi observado em todos os parâmetros fisiológicos avaliados. O fator qualitativo genótipo exerceu efeito fortemente significativo ($p \leq 0,01$) para os parâmetros transpiração (E), F_v/F_M (rendimento quântico potencial do fotossistema II), Chl e significativo para eficiência no uso da água (EUA) ($p \leq 0,05$). Quanto ao efeito simples das biotecnologias, houve significância para as variáveis taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s) e rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_M).

As plantas de *Urochloa* spp. conduzidas sem calagem e adubação diminuíram acentuadamente as variáveis relacionadas à fotossíntese, especialmente a taxa de assimilação líquida de CO_2 , condutância estomática e transpiração (Tabela 8). Resultados semelhantes foram observados por Inagaki (2017) na cultura do milho. A deficiência nutricional, a exemplo do nitrogênio, fósforo e magnésio no solo, pode interferir no processo fotossintético resultando em distúrbios fisiológicos nas plantas (INAGAKI, 2017).

Tabela 7: Valores de F, níveis de significância e médias dos parâmetros fisiológicos: taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E), concentração interna de CO_2 (C_i), eficiência no uso de água (EUA), rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_M) e índice de clorofila falker - teor de clorofila total (Chlt) em função do manejo, genótipo e biotecnologias.

| Fonte Variação | A | g_s | C_i | E | EUA | F_v/F_M | Chlt |
|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Bloco | 0,13 ^{ns} | 4,89* | 0,77 ^{ns} | 0,20 ^{ns} | 1,09 ^{ns} | 0,39 ^{ns} | 0,14 ^{ns} |
| Man. (M) | 46,77** | 40,03** | 19,41** | 16,11** | 10,19** | 25,19** | 261,18** |
| Gen. (G) | 0,05 ^{ns} | 0,21 ^{ns} | 0,07 ^{ns} | 7,90** | 6,33* | 8,71** | 52,83** |
| Biot. (B) | 2,85* | 2,94* | 1,90 ^{ns} | 0,28 ^{ns} | 1,36 ^{ns} | 3,58* | 10,68** |
| M*G | 0,52 ^{ns} | 0,08 ^{ns} | 2,14 ^{ns} | 1,45 ^{ns} | 3,78 ^{ns} | 0,19 ^{ns} | 2,84 ^{ns} |
| M*B | 0,92 ^{ns} | 0,46 ^{ns} | 0,19 ^{ns} | 2,01 ^{ns} | 2,26 ^{ns} | 1,72 ^{ns} | 2,62* |
| G*B | 0,96 ^{ns} | 1,28 ^{ns} | 0,09 ^{ns} | 1,15 ^{ns} | 2,30 ^{ns} | 1,07 ^{ns} | 0,43 ^{ns} |
| M*G*B | 4,20 ^{ns} | 2,49 ^{ns} | 0,26 ^{ns} | 0,42 ^{ns} | 1,54 ^{ns} | 1,24 ^{ns} | 1,56 ^{ns} |
| Média | 14,02 | 0,13 | 271,75 | 4,00 | 3,55 | 0,799 | 22,42 |

Man.: Manejo; Gen.: Genótipo; Biot.: Biotecnologia. Significativo pelo teste F: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: não significativo.

Os valores da taxa de assimilação de CO_2 (A) são próximos aos descritos na literatura para *Urochloa* spp., variando de 15 a 25 $\mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$ (BULEGON et al., 2017; MATTOS et al. 2005). A taxa A variou em resposta às biotecnologias. Na figura

4a, são ilustrados os efeitos isolados das biotecnologias sobre *A*, em que refletiram positivamente no aumento na taxa de assimilação de CO₂ em média 23,13%, comparado ao controle (sem inoculação), em virtude da maior condutância estomática, no qual favoreceu o aumento da difusão de CO₂ para câmara subestomática, colaborando para o aumento da *A*.

O aumento na *A* pode ser atribuído à maior absorção de P do solo, elevando a eficiência na utilização de ATP e NADPH no ciclo de Calvin e ao maior acúmulo de N, o qual está intimamente relacionado à taxa de pigmentos fotossintéticos (INAGAKI, 2017; DEBAEKE; ROUET; JUSTES, 2006), em que correlaciona-se com a taxa de assimilação de CO₂, uma vez que a maior captação de luz favorece a ganhos na etapa bioquímica (ROCHA, 2018). De fato, os incrementos nos acúmulos de N, P e teor de clorofila nas plantas tratadas com biotecnologia apresentaram maior taxa de assimilação de CO₂.

Tabela 8: Média dos parâmetros fisiológicos: taxa fotossintética (*A* - μmol CO₂ m⁻² s⁻¹), condutância estomática (*g_s* - mmol m⁻² s⁻¹), transpiração (*E* - μmol H₂O m⁻² s⁻¹), concentração interna de CO₂ (*C_i* - μmol mol s⁻¹), eficiência no uso de água (EUA - μmol CO₂ m⁻² s⁻¹/ μmol H₂O m⁻² s⁻¹), rendimento quântico máximo do PSII (*F_v/F_M*) e teor de clorofila total (Chlt) em função do manejo e genótipo de *Urochloa* spp.

| Manejos* | <i>A</i> | <i>g_s</i> | <i>C_i</i> | <i>E</i> | <i>F_v/F_M</i> | EUA |
|--------------------|----------|------------------------------------|----------------------|----------|------------------------------------|--------|
| SCA | 11,56 b | 0,10 b | 309,41 a | 3,65 b | 0,79 b | 3,27 b |
| CCA | 16,49 a | 0,16 a | 234,09 b | 4,36 a | 0,80 a | 3,84 a |
| Genótipos** | <i>E</i> | <i>F_v/F_M</i> | EUA | Chlt | | |
| cv. Marandu | 3,75 b | 0,80 a | 3,78 a | 24,14 a | | |
| cv. Basilisk | 4,25 a | 0,79 b | 3,33 b | 20,69 b | | |

*Médias seguidas da mesma letra minúsculas entre manejos, não diferem entre si, pelo teste Tukey para $p \leq 0,05$.

**Médias seguidas da mesma letra minúscula entre genótipos, não diferem entre si, pelo teste Tukey para $p \leq 0,05$.

Rosa et al. (2016) relataram melhorias nos parâmetros fisiológicos em videira inoculada com micorriza arbuscular - *Dentiscutata heterogama*, em virtude da maior absorção de nutrientes, tanto pela ação do sistema radicular quanto por via micorrízica. Melhorias nas taxas fotossintéticas promovidas pela utilização de BPCV, descritas por Bulegon et al. (2017), associadas à solubilização de fosfato inorgânico e FBN, além da

maior produção de pigmentos fotoprotetores, favorecendo o aumento da taxa fotossintética (BASHAN et al., 2006).

Efeitos benéficos da aplicação de SH+*Herb. spp.* no aparelho fisiológico em plantas de milho são relatados por Canellas et al. (2012), em que houve maior estímulo na abertura estomática, além do aumento na atividade da H⁺-ATPases, possibilitando maior crescimento radicular e absorção de nutrientes.

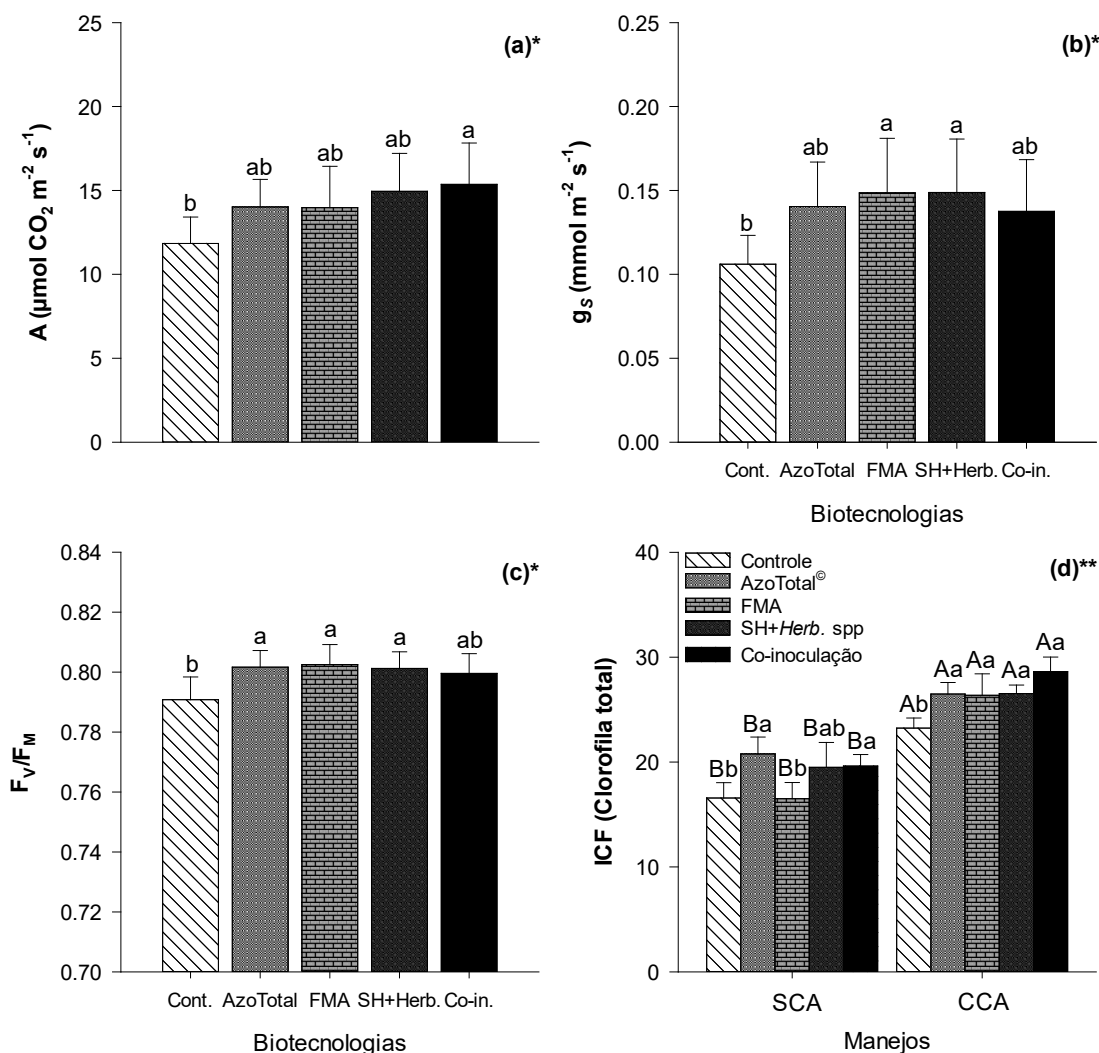


Figura 4: A: taxa de assimilação de CO₂ (a); gs: condutância estomática; F_v/F_m: rendimento quântico do fotossistema II (c); ICF: Índice de clorofila falker - clorofila total (d). SCA: sem calagem e adubação; CCA: com calagem e adubação. FMA: Fungo micorrízico arbuscular; SH+*Herb. spp.*: substâncias húmicas – 40 mg L⁻¹ C juntamente com estirpes de *Herbaspirillum spp.*; Co-in.: coinoculação.

* Médias ± erro padrão seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Tukey para $p \leq 0,05$.

** Médias ± erro padrão seguidas da mesma letra maiúscula entre manejos e minúscula entre biotecnologias, não diferem entre si, pelo teste Tukey para $p \leq 0,05$.

A menor C_i nos tratamentos em que houve calagem e adubação (Tabela 8) pode ser explicada pela maior taxa fotossintética, aumentando o consumo de C_i , levando ao maior estímulo da abertura estomática, elevando a g_s (SOUZA; KUWAHARA, 2009). Os mesmos autores relatam que o estímulo para abertura estomática está associado tanto à pressão de turgor da célula guarda quanto à concentração interna de CO_2 . A redução na assimilação de CO_2 leva ao menor consumo de CO_2 intracelular, em virtude da Rubisco não estar totalmente ativada, assim o CO_2 não é carboxilado e incorporado ao Ciclo de Calvin, aumentando a C_i (BULEGON et al., 2017). Por outro lado, Jin et al. (2011) atribuem este comportamento fisiológico, diminuição da g_s e aumento da C_i , a uma maior resistência do mesófilo e/ou uma menor capacidade de fixação de CO_2 , em vez de limitações estomáticas.

A leitura ICF possibilita determinar indiretamente o teor de clorofila nas folhas, que está diretamente relacionada ao acúmulo de nitrogênio (DEBAEKE; ROUET; JUSTES, 2006). Estudo realizado por Silva (2006) quando comparado às mesmas doses de N (40 mg dm^{-3}) em braquiária relatou teores de clorofila 60% superior ao tratamento sem aplicação de N.

Na interação do manejo e biotecnologia, observou que as biotecnologias na presença de calagem e adubação demonstraram superioridade média de 40% no teor de clorofila (ICF) comparados ao tratamento SCA (Figura 4d). Estes resultados estão coerentes com os valores do acúmulo de N nas plantas que receberam adubação nitrogenada e biotecnologias.

A utilização de biotecnologias proporcionou incrementos de 17 a 25% no teor de clorofila, mesmo sem calagem e adubação. Nota-se que os maiores teores de clorofila foram observados com inoculação de AzoTotal[®], seguida dos tratamentos com coinoculação e SH+*Herb.* spp. Os maiores teores de clorofila obtidos estão relacionados ao uso das estirpes de *A. brasilense*, indicando provavelmente que há uma maior concentração de nitrogênio na folha em virtude da FBN.

As plantas podem exsudar compostos orgânicos fundamentais para induzir respostas quimioatraentes sobre a microbiota do solo, favorecendo a taxa de inoculação e, conseqüentemente, o potencial de FBN (SILVA, 2017). Efeitos benéficos da aplicação de SH+*Herb.* spp. sobre o teor de clorofila também foram relatados por Canellas et al. (2012) em plantas de milho.

Os teores de clorofila (ICF) nas folhas das plantas cultivadas no manejo CCA variaram de 23,23 a 28,61. Silva (2006) avaliando genótipos de *Urochloa* spp. e doses

de N, verificou valor médio do teor de clorofila (SPAD) na dose de 40 mg dm⁻³ de N (24,98), inferior ao obtido no presente estudo, provavelmente pelo fato do autor não ter utilizado biofertilizantes com objetivo de complementação da adubação.

A aplicação de biotecnologias aumentou o teor de clorofila (ICF) nas folhas das plantas cultivadas no manejo CCA em média 16% comparado à testemunha. As médias mais expressivas para ICF decorrem da coinoculação (28,61), SH+*Herb. spp.* (26,53) e AzoTotal[®] (26,49). Sharma e Banik (2014) avaliando plantas de milho com doses de NPK associadas a biofertilizantes verificaram que plantas coinoculadas (FMA + *Azospirillum spp.*) exibiram notavelmente maior teor de clorofila em comparação com a inoculação única. Os autores atribuíram estes valores a síntese e liberação de fitormônios e nutrientes pela *Azospirillum spp.* e FMA. De forma similar, sugere-se que ocorreu nos tratamentos com SH+*Herb. spp.* e AzoTotal[®].

O rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_M) possibilita julgar o estado fisiológico da planta (BAKER; ROSENQVIST, 2004). A razão F_v/F_M deve estar entre 0,750 a 0,850, onde valores abaixo indicam danos fotoinibitórios no centro de reação do PSII (GUIDI; LO PICCOLO; LANDI, 2019). Nota-se na figura 4c que os valores médios do F_v/F_M encontram-se entre 0,790 a 0,802. Independente dos tratamentos utilizados, os valores do F_v/F_M demonstram que os genótipos de *Urochloa spp.* não apresentaram danos ao centro de reações do PSII. A aplicação de biotecnologia demonstrou melhorias significativas no F_v/F_M.

Avaliando genótipos de milho, Jin et al. (2015) constataram que em condições de deficiência de N a razão F_v/F_M variou de 0,744 a 0,773, porém quando submetidas à alta dose de N houve aumento no F_v/F_M de 0,793 a 0,805. Os autores sugerem que o aumento da razão F_v/F_M está associado ao maior conteúdo e atividade da Rubisco no ciclo de Calvin e da PEP carboxilase, podendo ser usada para melhorar o transporte de elétrons fotossintéticos, produzindo NADPH e ATP, aumentando a fotossíntese e a concentração de clorofila. Desta forma, a presença de microrganismos promotores de crescimento vegetal, capazes de aumentar o aporte de N nas plantas, contribuiu para a melhoria no rendimento quântico do PSII.

3.4 – Atributos microbiológicos

Na Tabela 9, são apresentados os valores de F, níveis de significância, média e coeficiente de variação dos atributos microbiológicos: quantidade de diacetato de

fluoresceína (FDA) hidrolisado ($\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$) e porcentagem de colonização micorrízicas (CM) em genótipos de *Urochloa* spp. após 60 dias de cultivo. Observa-se que o atributo FDA, apresentou significância entre genótipo x biotecnologia e, manejo x biotecnologia ($p \leq 0,05$). Efeito simples da biotecnologia e manejo foi observado na CM, em que houve forte significância ($p \leq 0,01$).

A hidrólise da FDA avalia a atividade hidrolítica indiscriminada de microrganismos, através da hidrólise de várias enzimas (lipases, proteases e esterases), presentes nos microrganismos (PATLE; NAVNAGE; BARANGE, 2018).

A atividade microbiológica foi mais intensa no manejo SCA, sendo 23% superior ao observado no CCA ($5,13 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$). O efeito das biotecnologias dentro dos níveis do manejo, demonstrou que no solo sem calagem e adubação os tratamentos coinoculação e AzoTotal[®] elevaram 13,31 e 6,22%, respectivamente, os valores da FDA comparado ao controle ($6,33 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$). Curiosamente os tratamentos com FMA e SH+*Herb.* spp. apresentaram resultados inferiores à testemunha (Figura 5a) no manejo sem calagem e adubação.

Tabela 9: Valores de F, níveis de significância e médias dos parâmetros: Atividade de hidrólise do diacetado de fluoresceína (FDA) do solo e porcentagem de colonização micorrízicas (CM) em função do manejo, genótipo e biotecnologias.

| Fonte Variação | FDA | CM |
|------------------|--------------------|---------------------|
| Bloco | 3,96* | 0,04 ^{ns} |
| Man. (M) | 39,77** | 9,13** |
| Gen. (G) | 7,90** | 1,98 ^{ns} |
| Biot. (B) | 3,63* | 171,81** |
| M*G | 0,80 ^{ns} | 0,004 ^{ns} |
| M*B | 3,62* | 0,76 ^{ns} |
| G*B | 6,71** | 1,65 ^{ns} |
| M*G*B | 1,93 ^{ns} | 0,61 ^{ns} |
| Média | 5,73 | 41,25 |
| CV (%) | 30,22 | 7,56 |

Man.: Manejo; Gen.: Genótipo; Biot.: Biotecnologia. Significativo pelo teste F: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: não significativo.

Ao realizar a prática de calagem e adubação, as biotecnologias não influenciaram significativamente na atividade microbiológica do solo. Resultados similares foram obtidos por Freitas et al. (2011), que registraram hidrólise da FDA de $6,56 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ em sistema convencional cultivando uva em Neossolo Quartzarênico. Os autores

concluíram que a menor atividade microbiana pode ser devido aos níveis mais baixos de matéria orgânica do solo.

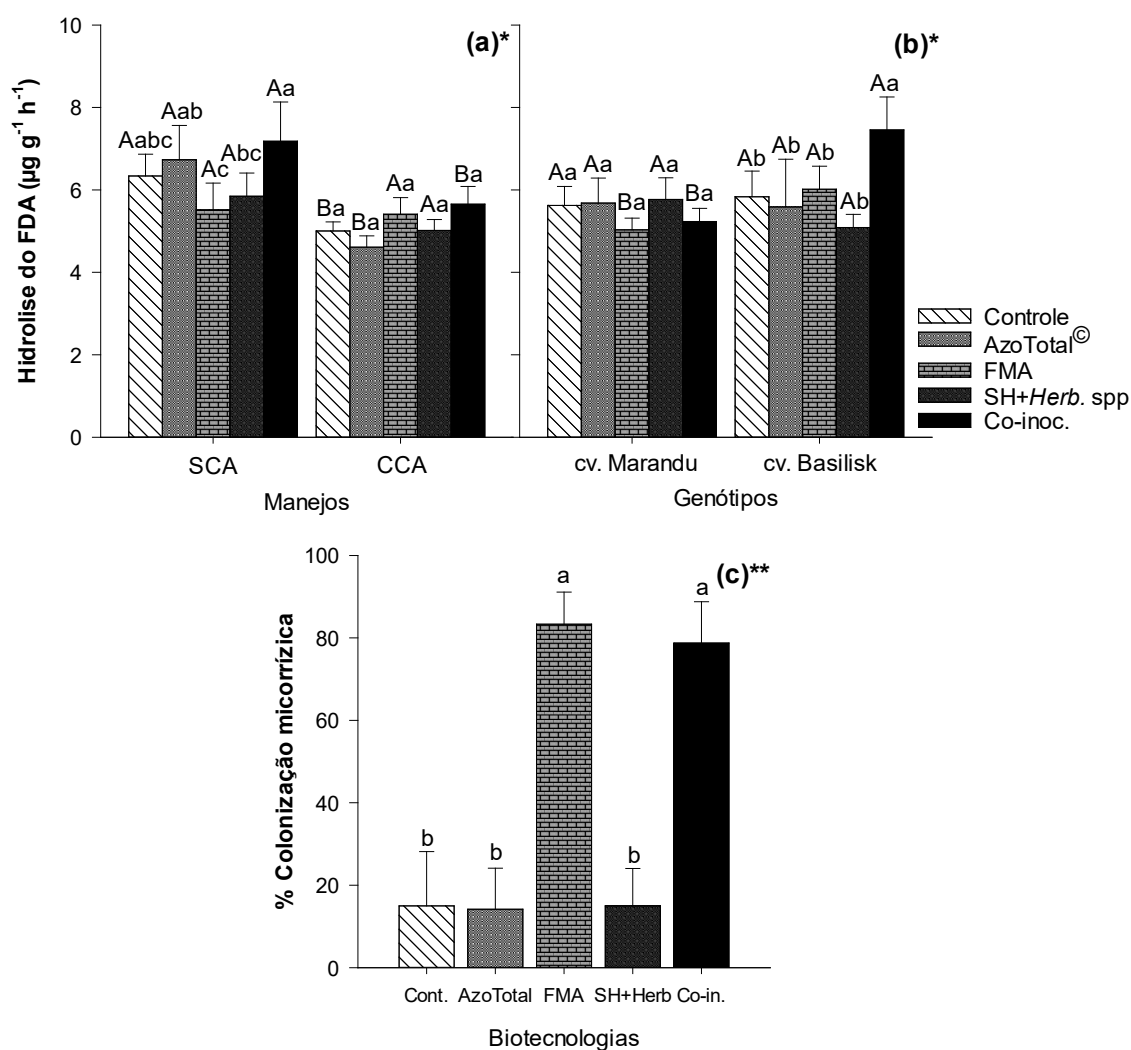


Figura 5: Quantidade de diacetado de fluoresceína (FDA) fluoresceína (FDA) hidrolisada μg^{-1} solo h^{-1} , em diferentes manejos (a) e genótipos *Urochloa* spp. (b); Taxa de colonização micorrízica em % (c). SCA: sem calagem e adubação; CCA: com calagem e adubação. Cont.: Controle; FMA: Fungo micorrízico arbuscular; SH+Herb. spp.: substâncias húmicas – 40 mg L^{-1} C juntamente com estirpes de *Herbaspirillum* spp.); Co-in.: coinoculação.

* Médias \pm erro padrão seguidas da mesma letra maiúscula entre manejos ou genótipos e minúscula entre biotecnologias, não diferem entre si, pelo teste Tukey para $p \leq 0,05$.

** Médias \pm erro padrão seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Tukey para $p \leq 0,05$.

A baixa disponibilidade de nutrientes influencia qualitativamente e quantitativamente nos exsudatos radiculares liberados pelas plantas, decorrente do estresse nutricional (LIU et al., 2004). As plantas exsudam compostos orgânicos que

influenciam diretamente o ambiente rizosférico e no estímulo da atividade microbiana, uma vez que liberam pelas raízes uma imensa variedade de compostos, como ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares e outros (TAN et al., 2013). Ademais, em condições de baixo pH do solo a disponibilidade de nutrientes é comprometida, o que pode ter favorecido a maior liberação de enzimas (fosfatase ácida e outros) capazes de atuar na disponibilização de nutrientes.

Os aumentos na hidrólise do FDA decorrente da coinoculação podem estar relacionados à atuação dos exsudatos radiculares ou substâncias que atuam como sinais moleculares ou estimulantes, que impulsionam o crescimento de microrganismos no solo (BALOTA et al., 1995). Ademais, Desirò et al. (2013) fornecem evidências que estruturas micorrízicas podem alojar comunidades microbianas, como bactérias endossimbiontes, formando um microbioma bacteriano intracelular, indicando que quando as plantas são coinoculadas pode possibilitar maior atividade enzimática no solo.

Na interação genótipo e biotecnologia, verificou-se maiores valores da hidrólise do FDA no solo cultivado com cv. Basilisk associados à coinoculação ($7,45 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$), demonstrando que esta interação favorece a atividade microbiológica do solo. Nota-se que na cv. Marandu os tratamentos apresentaram comportamento semelhante na hidrólise do FDA. A provável hipótese para maior atividade microbiana na cv. Basilisk, especialmente quando coinoculada, pode ser explicada pelos diferentes exsudatos entre genótipos com ações diferenciadas, influenciando a comunidade microbiana presente na rizosfera.

Silva (2017) reportou que em diferentes genótipos de milho, as biomoléculas têm funcionalidades diferenciadas capazes de induzir repostas quimiotáticas sobre a microbiota do solo de forma variada. Aira et al. (2010) também avaliaram acessos de milho e observaram que o genótipo da planta altera a estrutura e o crescimento das comunidades microbianas rizosféricas.

Na taxa de colonização micorrízica (CM) verificou-se que na ausência de calagem e adubação a CM foi 20,64% superior ao observado no manejo CCA. Sugere-se que esta relação pode ser associada ao nível crítico interno de P da planta hospedeira.

Pode-se perceber que houve diferença significativa entre biotecnologias, onde as maiores CM foram observadas nos tratamentos com FMA e coinoculação (Figura 6c). Costa et al. (2012) constataram taxa de colonização micorrízica em *U. decumbens* cv. Basilisk inoculada com diferentes FMA de até 61,6%. Nos demais tratamentos foi

observada colonização radicular em menor porcentagem, decorrente da presença de fungos micorrízicos nativos, uma vez que o solo utilizado neste estudo não passou por processo de esterilização.

4.0 – CONCLUSÕES

A aplicação de SH+*Herb.* spp. no manejo com calagem e adubação apresentou maior produção de MSPA.

A cv. Marandu apresentou maior produção de massa seca de raiz.

A redução de 60% na dose de fertilizantes reduziu os teores foliares de nitrogênio.

Maiores acúmulos de N e K ocorreram na cv. Basilisk, e P na cv. Marandu.

A aplicação de SH+*Herb.* spp. em solo com calagem e adubação promoveu maiores acúmulos de N, P, K e Ca, provavelmente em decorrência do maior crescimento radicular.

As biotecnologias influenciaram positivamente nas variáveis relacionadas à fotossíntese, especialmente a taxa de assimilação líquida de CO₂ e condutância estomática.

A aplicação de biotecnologias aumentou, em média 16% o ICF nas folhas das plantas cultivadas no manejo CCA

As biotecnologias aumentaram a razão F_v/F_m independente do tratamento avaliado.

Houve aumento de 23% nos valores de FDA no manejo SCA, sugerindo melhorias na atividade microbiológica, especialmente quando as plantas foram coinoculadas.

5.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRA, M.; GÓMEZ-BRANDÓN, M.; LAZCANO, C.; BÅÅTH, E.; DOMÍNGUEZ, J.. Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, [s.l.], v. 42, n. 12, p.2276-2281, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.029>.

ANDRADE, G.; MIHARA, K. L.; LINDERMAN, R. G., BETHLENFALVAY, G. J.. Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. **Plant and Soil**, [s.l.], v. 202, n. 1, p.89-96, 1998. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1004301423150>.

ARTURSSON, V.; FINLAY, R. D.; JANSSON, J. K.. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-10, jan. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00942.x>.

AZEVEDO, I. G.; OLIVARES, F. L.; RAMOS, A. C.; BERTOLAZI, A. A.; CANELLAS, L. P.. Humic acids and *Herbaspirillum seropedicae* change the extracellular H⁺ flux and gene expression in maize roots seedlings. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-10, 24 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40538-019-0149-0>.

BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E.. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 55, n. 403, p.1607-1621, 16 jul. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erh196>.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; CANELLAS, L. P.; BRESSAN-SMITH, R.; OLIVARES, F. L.. Growth promotion of pineapple 'vitória' by humic acids and *Burkholderia* spp. during acclimatization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s.l.], v. 34, n. 5, p.1593-1600, out. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-06832010000500012>.

BALOTA, E. L.; LOPES, E. S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J.. Interações e efeitos fisiológicos de bactéria diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 11, p. 1335-1345, nov. 1995.

BASHAN, Y.; BUSTILLOS, J. J.; LEYVA, L. A.; HERNANDEZ, J.-p.; BACILIO, M.. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. **Biology and Fertility of Soils**, [s.l.], v. 42, n. 4, p.279-285, 12 jul. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-005-0025-x>.

BERRUTI, A.; LUMINI, E.; BALESTRINI, R.; BIANCIOTTO, V.. Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Natural Biofertilizers: Let's Benefit from Past Successes. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 6, p.1-13, 19 jan. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.01559>.

BRAZ, S. P.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J.; BODDEY, R. M. **Degradação de Pastagens, Matéria Orgânica do Solo e a Recuperação do Potencial Produtivo em Sistemas de Baixo “Input” Tecnológico na Região dos Cerrados**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2004. 8 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico, 9).

BROUWER, R. Nutritive influences on the distribution of dry matter in the plant. **Nether. J. Agric. Sci.**, 10:342-399, 1962.

BULEGON, L. G.; BATTISTUS, A. G.; GUIMARÃES, V. F.; INAGAKI, A. M.; OFFEMANN, L. C.; SOUZA, A. K. P.; OLIVEIRA, P. S. R.. Physiological responses of *Urochloa ruziziensis* inoculated with *Azospirillum brasilense* to severe drought and rehydration conditions. **Australian Journal of Crop Science**, [s.l.], v. 11, n. 10, p.1283-1289, 20 out. 2017. Southern Cross Publishing. <http://dx.doi.org/10.21475/ajcs.17.11.10.pnc577>.

CABRAL, C. E. A.; ABREU, J. G.; BONFIM-SILVA, E. M.; CABRAL, C. H. A.; SCARAMUZZA, J. F.; SILVA, T. J. A. Eficiência de produção e concentração de nitrogênio nos capins marandu, decumbens e convert submetido à adubação nitrogenada. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, supplement 1, p. 1653-1663, Nov. 2013.

CANELLAS, L. P.; BALMORI, D. M.; MÉDICI, L. O.; AGUIAR, N. O.; CAMPOSTRINI, E.; ROSA, R. C. C.; FAÇANHA, A. R.; OLIVARES, F. L.. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, [s.l.], v. 366, n. 1-2, p.119-132, 23 ago. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-012-1382-5>.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.1-11, 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/2196-5641-1-3>.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; AGUIAR, N. O.; JONES, D. L.; NEBBIOSO, A.; MAZZEI, P.; PICCOLO, A.. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 196, p.15-27, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>.

CARVALHO, L.B.; BIANCO, S.; PITELLI, R.A.; BIANCO, M.S.. Estudo comparativo do acúmulo de massa seca e macronutrientes por plantas de milho var. BR-106 e *Brachiaria plantaginea*. **Planta Daninha**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.293-301, 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-83582007000200008>.

CHEN, S.; ZHAO, H.; ZOU, C.; LI, Y.; CHEN, Y.; WANG, Z.; JIANG, Y.; LIU, A.; ZHAO, P.; WANG, M.; AHAMMED, G. J.. Combined Inoculation with Multiple Arbuscular Mycorrhizal Fungi Improves Growth, Nutrient Uptake and Photosynthesis in Cucumber Seedlings. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 8, p.1-11, 19 dez. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.02516>.

CORRÊA, L. A.; HAAG, H. P.. Níveis críticos de fósforo para o estabelecimento de gramíneas forrageiras em Latossolo Vermelho-Amarelo, álico. I: ensaio em casa de vegetação. **Scientia Agricola**, [s.l.], v. 50, n. 1, p.99-108, maio 1993. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-90161993000100014>.

COSTA, K. A. P.; ARAUJO, J. L.; FAQUIN, V.; OLIVEIRA, I. P.; FIGUEIREDO, F. C.; GOMES, K. W.. Extração de macronutrientes pela fitomassa do capim-xaraés. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 38, n. 4, p.1162-1166, ago. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782008000400043>.

COSTA, N. L.; MAGALHÃES, J. A.; TOWNSEND, C. R.; PAULINO, V. T.. **Fisiologia e manejo de plantas forrageiras**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2004. 27p. (Embrapa Rondônia. Documentos, 85).

COSTA, N. L.; PAULINO, V. T.; COSTA, R. S. C.; PEREIRA, R. G. A.; TOWNSEND, C. R.; MAGALHÃES, J. A.. Efeito de micorrizas arbusculares sobre o crescimento e nutrição mineral de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. **Ciência Animal Brasileira**, [s.l.], v. 13, n. 4, p.406-411, 14 dez. 2012. Universidade Federal de Goiás. <http://dx.doi.org/10.5216/cab.v13i4.8665>.

COSTA, N. L.; TOWNSEND, C. R.; MAGALHÃES, J. A.; OLIVEIRA, J. R. C.. **Limitações de fertilidade do solo para o crescimento de *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2004. 4p. (Embrapa Rondônia. Comunicado Técnico, 280).

CUNHA, A. M.; FEITOZA, H. N.; FEITOZA, L. R.; OLIVEIRA, F. S.; LANI, J. L.; CARDOSO, J. K. F.; TRINDADE, F. S.. Update to the legend of the reconnaissance soil map of Espírito Santo state and the implementation of Geobases interface for data usage in GIS. **Revista Geografares**, [s.l.], v. 23, p.32-65, 22 dez. 2016. Geografares. <http://dx.doi.org/10.7147/geo23.12356>.

DEBAEKE, P.; ROUET, P.; JUSTES, E.. Relationship Between the Normalized SPAD Index and the Nitrogen Nutrition Index: Application to Durum Wheat. **Journal of Plant Nutrition**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.75-92, jan. 2006. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01904160500416471>.

DESIRÒ, A.; SALVIOLI, A.; NGONKEU, E. L.; MONDO, S. J.; EPIS, S.; FACCIO, A.; KAECH, A.; PAWLOWSKA, T. E.; BONFANTE, P.. Detection of a novel intracellular microbiome hosted in arbuscular mycorrhizal fungi. **The Isme Journal**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.257-270, 5 set. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2013.151>.

DIAS-FILHO, M. B.. **Degradação das pastagens: o que é e como evitar**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2017. 24p. (Embrapa Amazônia Oriental).

DIAS-FILHO, M. B.. **Diagnóstico das Pastagens no Brasil**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2014. 36p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 402).

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 60 p.

DU JARDIN, P.. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 196, p.3-14, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>.

FERNANDES, J. S.. ***Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada na *Brachiaria decumbens***. 2016. 49f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, 2016.

FOKOM, R.; ADAMOU, S.; TEUGWA, M. C.; BEGOUDE BOYOGUENO, A. D.; NANA, W. L.; NGONKEU, M. E. L.; TCHAMENI, N. S.; NWAGA D.; NDZOMO, G. T.; AMVAM ZOLLO, P. H.. Glomalin related soil protein, carbon, nitrogen and soil aggregate stability as affected by land use variation in the humid forest zone of south Cameroon. **Soil and Tillage Research**, [s.l.], v. 120, p.69-75, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2011.11.004>.

FREITAS, N. O.; YANO-MELO, A. M.; SILVA, F. S. B.; MELO, N. F.; MAIA, L. C.. Soil biochemistry and microbial activity in vineyards under conventional and organic management at Northeast Brazil. **Scientia Agricola**, [s.l.], v. 68, n. 2, p.223-229, abr. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-90162011000200013>.

GANDINI, A. M. M.; SANTOS, J. B.; ANDREZZA, M. M. G.; SANTANA, R. C.; CUNHA, V. C.; SILVA, D. V.; FIORE, R. A.. Capacidade competitiva do jatobá com adubos verdes, forrageiras e plantas daninhas. **Planta Daninha**, [s.l.], v. 29, n. , p.991-999, 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-83582011000500005>.

GUIDI, L.; LO PICCOLO, E.; LANDI, M.. Chlorophyll fluorescence, photoinhibition and abiotic stress: Does it make any difference the fact to be a C3 or C4 species?. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 10, p.1-11, 14 fev. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.00174>.

GUIMARÃES V. F.; BATTISTUS, A.; SOUZA, A. K. P.; BULEGON, L.; LUZ, C.; INAGAKI, A. M.. Bactérias promotoras de crescimento vegetal: da FBN à regulação hormonal, possibilitando novas aplicações. In: Zambom M.A. et al. Ciências Agrárias: ética do Cuidado, Legislação e Tecnologia na Agropecuária. Marechal Cândido Rondon: UNIOESTE. p. 192-212. 2018.

GOMES, L. B. E.. **Inoculação da estirpe sp 245 de *Azospirillum brasilense* em diferentes genótipos de *Urochloa***. 2017. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2017.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, [s.l.], v. 331, n. 1-2, p.413-425, 13 jan. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>.

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**, [s.l.], v. 49, n. 7, p.791-801, 12 jan. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-012-0771-5>.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [s.l.], v. 221, p.125-131, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2016.01.024>.

INAGAKI, A. M.. **Trocas gasosas e morfometria de plantas de milho inoculadas com *Azospirillum brasilense* e fungos micorrízicos arbusculares sob adubação fosfatada**. 2017. 81f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2017.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J.. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 48, n. 3, p.785-798, 1 mar. 1997. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/48.3.785>.

JIN, X.; YANG, G.; TAN, C.; ZHAO, C.. Effects of nitrogen stress on the photosynthetic CO₂ assimilation, chlorophyll fluorescence and sugar-nitrogen ratio in corn. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.1-9, 1 abr. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep09311>.

KONRAD, M. L. F.; SILVA, J. A. B.; FURLANI, P. R.; MACHADO, E. C.. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia**, [s.l.], v. 64, n. 3, p.339-347, 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0006-87052005000300004>.

LEIFHEIT, E. F.; VERESOGLOU, S. D.; LEHMANN, A.; MORRIS, E. K.; RILLIG, M. C.. Multiple factors influence the role of arbuscular mycorrhizal fungi in soil aggregation—a meta-analysis. **Plant and Soil**, [s.l.], v. 374, n. 1-2, p.523-537, 18 set. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-013-1899-2>.

LEITE, R. C.; SANTOS, J. G. D.; SILVA, E.L; ALVES, C. R. C. R., HUNGRIA, M.; LEITE, R. C.; SANTOS, A. C.. Productivity increase, reduction of nitrogen fertiliser use and drought-stress mitigation by inoculation of Marandu grass (*Urochloa brizantha*) with *Azospirillum brasilense*. **Crop and Pasture Science**, [s.l.], v. 70, n. 1, p.61-67, 2019. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/cp181>.

LIANG, Y.; PAN, F.; HE, X.; CHEN, X.; SU, Y.. Effect of vegetation types on soil arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen-fixing bacterial communities in a karst region. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 23, n. 18, p.18482-18491, 11 jun. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7022-5>.

LIU, Y.; MI, G.; CHEN, F.; ZHANG, J.; ZHANG, F.. Rhizosphere effect and root growth of two maize (*Zea mays* L.) genotypes with contrasting P efficiency at low P

availability. **Plant Science**, [s.l.], v. 167, n. 2, p.217-223, ago. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.02.026>.

MARQUES JÚNIOR, R. B.; CANELLAS, L. P.; SILVA, L. G.; OLIVARES, F. L.. 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**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.1121-1128, jun. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-06832008000300020>.

MARTHA JÚNIOR, G.B.; VILELA, L.. **Pastagem do Cerrado: Baixa produtividade pelo uso limitado de fertilizantes**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 32p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 50).

MARTUSCELLO, J. A.; JANK, L.; NETO, M. M. G.; LAURA, V. A.; CUNHA, D. N. F. V.. Produção de gramíneas do gênero *Brachiaria* sob níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s.l.], v. 38, n. 7, p.1183-1190, jul. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-35982009000700004>.

MATTOS, J. L. S.; GOMIDE, J. A.; HUAMAN, C. A. M.. Crescimento de espécies do gênero *Brachiaria*, sob déficit hídrico, em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s.l.], v. 34, n. 3, p.746-754, jun. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-35982005000300005>.

MENDONÇA, E. S., MATOS, E. S.. **Matéria orgânica do solo; métodos de análises**. Viçosa: UFV; 2005. 107 p.

MEIRELLES, A. F. M.; BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B.. Produtividade da alface (*Lactuca sativa* L.) em resposta à aplicação de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas, em condições de campo. **Revista Ceres**, [s.l.], v. 64, n. 5, p.553-556, out. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201764050014>.

MELO, R. O.; OLIVEIRA, H. P.; SILVEIRA, K. C.; BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.. Initial performance of maize in response to humic acids and plant growth-promoting bacteria. **Revista Ceres**, [s.l.], v. 65, n. 3, p.271-277, jun. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201865030007>.

MIRANDA, E. M.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R.. Seleção de fungos micorrízicos arbusculares para o amendoim forrageiro consorciado com braquiária. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 43, n. 9, p.1185-1191, set. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2008000900013>.

NOVAIS, R. F.; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. F.. Ensaio em ambiente controlado. In: OLIVEIRA, A. J.; GARRIDO, W. E.; ARAUJO, J. D.; LOURENÇO, S.. **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. Brasília: EMBRAPA-SEA, 1991. p.189-253. (EMBRAPA-SEA. Documento, 3).

OLIVEIRA, F. A.; CARMELLO, Q. A. C.; MASCARENHAS, H. A. A.. Disponibilidade de potássio e suas relações com cálcio e magnésio em soja cultivada em casa-de-vegetação. **Scientia Agricola**, [s.l.], v. 58, n. 2, p.329-335, jun. 2001. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-90162001000200016>.

OLIVEIRA, H. P.; MELO, R. O.; BALDOTTO, M. A.; ANDRADE, M. A.; BALDOTTO, L. E. B.. Performance of pre-sprouted sugarcane seedlings in response to the application of humic acid and plant growth-promoting bacteria. **Semina: Ciências Agrárias**, [s.l.], v. 39, n. 3, p.1365-1370, 4 maio 2018. Universidade Estadual de Londrina. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n3p1365>.

OLIVEIRA, P. P. A.; CORSI, M.. **Recuperação de pastagens degradadas para sistemas intensivos de produção de bovinos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 23p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Circular Técnica, 38).

OLIVEIRA, P. P. A.; MARCHESIN, W.; LUZ, P. H. C.; HERLING., V. R.. **Guia de identificação de deficiências nutricionais em *Brachiaria brizantha* cv. marandu**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. 38p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Comunicado Técnico, 76).

ORTAS, I.; KAYA, Z.; ÇAKMAK, I.. Influence of arbuscular mycorrhizae inoculation on growth of maize and green pepper plants in phosphorus- and zinc-deficient soil. **Plant Nutrition**, [s.l.], p.632-633, 2001. Springer Netherlands. http://dx.doi.org/10.1007/0-306-47624-x_306.

PATLE, P. N.; NAVNAGE, N. P.; BARANGE, P. K.. Fluorescein Diacetate (FDA): Measure of total microbial activity and as indicator of soil quality. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, [s.l.], v. 7, n. 06, p.2103-2107, 10 jun. 2018. Excellent Publishers. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2018.706.249>.

PEREIRA, J. M.; CAMBRAIA, J.; FONSECA JÚNIOR, E. M.; RIBEIRO, C.. Efeito do alumínio sobre a absorção, o acúmulo e o fracionamento do fósforo em sorgo. **Bragantia**, [s.l.], v. 67, n. 4, p.961-967, dez. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0006-87052008000400019>.

PINHEIRO, P. L.; PASSOS, R. R.; PEÇANHA, A. L.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; MENDONÇA, E. S.. Promoting the growth of *Brachiaria decumbens* by humic acids (HAs). **Australian Journal of Crop Science**, [s.l.], v. 12, n. 07, p.1114-1121, 20 jul. 2018. Southern Cross Publishing. <http://dx.doi.org/10.21475/ajcs.18.12.07.pne1038>.

PORCEL, R.; AROCA, R.; RUIZ-LOZANO, J. M.. Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.181-200, 15 mar. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13593-011-0029-x>.

POZO, M. J; AZCÓN-AGUILAR, C.. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.393-398, ago. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2007.05.004>.

PRIMAVESI, O.; PRIMAVESI, A. C.; CORRÊA, L. A.; AMELIM, M. J. A.; FREITAS, A. R.. **Calagem em pastagem de *Brachiaria decumbens* recuperada com adubação nitrogenada em cobertura**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2004. 32p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Comunicado Técnico, 37).

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2012.

RAO, I. M.; KERRIDGE P. C.; MACEDO M.. Nutritional requirements of *Brachiaria* and adaptation to acid soils. In: Miles J.W., Maass B.L. and Do Valle C.B. (Eds). **Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement**, pp. 53-71, 1996 Cali: CIAT & Brasília: EMBRAPA. (CIAT nº 259).

RAMASAMY, K.; JOE, M.; KIM, K.; LEE, S.; SHAGOL, C. C.; ANANDHAM, R.; CHUNG, J.; ISLAM, Md. R.; SA, T.. Synergistic Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Agricultural Production. **Korean Journal of Soil Science and Fertilizer**, [s.l.], v. 44, n. 4, p.637-649, 31 ago. 2011. Korean Society of Soil Science and Fertilizer. <http://dx.doi.org/10.7745/kjssf.2011.44.4.637>.

ROCHA, L. D. **Efeitos dos ácidos húmicos extraídos de lodo de esgoto em plântulas *Zea mays* L. cultivadas sob restrição hídrica e estresse salino**. 2018. 139 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2018.

ROSA, D. J.; AMBROSINI, V. G.; BRUNETTO, G.; SOARES, C. R. F. S.; BORGHEZAN, M.; PESCADOR, R.. Parâmetros fisiológicos em videiras ‘Paulsen 1103’ (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares em solo contaminado com cobre. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.14-23, 2016. EDP Sciences. <http://dx.doi.org/10.1051/ctv/20163101014>.

SANTANA, S. S.; BRITO, L. F.; AZENHA, M. V.; OLIVEIRA, A. A.; MALHEIROS, E. B.; RUGGIERI, A. C.; REIS, R. A.. Canopy characteristics and tillering dynamics of Marandu palisade grass pastures in the rainy-dry transition season. **Grass and Forage Science**, [s.l.], v. 72, n. 2, p.261-270, 21 jun. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/gfs.12234>.

SHARMA, R. C.; BANIK, P.. Arbuscular mycorrhiza, *Azospirillum* and chemical fertilizers application to baby corn (*Zea mays* L.): Effects on productivity, nutrients use efficiency, economic feasibility and soil fertility. **Journal of Plant Nutrition**, [s.l.], v. 37, n. 2, p.209-223, 17 jan. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01904167.2013.859692>.

SILVA, C. C. F.. **Morfogênese e produção de braquiárias submetidas a diferentes doses de nitrogênio**. 2006. 72f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2006.

SILVA, J. E. P.. **Parâmetros produtivos e atividades de fosfatase ácida em três gramíneas forrageiras cultivadas com dose de fósforo**. 1996. 81f. Dissertação (Mestrado Solo e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1996.

SILVA, J. L.; RIBEIRO, K. G.; HERCULANO, B. N.; PEREIRA, O. G.; PEREIRA, R. C.; SOARES, L. F. P.. Massa de forragem e características estruturais e bromatológicas de cultivares de *Brachiaria* e *Panicum*. **Ciência Animal Brasileira**, [s.l.], v. 17, n. 3,

p.342-348, set. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1089-6891v17i332914>.

SILVA, M. B.. **Caracterização química de exsudatos radiculares de genótipos híbridos comerciais de milho (*Zea mays* L.) e seus efeitos sobre a resposta quimiotática de *Azospirillum brasilense* e sobre o desenvolvimento inicial de plantas de milho**. 2017. 104f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

SOUZA, G. M.; KUWAHARA, F. A.. Fósforo como possível mitigador dos efeitos da deficiência hídrica sobre o crescimento e as trocas gasosas de *Brachiaria brizantha* cv. MG-5 Vitória. **Acta Scientiarum. Agronomy**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.261-267, 19 maio 2009. Universidade Estadual de Maringá. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v31i2.836>.

TAMAYO, E.; GOMEZ-GALLEGO, T.; AZCON-AGUILAR, C.; FERROL, N.. Genome-wide analysis of copper, iron and zinc transporters in the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 5, p.1-13, 14 out. 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00547>.

TAN, S.; YANG, C.; MEI, X.; SHEN, S.; RAZA, W.; SHEN, Q.; XU, Y.. The effect of organic acids from tomato root exudates on rhizosphere colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* T-5. **Applied Soil Ecology**, [s.l.], v. 64, p.15-22, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.10.011>.

TEIXEIRA, S. O.; TEIXEIRA, R. O.; SANTOS, V. B.; CARVALHO, M. A. C.; YAMASHITA, O. M.. Doses de fósforo e nitrogênio na produção de *Brachiaria* híbrida cv. Mulato II. **Revista Ceres**, [s.l.], v. 65, n. 1, p.28-34, fev. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201865010005>.

WERNER, J. C.; PAULINO, V. T.; CANTARELLA, H. Recomendação de adubação e calagem para forrageiras. In: RAIJ, B. van; SILVA, N.M.; BATAGLIA, O.C.; QUAGGIO, J.A.; HIROCE, R.; CANTARELLA, H.; BELLINAZZI, Jr., R.; DECHEN, A.R.; TRANI, P.E. Recomendação de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. Campinas: IAC, 1996. p.263-271. (IAC, Boletim Técnico, 100).

ZANDONADI, D. B.; MATOS, C. R. R.; CASTRO, R. N.; SPACCINI, R.; OLIVARES, F. L.; CANELLAS, L. P.. Alkamides: a new class of plant growth regulators linked to humic acid bioactivity. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-12, dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40538-019-0161-4>

ZANIN, L.; TOMASI, N.; ZAMBONI, A.; SEGA, D.; VARANINI, Z.; PINTON, R.. Water-extractable humic substances speed up transcriptional response of maize roots to nitrate. **Environmental and Experimental Botany**, [s.l.], v. 147, p.167-178, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.12.014>.

ZIMMER, A. H.; MACEDO, M. C. M.; KICHEL, A. N.; ALMEIDA, R. G.. **Degradação, renovação e recuperação de pastagens**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2012. 41p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 189)

CAPÍTULO 2: EFEITO DAS BIOTECNOLOGIAS NA ABSORÇÃO DE NITROGÊNIO EM *Urochloa brizantha* cv. Marandu

RESUMO

A perda da matéria orgânica e exaustão dos nutrientes do solo é possivelmente a principal responsável pela degradação das áreas de pastagens. Nesse contexto, o desenvolvimento de biotecnologias capazes de superar o depauperamento desses solos e reestabelecer a produtividade destas áreas vem ganhando destaque no cenário agrícola. Objetivou-se avaliar o potencial de biotecnologias que integram o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal e substâncias húmicas como estratégia de aumento na produtividade das pastagens. O experimento foi conduzido em casa de vegetação em blocos casualizados, com quatro tratamentos e três repetições, totalizando 12 unidades amostrais. Os tratamentos consistiram de: T1 – testemunha sem inoculação e com 40% da adubação recomendada de NPK; T2 - aplicação do produto comercial AzoTotal[®] via semente; T3 – aplicação foliar de substâncias húmicas (SH) (40 mg L⁻¹ de C) conjuntamente com estirpes *Herbaspirillum seropedicae* - HIV206 e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* - HCC101 aos 15 e 30 DAE; T4 - inoculação do AzoTotal[®] via semente e aplicação foliar de SH+*Herb. spp.* Foram avaliados atributos fitotécnicos (altura, diâmetro do colmo, massa seca de parte aérea - MSPA e massa seca de raiz - MSR), fisiológicos (taxa de assimilação de CO₂ (*A*), condutância estomática (*g_s*), concentração interna de CO₂ (*C_i*), transpiração (*E*), eficiência instantânea de carboxilação (*E_{iC}*), eficiência no uso de água (EUA) e rendimento quântico do fotossistema II (*F_v/F_M*) e nutricional (acúmulo de nitrogênio) em *Urochloa brizantha* cv. Marandu. As biotecnologias influenciaram positivamente nos parâmetros avaliados. O capim-marandu em condições controladas, submetido aos tratamentos T3 e T4 apresentou melhor desempenho nos parâmetros avaliados. Os tratamentos T3 e T4 elevaram a MSPA e MSR do capim-marandu, em média 239,37% e 84,40%, respectivamente. Os maiores acúmulos de N na parte aérea de capim-marandu foram observados nos tratamentos T3 e T4. Houve melhorias nos parâmetros fisiológicos ao aplicar os biofertilizantes e bioestimulante.

Palavras-chave: Capim-marandu, *Herbaspirillum spp.*, *Azospirillum brasilense*, substâncias húmicas.

ABSTRACT

The loss of organic matter and depletion of soil nutrients is possibly the main responsible for the degradation of pasture areas. In this context, the development of biotechnologies capable of overcoming the depletion of these soils and restoring the productivity of these areas has been gaining prominence in the agricultural scenario. The objective was to evaluate the potential of biotechnologies that integrate the use of bacteria that promote plant growth and humic substances as a strategy to increase the productivity of pastures. The experiment was conducted in a greenhouse in randomized blocks, with four treatments and three replications, totaling 12 sample units. The treatments consisted of: T1 - control without inoculation and with 40% of the recommended fertilization of NPK; T2 - application of the commercial product AzoTotal[®] via seed; T3 - foliar application of humic substances (SH) (40 mg L⁻¹ of C) together with strains *Herbaspirillum seropedicae* - HIV206 and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* - HCC101 at 15 and 30 DAE; T4 - inoculation of AzoTotal[®] via seed and foliar application of SH+*Herb.* spp. Phytotechnical attributes (height, stem diameter, dry shoot weight - MSPA and dry root weight - MSR), physiological attributes (CO₂ assimilation rate (*A*), stomatal conductance (*g_s*), internal CO₂ concentration (*C_i*), transpiration (*E*), instant carboxylation efficiency (*E_iC*), water use efficiency (USA) and quantum yield of photosystem II (*F_v/F_M*) and nutritional (nitrogen accumulation) in *Urochloa brizantha* cv. Marandu. positively in the evaluated parameters. The marandu grass under controlled conditions, submitted to treatments T3 and T4 showed better performance in the evaluated parameters. The treatments T3 and T4 increased the MSPA and MSR of the marandu grass, on average 239.37% and 84.40%. The largest accumulations of N in the aerial part of marandu grass were observed in treatments T3 and T4. There were improvements in physiological parameters when applying biofertilizers and biostimulants.

Keywords: Marandu grass, *Herbaspirillum* spp, *Azospirillum brasilense*, humic substances.

1.0 – INTRODUÇÃO

A pecuária é um setor de destaque no agronegócio brasileiro, tendo como base as pastagens, que oferecem de forma prática e econômica o alimento para o rebanho (FERRAZ; FELÍCIO, 2010), sendo estimado que existam no Brasil cerca de 180 milhões de hectares com pastagem (DIAS-FILHO, 2014), sendo sua maioria constituída com poaceae do gênero *Urochloa* (SANTANA et al., 2016).

A expressiva área de cultivo trouxe problemas de degradação destas pastagens, principalmente em sistemas de baixo nível tecnológico, devido ao manejo inadequado desta cultura e da rara utilização de insumos (BRAZ et al., 2004). Diante do exposto, a atividade pecuária acaba sendo caracterizada como insustentável e prejudicial aos agroecossistemas.

Diversos estudos mostram que bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) contribuem com quantidades substanciais de N fixado biologicamente (FUKAMI; CERZINI; HUNGRIA, 2018; BREDA; ALVEZ; REIS, 2016; ALVES et al., 2014), outrossim, disponibilizam P para as culturas através do processo de solubilização de fosfato inorgânico, devido à liberação de ácidos orgânicos na rizosfera (KHAN et al., 2009). Arelado a estes benefícios, as BPCV estimulam o crescimento de plantas de forma direta e indireta, devido à produção de fitormônios proporcionando aumento no sistema radicular, potencializando a utilização de água e nutrientes (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016).

Os efeitos promissores das BPCV em poaceas vêm sendo documentados há vários anos. Dentre as mais estudadas pode-se destacar as associações do gênero *Azospirillum* e *Herbaspirillum* (NAKAO et al., 2018; FERREIRA NETO et al., 2017; PEDREIRA et al., 2017; OFFEMANN et al., 2014).

De forma complementar, têm-se as substâncias húmicas (SH) que podem ser usadas como veículo de inoculação, além do seu efeito bioestimulante, possibilitando melhorias no aumento da absorção de nutrientes (DU JARDIN et al., 2015).

Diante do exposto, a utilização de BPCV em capim-marandu, associados à aplicação de SH, permitindo maior absorção de nitrogênio e desenvolvimento das plantas, sendo um grande passo em direção à recuperação de pastagens degradadas.

2.0 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Caracterização física e química do solo

O solo utilizado foi representativo de uma área de pastagem degradada na região de Jerônimo Monteiro-ES, sendo retirado do terço médio do relevo, na profundidade de 0-20 cm, classificado regionalmente como Argissolo vermelho-amarelo distrófico (CUNHA et al. 2016). Posteriormente, o solo foi seco ao ar e peneirado em peneira com malha de 2,0 mm para obtenção da terra fina seca ao ar (TFSA) e caracterização física e química (Tabela 1).

A calagem no solo foi realizada pelo método da saturação por bases, para elevar o valor V a 50%, utilizando-se o produto comercial GEOX HD, com PRNT= 134% e, incubado por 21 dias em sacos plásticos. Durante a reação do GEOX no solo, a umidade foi mantida a 60% do volume total de poros (VTP).

Tabela 1: Caracterização física e química do solo utilizado no experimento em casa de vegetação.

| pH em H ₂ O | pH em KCl | P | K | Ca | Mg | Al | H | H+Al | SB | T | t | |
|------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------------|------|-----------------------------------|-------|-------------|------|------|-------|-------|--------|
| 4,10 | 3,88 | --mg dm ⁻³ -- | | | -----cmolc dm ⁻³ ----- | | | | | | | |
| V | m | MO | P-rem | S | B | Fe | Cu | Mn | Zn | Areia | Silte | Argila |
| -----%----- | g kg ⁻¹ | mgL ⁻¹ | -----mg dm ⁻³ ----- | | | | -----%----- | | | | | |
| 6,46 | 67,8 | 7,4 | 26,28 | 24,8 | 0,55 | 48,73 | 0,15 | 1,74 | 0,66 | 54,36 | 2,96 | 42,68 |

pH em água: potenciometria em solução solo-água 1:2,5; fósforo e potássio disponível: extraído por Mehlich-1; cálcio, magnésio e alumínio extraível: extraídos com solução de KCl 1 mol L⁻¹; SB = Ca + Mg + K; CTC = SB + (H + Al); V% = SB x 100/CTC; MO: teor de C do solo x 1,724.

2.2 – Experimentação em casa de vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação entre os meses de setembro a outubro de 2019, localizada na área experimental do Centro de Ciências Agrárias de Alegre, pertencente a Universidade Federal do Espírito Santo (latitude 20° 45' Sul, longitude 41° 29' Oeste, com elevação de 112 metros). De acordo com o Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural, a precipitação pluviométrica é de 1.200mm/ano e o clima da região é quente úmido. Segundo a Classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Aw, clima tropical, caracterizado pelo inverno seco e verão chuvoso.

O genótipo de braquiária utilizado foi *Urochloa brizantha* cv. Marandu selecionado previamente com base na eficiência de produção de biomassa e melhor resposta às biotecnologias testadas no capítulo 1.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com quatro tratamentos e três repetições, totalizando 12 unidades amostrais. Os tratamentos consistiram no emprego de diferentes biotecnologias: T1 - Testemunha sem inoculação; T2 - Inoculação via semente com produto comercial líquido AzoTotal[®], a base de *Azospirillum brasilense*, estirpes AbV5 e AbV6; T3 - Aplicação foliar com substâncias húmicas (SH) (dose 40 mg L⁻¹ C) extraídas de vermicomposto combinadas com as estirpes (*Herbaspirillum rubrisubalbicans* - HCC 101 e *Herbaspirillum seropedicae* – HIV 206), sendo realizada a pulverização aos 15 e 30 dias após emergência (DAE); T4 - Inoculação via semente com AzoTotal[®] e aplicação foliar com SH + *Herbaspirillum* spp, pulverizado aos 15 e 30 DAE.

Transcorrido o período de incubação do solo, a fim de se obter um substrato estéril, livre de microrganismos nativos e objetivando melhor expressão do efeito e da interação das BPCV no experimento, realizou-se o processo de autoclavagem do solo por meio da autoclave modelo AHMC da SERCON, submetendo as amostras à pressão de 1.1 atm em 121°C por 20 minutos. Após esta etapa, foi realizada a adubação de implantação com macro e micronutrientes. As doses de nitrogênio, fósforo, potássio e enxofre utilizadas foram de 40, 120, 60 e 40 mg dm⁻³, respectivamente, em que N, P e K foram aplicados na proporção de 40% do recomendado por Novais et al. (1991). Para adubação com micronutrientes foi aplicada as doses de 0,81 mg dm⁻³ B; 1,33 mg dm⁻³ Cu; 1,55 mg dm⁻³ Fe; 3,66 mg dm⁻³ Mn; 0,15 mg dm⁻³ Mo e 4,00 mg dm⁻³ Zn (NOVAIS et al., 1991), sendo utilizados para fornecimento de macro e micronutrientes os seguintes reagentes pa: CH₄N₂O; NH₄H₂PO₄; KH₂PO₄; CaHPO₄; KCl; (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; H₃BO₃; CuSO₄.5H₂O; MnSO₄.H₂O; Na₂SO₄; (NH₄)₂Fe(SO₄)₂.6H₂O; ZnSO₄.7H₂O. A adubação nitrogenada foi parcelada em duas vezes, sendo aplicadas aos 15 e 30 dias após emergência (DAE). A umidade do solo foi mantida em 60% do volume total de poros (VTP).

2.3 – Inoculação de BPCV e obtenção das mudas

Inicialmente as sementes foram desinfestadas superficialmente com álcool etílico a 70% v/v por 1 min e hipoclorito de sódio a 2% por 20 min, em seguida foram lavadas

10 vezes com água deionizada, para retirada de resíduos dos tratamentos anteriores, de acordo com Hungria et al. (2010). Para inoculação do AzoTotal[®] a base de estirpes de *Azospirillum brasiliense* – AbV 5 e AbV 6 adquirido na empresa Total Biotecnologia, foram utilizados 15 mL kg⁻¹ de semente, conforme recomendação do fabricante, objetivando a população mínima de 2 x 10⁸ células por mL de inoculante. A inoculação das sementes foi realizada misturando o inoculante nas sementes e deixando-as secar na sombra por 15 minutos. Posteriormente, foi realizado plantio em bandeja de 128 células, sendo semeadas 4 sementes por célula. Após 10 dias de emergência foram transplantadas 2 mudas para cada vaso definitivo com capacidade de 0,7 dm³, que apresentavam melhor homogeneidade, vigor e tamanho.

2.4 – Extração e aplicação de substâncias húmicas conjuntamente com *Herbaspirillum* spp.

As substâncias húmicas foram isoladas de vermicomposto, sendo utilizados 200 g de vermicomposto (Tabela 2) e 1,8 L de água deionizada (relação vermicomposto: solvente de 1:9). O material foi agitado por um período de 6 horas, e após 12 horas de repouso o extrato solúvel foi retirado por decantação e armazenado. Posteriormente, foi determinado o teor de carbono (C) das substâncias húmicas, conforme metodologia adaptada de Mendonça; Matos (2005).

As estirpes de *Herbaspirillum* HIV206 e HCC101 foram obtidas na coleção do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Para atingir a densidade ótica da suspensão de células bacterianas (10⁸) por mL, conforme descrito por Döbereiner et al., (1995), foi necessário o crescimento das bactérias em meio líquido DYGS por 24 h a 30° C sob agitação a 180 rpm. De acordo com a metodologia de Canellas et al., (2012), o inoculante a base de *Herbaspirillum* spp. foi preparado diluindo 200 mL de bactérias em 800 mL (água + substâncias húmicas) a pH 7,0 ajustado com hidróxido de sódio, de modo a obter concentração final de 40 mg L⁻¹ de C das SH. Para pulverização foliar aos 20 e 40 dias após emergência das plantas foi aplicada a concentração de 40 mg L⁻¹ de C das SH conforme descrito por Pinheiro et al. (2018), juntamente com 10⁸ células mL⁻¹ da estirpe HIV206 e HCC101.

A primeira aplicação da combinação SH + *Herb.* spp. foi realizada aos 15 DAE, entre às 18 e 19 h, pulverizando 5,2 mL vaso⁻¹ com auxílio de um pulverizador manual

de pressão com bico regulável, correspondendo a 2,6 mL planta⁻¹. Transcorrido 30 DAE, foi realizada a segunda aplicação da combinação SH + *Herb.* spp. acompanhando o mesmo horário da 1ª aplicação, utilizando o mesmo equipamento de aplicação, aplicando 8,5 mL vaso⁻¹, correspondendo a 4,25 mL planta⁻¹.

Tabela 2: Composição média do vermicomposto usado na extração de substâncias húmicas.

| pH | C | P | K ⁺ | Ca ²⁺ | Mg ²⁺ | Al ³⁺ | H+Al | SB | CTC |
|------|--------------------|---------------------|---|------------------|------------------|------------------|------|-------|-------|
| | g kg ⁻¹ | mg dm ⁻³ | -----cmol _c dm ⁻³ ----- | | | | | | |
| 6,29 | 60,4 | 987,50 | 2,57 | 7,71 | 8,25 | 0,0 | 1,80 | 18,52 | 20,32 |

pH em H₂O; SB: soma de bases trocáveis; CTC: capacidade de troca de cátions.

2.4 – Avaliação dos atributos fisiológicos

Aos 45 dias após a emergência foram analisadas medidas de trocas gasosas, rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_M) e coleta do experimento.

A medição das trocas gasosas foi realizada em folhas totalmente expandidas, entre 7:00 e 09:00 horas, por meio do analisador a gás infravermelho portátil (IRGA), modelo LI 6400 XT Portable Photosynthesis System (LI-COR, Lincoln, NE, USA), utilizando uma fonte luminosa fixa em 1000 mmol m⁻² s⁻¹ de intensidade de fluxo de fótons fotossintéticos, obtendo-se as seguintes variáveis: *A* – taxa de assimilação líquida de CO₂ (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹); *E* – taxa de transpiração (mmol H₂O m⁻² s⁻¹); *g_s* – condutância estomática (mol H₂O m⁻² s⁻¹); *C_i* – concentração interna de CO₂ (μmol CO₂ mol⁻¹). De posse desses dados foram quantificadas a eficiência instantânea no uso da água (EUA) (*A/E*) [(μmol CO₂ m⁻² s⁻¹)/(mmol H₂O m⁻² s⁻¹)] e a eficiência instantânea de carboxilação (*A/C_i*) [(μmol CO₂ m⁻² s⁻¹)/(μmol CO₂ mol⁻¹)] (KONRAD et al., 2005).

A determinação do rendimento quântico do fotossistema II (F_v/F_M) foi quantificada com utilização de fluorômetro portátil de luz modulada (PSI FluorPen, modelo FP 100, Drasov, República Checa), após adaptação das folhas ao escuro por 15 minutos.

2.5 – Avaliação dos atributos fitotécnicos e nutricional

A determinação da altura total das plantas foi realizada com régua graduada, já a mensuração do diâmetro do colmo foi determinada com auxílio de paquímetro digital.

A parte aérea e as raízes foram coletadas, armazenadas em sacos de papel e colocadas em estufa a 65 °C durante 72 horas (até atingir peso constante) para determinação da massa seca. Após a secagem em estufa, as amostras foram submetidas à trituração em moinho de facas para posterior determinação de nitrogênio (N).

A análise química do N foi realizada por digestão sulfúrica seguida de destilação Kjeldahl, de acordo com Embrapa (2000).

2.6 – Análises estatísticas

Os resultados foram analisados estatisticamente por meio da análise de variância com o teste F. As variáveis significativas foram comparadas pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade, utilizando-se o programa R (ExpDes) (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016). Para as variáveis de acúmulo de nitrogênio e diâmetro do colmo, os dados foram transformados $\sqrt{x + 0,5}$ para obtenção da normalidade e homogeneidade da variância. Para confecção dos gráficos utilizou-se o software SigmaPlot® versão 10 (SYSTAT SOFTWARE Inc, 2006).

3.0 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 – Atributos fitotécnicos e nutricional

Com base nos resultados obtidos, verificou-se que houve diferença significativa ($p \leq 0,01$) dos parâmetros fitotécnicos e nutricional em função das biotecnologias empregadas (Tabela 3).

No presente estudo, o tratamento T4 (AzoTotal[®] + SH+*Herb. spp.*) proporcionou maior altura de plantas (41,92 cm), seguido do tratamento T3 (SH+*Herb. spp.*) (40,61 cm) (Figura 1c). Ao comparar o tratamento T2 (AzoTotal[®]) com a testemunha sem inoculação (T1), observou-se incremento na altura das plantas de 33,72%. De forma similar, observaram no diâmetro do colmo em que registrou valores médios de 4,19 e 4,16 mm para T4 e T3, respectivamente, sendo superiores aos demais tratamentos (Figura 1d). Os tratamentos AzoTotal[®] e controle não diferiram entre si, porém ao compará-los verificou-se acréscimo de 41,41% de T2 em relação a T1.

Tabela 3: Resumo das análises de variância para as variáveis altura de planta (AP) (cm), diâmetro do colmo (DC) (mm), massa seca da parte aérea (MSPA) (mg vaso⁻¹), massa seca de raiz (MSR) (mg vaso⁻¹) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (N) (mg vaso⁻¹) em *Urochloa brizantha* cv. Marandu sob diferentes biotecnologias.

| F. V. | G. L. | Quadrados médios | | | | |
|--------------------|-------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| | | AP | DC | MSPA | MSR | N |
| Tratamentos | 3 | 287,75** | 0,32** | 42154** | 8130,60** | 1,80** |
| Bloco | 2 | 29,11 ^{ns} | 0,02 ^{ns} | 1655 ^{ns} | 88,60 ^{ns} | 0,05 ^{ns} |
| Resíduo | 6 | 18,25 | 0,01 | 2316 | 833,40 | 0,12 |
| Média geral | | 33,19 | 3,16 | 201,59 | 135,10 | 7,06 |
| CV (%) | | 3,02 | 5,32 | 23,87 | 21,37 | 13,22 |

F. V. – Fonte de variação; CV – Coeficiente de variação; G. L. – Grau de liberdade. Significativo pelo teste F: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: não significativo.

Dartora et al. (2013) não verificaram efeito significativo sobre a altura e diâmetro do colmo de milho ao avaliar as respostas à adubação nitrogenada associada à inoculação via semente com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. Por outro lado, Bosa (2014) obteve resultados positivos, constatando incrementos variando de 1,64 a 4,74% na altura e 3,47 a 7,60% no diâmetro do colmo de plantas de *U. brizantha* cv. Xaraés ao utilizar bactérias diazotróficas. Os incrementos significativos observados neste trabalho podem decorrer do alongamento do caule promovido pelos fitormônios promotores do crescimento responsáveis pelos processos de divisão e expansão celular produzidos pelas BPCV (MOREIRA et al., 2010; CHAVES et al., 2015) e, também atribuídos ao efeito auxínico pela aplicação de substâncias húmicas (ZANDONADI et al., 2019).

Analisando a relação entre os parâmetros altura e diâmetro do colmo das plantas observou-se que os diferentes atributos apresentam correlação (0,997; $p = 0,01$). Castagnara et al. (2011) relataram correlação (0,76; $p = 0,01$) entre altura e diâmetro do pseudocolmo em *Urochloa* sp. cv. Mulato. O alongamento e espessamento do colmo são justificados pela altura das plantas, em que ganhos em altura do dossel geralmente refletem em aumento no diâmetro das estruturas de suporte (CASTAGNARA et al., 2011; BOSA, 2014).

A partir dos resultados de MSPA do capim-marandu é possível observar maiores valores ao aplicar as biotecnologias T4 (309,71 mg vaso⁻¹) e T3 (294,34 mg vaso⁻¹), correspondendo a aumento de 329,44 e 308,14%, respectivamente, superiores ao controle. A aplicação do tratamento T2 (130,20 mg vaso⁻¹), embora não seja observada

diferença estatística comparado ao T1, registrou-se incremento 80,53% em relação ao controle, evidenciando os benefícios da inoculação das estirpes de *A. brasiliense* (Figura 1a).

O efeito das biotecnologias na variável massa seca de raízes (MSR) ($p \leq 0,01$), revelou que a maior produção de MSR foi obtida com aplicação de SH+*Herb. spp.* (194,70 mg vaso⁻¹), acompanhado do tratamento T4 (161,57 mg vaso⁻¹). Nota-se que as plantas inoculadas com T2 apresentaram menor MSR, não diferindo do controle, embora verificou-se incremento de 22,58% comparado ao T1 (Figura 1b).

A resposta positiva dos componentes da produção com aplicação de substâncias húmicas e bactéria diazotrófica confirma os efeitos diretos dos biofertilizantes no desenvolvimento e produtividade de braquiária. De fato, estes efeitos foram relatados em estudos recentes. Pinheiro et al. (2018) ao aplicar ácidos húmicos em braquiária promoveram aumento de até 196% na biomassa da parte aérea. Ações benéficas das bactérias diazotróficas foram relatadas por Leite et al. (2019) ao observarem incremento significativo na produção de forragem em *U. brizantha* cv. Marandu, mesmo com redução de 20% na adubação nitrogenada.

O aumento na produção de biomassa de parte aérea e raiz, na presença de inóculos de *Herbaspirillum spp.* conjuntamente com SH, pode ser devido à capacidade das bactérias de promoverem crescimento de plantas por meio da produção de fitormônios, além do efeito bioestimulante vegetal ligados à bioatividade das substâncias húmicas e do estímulo da H⁺-ATPases da membrana plasmática, levando a maior permeabilidade da parede celular (ZANDONADI et al., 2019; AZEVEDO et al., 2019).

Em relação ao acúmulo de N na parte aérea do capim-marandu (Figura 1e), os tratamentos T4 (11,76 mg vaso⁻¹) e T3 (9,16 mg vaso⁻¹) diferenciaram estatisticamente de T1; e T3 não diferiu de T2. Os maiores acúmulos nos tratamentos que tiveram aplicação de SH+*Herb. spp.* podem ter relação com aumento da população bacteriana diazotrófica endofítica, devido às duas aplicações que foram feitas aos 15 e 30 DAE. Em estudo semelhante realizado em milho, Inagaki (2014) avaliando a inoculação conjunta de *A. brasiliense* e *H. seropedicae* também obteve resultados significativos de maiores valores de N foliar em comparação ao tratamento sem inoculação. De forma similar, Breda et al. (2016) observaram em plantas inoculadas com *H. seropedicae* o aumento no acúmulo de N na parte aérea de milho de 19% e para aqueles inoculados com *A. brasiliense* foi de 10%, comparado ao controle em altas concentrações de N.

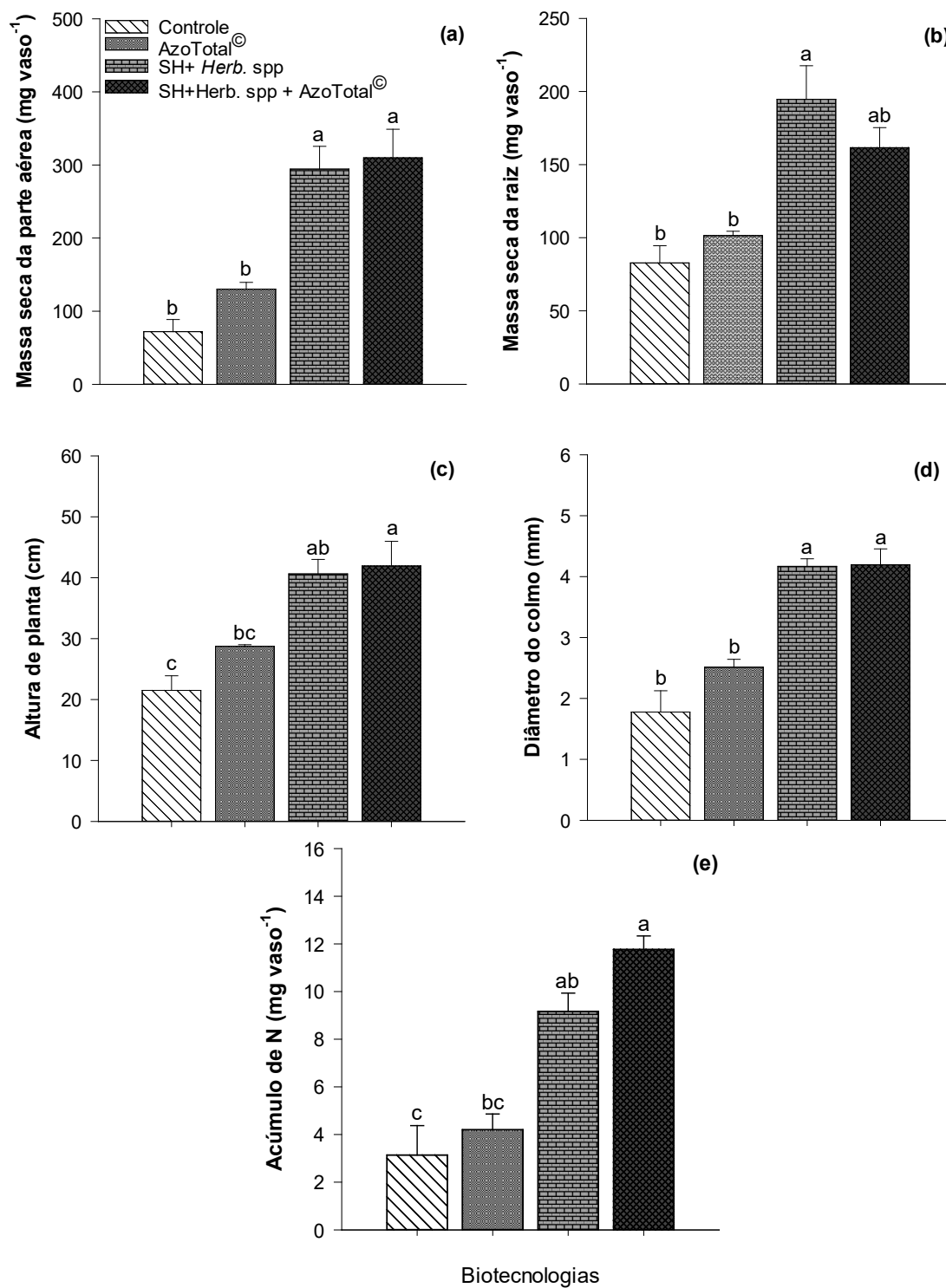


Figura 1: Massa seca de parte aérea (a), massa seca de raiz (b), altura de planta (c), diâmetro do colmo (d) e acúmulo de nitrogênio (e) na parte aérea de *Urochloa brizantha* cv. Marandu aos 45 dias. Médias \pm erro padrão seguidas da mesma letra maiúscula, não diferem entre si, pelo teste de Tukey para $p \leq 0,05$.

Os maiores acúmulos de N nos tratamentos T3 e T4 decorrem da capacidade de FBN das estirpes inoculadas. Ademais, a presença das SH possibilitou maior crescimento radicular e conseqüentemente, aumento na absorção de nutrientes.

Verificou-se que houve diferenças significativas em resposta à aplicação de diferentes biotecnologias sobre as variáveis taxa de assimilação de CO₂ (*A*), transpiração (*E*) ($p \leq 0,05$), concentração interna de CO₂ (*C_i*), eficiência instantânea de carboxilação (*E_iC*) e rendimento quântico do fotossistema II (*F_v/F_M*) ($p \leq 0,01$). Observa-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na condutância estomática (*g_s*) e eficiência no uso da água (*EUA*) (Tabela 5). Os valores observados de trocas gasosas estão dentro da faixa de variação observada por vários autores (MATTOS; GOMIDE; HUAMAN, 2005; SOUZA; KUWAHARA, 2009; DANIEL et al., 2018).

Tabela 4: Resumo das análises de variância para as variáveis taxa de assimilação de CO₂ (*A*) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (*g_s*) ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração interna de CO₂ (*C_i*) ($\mu\text{mol mol}^{-1}$), transpiração (*E*) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), eficiência no uso da água (*EUA*) [$(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1})/(\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1})$], eficiência instantânea de carboxilação (*E_iC*) [$(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1})/(\mu\text{mol mol}^{-1})$] e rendimento quântico do fotossistema II (*F_v/F_M*) em *Urochloa brizantha* cv. Marandu sob diferentes biotecnologias.

| F.V. | G. L. | Quadrados médios | | | | | | |
|--------------------|-------|--------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|------------------------------------|
| | | <i>A</i> | <i>g_s</i> | <i>C_i</i> | <i>E</i> | <i>EUA</i> | <i>E_iC</i> | <i>F_v/F_M</i> |
| Trat. | 3 | 17,64* | 4,4E-4 ^{ns} | 6262,1** | 0,55* | 0,69 ^{ns} | 7,6E-3** | 1,3E-3** |
| Bloco | 2 | 0,73 ^{ns} | 8,9E-5 ^{ns} | 233,0 ^{ns} | 0,09 ^{ns} | 0,27 ^{ns} | 4,3E-4 ^{ns} | 2,3E-4 ^{ns} |
| Resíduo | 6 | 2,44 | 3,9E-4 | 522,1 | 0,07 | 0,70 | 2,3E-4 | 5,5E-5 |
| Média geral | | 13,88 | 0,076 | 131,67 | 2,75 | 5,07 | 0,12 | 0,80 |
| CV (%) | | 11,26 | 26,11 | 17,35 | 9,76 | 16,50 | 12,07 | 0,93 |

F. V. – Fonte de variação; Trat. – Tratamentos; CV – Coeficiente de variação; G.L. – Grau de liberdade. Significativo pelo teste F: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: não significativo.

A aplicação de biotecnologias de modo geral influenciou positivamente nos parâmetros de trocas gasosas e *F_v/F_M*. A taxa de assimilação de CO₂ (*A*) das plantas tratadas com biotecnologias aumentou em média 44% comparado ao controle (T1), destacando o tratamento T4 (16,11 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), que demonstrou superioridade comparada aos demais tratamentos, seguidos de T3 e T2 em que apresentaram acréscimos na *A* de 37,09 e 40,53%, respectivamente, em relação à testemunha (Figura 2a).

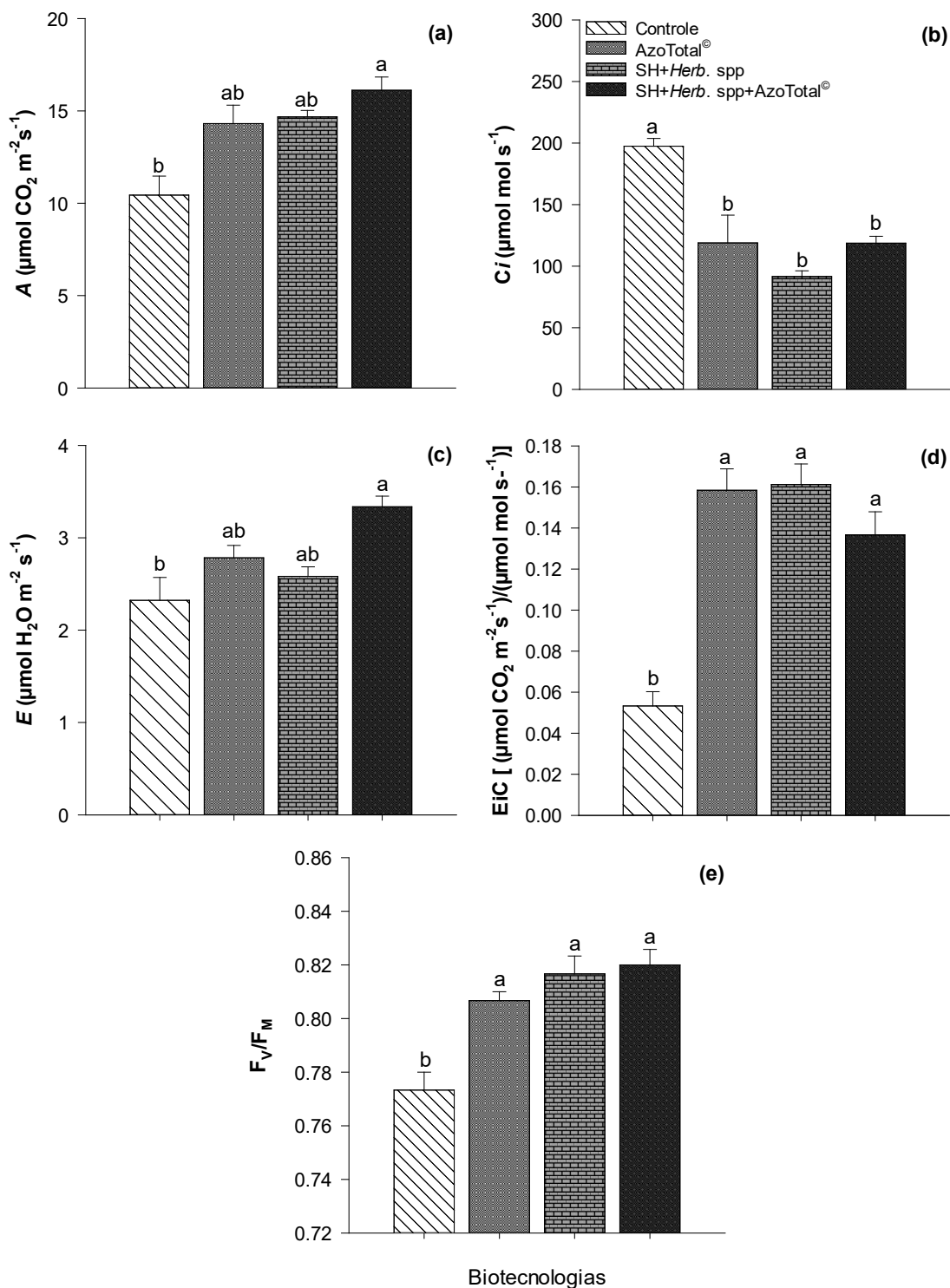


Figura 2: A: taxa de assimilação de CO_2 (a); C_i : concentração interna de CO_2 (b); E: transpiração (c); E_iC : eficiência instantânea de carboxilação (d) e F_v/F_m : rendimento quântico do fotossistema II (e). Médias \pm erro padrão seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey para $p \leq 0,05$.

Os valores da A são parcialmente similares com os descritos para *Urochloa* spp., variando de 15 a 25 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (BULEGON et al., 2017). De forma similar, foi

observado para transpiração (E), em que houve incremento médio de 24,88% ao aplicar as biotecnologias, destacando as plantas que receberam tratamentos T4 (3,33 mmol H₂O m⁻² s⁻¹), T2 e T3 (2,78 e 2,58 mmol H₂O m⁻² s⁻¹), respectivamente (Figura 2c).

A eficiência no uso da água (EUA) refere-se à relação entre taxa de assimilação de CO₂ e transpiração, logo plantas com alta taxa fotossintética e baixa C_i podem induzir a redução da g_s , diminuindo a E e aumentando a EUA, assim podem produzir mais com menor quantidade de água (SILVA et al., 2016). Os valores da EUA neste trabalho variaram de 4,56 a 5,68 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹/mmol H₂O m⁻² s⁻¹, no entanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 5). As biotecnologias elevaram a EUA de 6,35 a 24,54%, comparado ao T1.

Os valores da condutância estomática (g_s) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, sendo observado g_s média de 0,079 mol m⁻² s⁻¹. A partir do ponto de menor g_s obtido no tratamento T1 (testemunha sem inoculação), verificou-se nos demais tratamentos aumento médio de na g_s 15,71% em relação ao controle.

A maior concentração interna de CO₂ (C_i) ocorreu no tratamento T1 (197,43 μmol mol⁻¹), ao aplicar as biotecnologias observou redução média na C_i de 44,44%. A menor assimilação de CO₂ associada ao menor consumo de CO₂ intracelular que pode decorrer da Rubisco não está totalmente ativada, assim o CO₂ não é carboxilado e incorporado ao Ciclo de Calvin, aumentando a C_i (BULEGON et al., 2017).

A menor relação da taxa de assimilação de CO₂ e concentração interna de CO₂ (EiC) registrada nas plantas do tratamento T1 (0,053 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹/μmol mol⁻¹). Com a utilização de SH e BPCV houve melhorias na EiC, indicando maior eficiência no consumo de CO₂.

Em condições ideais de crescimento, a eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_m) pode variar de 0,750 a 0,850, possibilitando inferir o estado fisiológico da planta. Valores inferiores são indicativos de condições inibitórias do PSII (BAKER; ROSENQVIST, 2004; GUIDI; LO PICCOLO; LANDI, 2019). Nota-se na figura 2e que os valores médios variaram de 0,773 a 0,820, indicando não haver dano ao aparelho fotossintético.

A aplicação de biotecnologia demonstrou melhorias significativas no F_v/F_m , sendo elevado em média 5,30% em relação à testemunha. Estudo desenvolvido por Lin et al. (2016) com *Camellia sinensis* L. relataram que a deficiência de N reduz o F_v/F_m . Para os autores, a deficiência de N diminuiu a capacidade de transporte de elétrons,

limitando a síntese de ATP e afetando a Rubisco. Todos os tratamentos, exceto o T1, tiveram maior aporte de N, em decorrência da FBN. Nos tratamentos T3 e T4 além dos benefícios das BPCV, provavelmente, houve maior transporte e assimilação de nitratos pelas plantas em virtude da aplicação de SH (ZANIN et al., 2018).

4.0 – CONCLUSÕES

O capim-marandu em condições controladas submetido aos tratamentos T3 e T4 apresentou melhor desempenho nos parâmetros avaliados.

Os tratamentos T3 e T4 elevaram a MSPA e MSR do capim-marandu, em média 239,37% e 84,40%, respectivamente.

Os maiores acúmulos de N na parte aérea de capim-marandu foram observados nos tratamentos T3 e T4.

Houve melhorias nos parâmetros fisiológicos ao aplicar os biofertilizantes e bioestimulante.

5.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, G. C.; VIDEIRA, S. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant and Soil**, [s.l.], v. 387, n. 1-2, p.307-321, 19 out. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-014-2295-2>.

AZEVEDO, I. G.; OLIVARES, F. L.; RAMOS, A. C.; BERTOLAZI, A. A.; CANELLAS, L. P.. Humic acids and *Herbaspirillum seropedicae* change the extracellular H⁺ flux and gene expression in maize roots seedlings. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-10, 24 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40538-019-0149-0>.

BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E.. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 55, n. 403, p.1607-1621, 16 jul. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erh196>.

BOSA, C. K.. **Capim xaraés inoculado com bactérias diazotróficas associativas**. 2014. 117f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal do Mato Grosso, Rondonópolis, 2014.

BRAZ, S. P.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J.; BODDEY, R. M. **Degradação de Pastagens, Matéria Orgânica do Solo e a Recuperação do Potencial Produtivo em Sistemas de Baixo “Input” Tecnológico na Região dos Cerrados**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2004. 8 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico, 9).

BREDA, F. A. F.; ALVES, G. C.; REIS, V. M.. Produtividade de milho na presença de doses de N e de inoculação de *Herbaspirillum seropedicae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 51, n. 1, p.45-52, jan. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2016000100006>.

BULEGON, L. G.; BATTISTUS, A. G.; GUIMARÃES, V. F.; INAGAKI, A. M.; OFFEMANN, L. C.; SOUZA, A. K. P.; OLIVEIRA, P. S. R.. Physiological responses of *Urochloa ruziziensis* inoculated with *Azospirillum brasilense* to severe drought and rehydration conditions. **Australian Journal of Crop Science**, [s.l.], v. 11, n. 10, p.1283-1289, 20 out. 2017. Southern Cross Publishing. <http://dx.doi.org/10.21475/ajcs.17.11.10.pne577>.

CANELLAS, L. P.; BALMORI, D. M.; MÉDICI, L. O.; AGUIAR, N. O.; CAMPOSTRINI, E.; ROSA, R. C. C.; FAÇANHA, A. R.; OLIVARES, F. L.. A combination of humic substanceness and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, [s.l.], v. 366, n. 1-2, p.119-132, 23 ago. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-012-1382-5>.

CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M.. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, [s.l.], v. 103, p.117-130, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020>.

CASTAGNARA, D. D.; MESQUITA, E. E.; NERES, M. A.; OLIVEIRA, P. S. R.; DEMINICIS, B. B.; BAMBERG, R.. Valor nutricional e características estruturais de gramíneas tropicais sob adubação nitrogenada. **Archivos de Zootecnia**, [s.l.], v. 60, n. 232, p.931-942, dez. 2011. Instituto de Salud Carlos III/BNCS/SciELO Espana. <http://dx.doi.org/10.4321/s0004-05922011000400010>.

CHAVES, V. A.; SANTOS, S. G.; SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R.C.; REIS, V. M.. Desenvolvimento inicial de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s.l.], v. 39, n. 6, p.1595-1602, dez. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/01000683rbc20151144>.

CUNHA, A. M.; FEITOZA, H. N.; FEITOZA, L. R.; OLIVEIRA, F. S.; LANI, J. L.; CARDOSO, J. K. F.; TRINDADE, F. S.. Update to the legend of the reconnaissance soil map of Espírito Santo state and the implementation of Geobases interface for data usage in GIS. **Revista Geografares**, [s.l.], v. 23, p.32-65, 22 dez. 2016. Geografares. <http://dx.doi.org/10.7147/geo23.12356>.

DANIEL, E. S.; CAMPOS, M. L.; MIQUELLUTI, D. J.; MOTA, C. S.; SBRISSIA, A. F.. Growth, Gas exchange and mineral nutrition of xaraés grass (*Brachiaria brizantha* cv. xaraés) in a Haplic Cambisol with increasing copper doses. **Journal of Experimental Agriculture International**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.1-13, 24 set. 2018. Sciencedomain International. <http://dx.doi.org/10.9734/jeai/2018/43648>.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; SANDER, G.. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [s.l.], v. 17, n. 10, p.1023-1029, out. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-43662013001000001>.

DIAS-FILHO, M.B. **Diagnóstico das Pastagens no Brasil**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2014. 36p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 402).

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 60 p.

DU JARDIN, P.. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 196, p.3-14, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>.

FERRAZ, J. B. S.; FELÍCIO, P. E.. Production systems – An example from Brazil. **Meat Science**, [s.l.], v. 84, n. 2, p.238-243, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.06.006>.

FERREIRA NETO, R. A.; FREITAS, A. D. S.; GIONGO, V.; CAMARGO, P. B.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. B.. Nitrogen fixation of Poaceae and Leguminosae in a green manure experiment in the Brazilian semiarid region. **Australian Journal of Crop Science**, [s.l.], v. 11, n. 11, p.1474-1480, 20 nov. 2017. Southern Cross Publishing. <http://dx.doi.org/10.21475/ajcs.17.11.11.pne726>.

FUKAMI, J.; CERZINI, P.; HUNGRIA, M.. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **Amb Express**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-12, 4 maio 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>.

GOSWAMI, D.; THAKKER, J. N.; DHANDHUKIA, P. C.. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. **Cogent Food & Agriculture**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.1-19, 19 jan. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>.

GUIDI, L.; LO PICCOLO, E.; LANDI, M.. Chlorophyll fluorescence, photoinhibition and abiotic stress: Does it make any difference the fact to be a C3 or C4 species?. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 10, p.1-11, 14 fev. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.00174>.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, [s.l.], v. 331, n. 1-2, p.413-425, 13 jan. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>.

INAGAKI, A. M.. **Bactérias promotoras de crescimento de plantas na cultura do milho submetidos a diferentes níveis de pH do solo**. 2014. 79f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2014.

KHAN, A. A.; JILANI, G.; AKHTAR, M. S.; NAQVI, S. M. S.; RASHEED, M. H.. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. **J. Agric. Biol. SCI**, v. 1, n. 1, p. 48-58, 2009.

KONRAD, M. L. F.; SILVA, J. A. B.; FURLANI, P. R.; MACHADO, E. C.. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia**, [s.l.], v. 64, n. 3, p.339-347, 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0006-87052005000300004>.

LEITE, R. C.; SANTOS, J. G. D.; SILVA, E. L.; ALVES, C. R. C. R.; HUNGRIA, M.; LEITE, R. C.; SANTOS, A. C.. Productivity increase, reduction of nitrogen fertiliser use and drought-stress mitigation by inoculation of marandu grass (*Urochloa brizantha*) with *Azospirillum brasilense*. **Crop and Pasture Science**, [s.l.], v. 70, n. 1, p.61-67, 2019. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/cp18105>.

LIN, Z.; ZHONG, Q.; CHEN, C.; RUAN, Q.; CHEN, Z.; YOU, X.. Carbon dioxide assimilation and photosynthetic electron transport of tea leaves under nitrogen deficiency. **Botanical Studies**, [s.l.], v. 57, n. 1, p.1-12, 17 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40529-016-0152-8>.

MATTOS, J. L. S.; GOMIDE, J. A.; HUAMAN, C. A. M.. Crescimento de espécies do gênero *Brachiaria*, sob déficit hídrico, em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s.l.], v. 34, n. 3, p.746-754, jun. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-35982005000300005>.

MENDONÇA, E. S., MATOS, E. S.. Matéria orgânica do solo; métodos de análises. Viçosa: UFV; 2005. 107 p.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p.74-99, 2010.

NAKAO, A. H.; ANDREOTTI, M.; SOARES, D. A.; MODESTO, V. V.; DICKMANN, L.. Intercropping *Urochloa brizantha* and sorghum inoculated with *Azospirillum brasilense* for silage. **Revista Ciência Agronômica**, [s.l.], v. 49, n. 3, p.501-511, 2018. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20180057>.

NOVAIS, R. F.; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. F.. Ensaio em ambiente controlado. In: OLIVEIRA, A. J.; GARRIDO, W. E.; ARAUJO, J. D.; LOURENÇO, S.. **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. Brasília: EMBRAPA-SEA, 1991. p.189-253. (EMBRAPA-SEA. Documento, 3).

OFFEMANN, L. C.; GUIMARAES, V. F.; SOUZA, R. F. B.; INAGAKI, A. M.; BATTISTUS, A. G.; RAMPIM, L.. Interação entre Bactérias *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* com Adubação Nitrogenada, Visando o Fornecimento de Nitrogênio para o Milho. **Scientia Agraria Paranaensis**, [s.l.], v. 14, n. , p.276-280, 17 dez. 2015. Revista Scientia Agraria Paranaensis (SAP). <http://dx.doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v14nsupp276-280>.

PEDREIRA, B. C.; BARBOSA, P. L.; PEREIRA, L. E. T.; MOMBACH, M. A.; DOMICIANO, L. F.; PEREIRA, D. H.; FERREIRA, A.. Tiller density and tillering on *Brachiaria brizantha* cv. marandu pastures inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s.l.], v. 69, n. 4, p.1039-1046, ago. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9034>.

PINHEIRO, P. L.; PASSOS, R. R.; PEÇANHA, A. L.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; MENDONÇA, E. S.. Promoting the growth of *Brachiaria decumbens* by humic acids (HAs). **Australian Journal of Crop Science**, [s.l.], v. 12, n. 07, p.1114-1121, 20 jul. 2018. Southern Cross Publishing. <http://dx.doi.org/10.21475/ajcs.18.12.07.pne1038>.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2012.

SANTANA, S. S.; BRITO, L. F.; AZENHA, M. V.; OLIVEIRA, A. A.; MALHEIROS, E. B.; RUGGIERI, A. C.; REIS, R. A.. Canopy characteristics and tillering dynamics of Marandu palisade grass pastures in the rainy-dry transition season. **Grass and Forage**

Science, [s.l.], v. 72, n. 2, p.261-270, 21 jun. 2016. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/gfs.12234>.

SILVA, A. D.; BRITO, M. E. B.; FRADE, L. J. G.; NOBRE, R. G.; COSTA, F. B.; MELO, A. S.; SILVA, L. D. A.. Crescimento e trocas gasosas de genótipos de feijão-caupi sob estratégias de cultivo. **Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.745-758, 23 jun. 2016. Instituto de Pesquisas Ambientais em Bacias Hidrográficas (IPABHi). <http://dx.doi.org/10.4136/ambiente-agua.1880>.

SILVA, C. C. F.; BONOMO, P.; PIRES, A. J. V.; MARANHÃO, C. M.A.; PATÊS, N. M.S.; SANTOS, L. C.. Características morfogênicas e estruturais de duas espécies de braquiária adubadas com diferentes doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s.l.], v. 38, n. 4, p.657-661, abr. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-35982009000400010>.

SOUZA, G. M.; KUWAHARA, F. A.. Fósforo como possível mitigador dos efeitos da deficiência hídrica sobre o crescimento e as trocas gasosas de *Brachiaria brizantha* cv. MG-5 Vitória. **Acta Scientiarum. Agronomy**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.261-267, 19 maio 2009. Universidade Estadual de Maringa.
<http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v31i2.836>.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 5.ed. 2013. 918p.

TORRES JUNIOR, A. de M.; AGUIAR, G. A. M. Pecuária de corte no Brasil: potencial e resultados econômicos. **Encontro de Adubação de Pastagens da Scot Consultoria-Tec-Fértil**, v. 1, n. 2013, p. 9-14, 2013.

ZANDONADI, D. B.; MATOS, C. R. R.; CASTRO, R. N.; SPACCINI, R.; OLIVARES, F. L.; CANELLAS, L. P.. Alkamides: a new class of plant growth regulators linked to humic acid bioactivity. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-12, dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40538-019-0161-4>

ZANIN, L.; TOMASI, N.; ZAMBONI, A.; SEGA, D.; VARANINI, Z.; PINTON, R.. Water-extractable humic substances speed up transcriptional response of maize roots to nitrate. **Environmental and Experimental Botany**, [s.l.], v. 147, p.167-178, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.12.014>.

CAPÍTULO 3: EFEITO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EM *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 INOCULADOS COM *Bradyrhizobium* spp. CULTIVADO EM SOLO DE PASTAGEM DEGRADADA

RESUMO

A adição de substâncias húmicas (SH) influencia o metabolismo das plantas, alterando assim o seu crescimento. Neste sentido, o amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) por ser um material promissor na recuperação de pastagem degradada, e pelo aporte de nitrogênio em virtude do elevado potencial de fixação biológica de nitrogênio, pode ter seu potencial produtivo maximizado com aplicação de SH. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de SH extraídas de vermicomposto, no crescimento e no conteúdo de nutrientes em plantas de amendoim forrageiro (*A. pintoi* cv. Amarillo MG 100) inoculados com *Bradyrhizobium* spp. O experimento foi realizado em casa de vegetação, em delineamento de blocos casualizados, com cinco doses de substâncias húmicas (0; 20; 40; 60 e 80 mg L⁻¹ de C) com cinco repetições. As plantas cresceram em vasos 5 dm³, tendo como substrato solo de pastagem degradada. Aos 60 dias após a emergência, foram avaliados os parâmetros: massa seca de parte aérea (MSPA) e raiz (MSR), número de nódulo (NNOD), teores e conteúdos de N, P, K, Ca e Mg no tecido da parte aérea, teor de clorofila total, relação clorofila a/b e eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_M). Os resultados evidenciaram que a adição de SH extraída de vermicomposto associado à estirpe de *Bradyrhizobium* spp influencia positivamente no aumento de massa seca da parte aérea, altura e número de nódulos. As substâncias húmicas elevaram o rendimento quântico máximo das plantas de *Arachis pintoi* cv. Amarillo, indicando melhorias no centro de reação do PSII. A concentração de 40 mg L⁻¹ de C possibilita obter a absorção máxima de N, K, Ca e Mg em amendoim forrageiro.

Palavras-chave: amendoim forrageiro, bioestimulante, bactéria diazotrófica, fixação biológica de nitrogênio.

ABSTRACT

The addition of humic substances (SH) influences the metabolism of plants, thus altering their growth. In this sense, the forage peanut (*Arachis pintoii*) for being a promising material in the recovery of degraded pasture, and for the nitrogen supply due to the high potential of biological nitrogen fixation, its productive potential can be maximized with application of SH. The aim of this work was to evaluate the effect of different concentrations of SH extracted from vermicompost, on growth and nutrient content in forage peanut plants (*A. pintoii* cv. Amarillo MG 100) inoculated with *Bradyrhizobium* spp. The experiment was carried out in a greenhouse, in a randomized block design, with five doses of humic substances (0; 20; 40; 60 and 80 mg L⁻¹ of C) with five replications. The plants grew in pots 5 dm³, with degraded pasture soil as substrate. At 60 days after emergence, the parameters were evaluated: dry mass of aerial part (MSPA) and root (MSR), nodule number (NNOD), contents and contents of N, P, K, Ca and Mg in the tissue of the aerial part, total chlorophyll content, chlorophyll a / b ratio and quantum efficiency of photosystem II (F_v/F_M). The results showed that the addition of SH extracted from vermicompost associated with the *Bradyrhizobium* spp strain has a positive influence on the increase in dry mass of the aerial part, height and number of nodules. Humic substances increased the maximum quantum yield of *Arachis pintoii* cv. Amarillo, indicating improvements in the PSII reaction center. The concentration of 40 mg L⁻¹ of C makes it possible to obtain the maximum absorption of N, K, Ca and Mg in forage peanuts.

Keywords: forage peanut, biostimulant, diazotrophic bacteria, biological nitrogen fixation.

1.0 - INTRODUÇÃO

As práticas agropecuárias intensivas vêm ocasionando alterações de ordem física, química e biológica nos solos (TERRA et al., 2019), causando prejuízo ambiental e na econômica no país (DIAS-FILHO, 2017). Somente a pecuária extensiva, que tem como principal fonte alimentar as pastagens apresenta cerca de 50% das pastagens com algum grau de degradação (DIAS-FILHO, 2014).

A recuperação da produtividade dessas áreas demanda alternativas sustentáveis, que possibilitem resultados positivos na recuperação das pastagens (DIAS-FILHO, 2017; CARVALHO et al., 2017). Portanto, para restaurar o potencial produtivo destas áreas, torna-se necessário primeiramente avaliar os fatores que favorecem a degradação das pastagens e do solo. A excessiva pressão de pastejo, manejo inadequado, escolha incorreta da forrageira, aliada a baixa disponibilidade de nutrientes do solo, em especial nitrogênio e fósforo, são fatores de destaque para degradação das pastagens (CARVALHO et al., 2017; TOWNSEND et al., 2010). Diante desta situação, alternativas como introdução de leguminosas forrageiras associado a bioestimulantes podem ser adotadas, vislumbrando sistemas produtivos de menor impacto ao meio ambiente e eficientemente produtivos.

Predominantemente no sistema de produção agrícola as áreas com pastagem são ocupadas com poáceas, que demandam elevadas doses de fertilizantes nitrogenados para potencializar a produtividade. No entanto, o elevado custo dos fertilizantes nitrogenados compromete o fornecimento deste insumo, levando a baixa disponibilidade de nitrogênio para cultura, o que contribui de forma significativa para degradação das pastagens (COSTA et al., 2004; BODDEY et al., 2004). De forma alternativa, a introdução de leguminosas forrageiras, eficientes no processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) e com melhor valor nutricional (MACEDO et al., 2014), são estratégias que possibilitam a redução no custo de produção, em detrimento ao eficiente mecanismo de captação e disponibilização do nitrogênio, face a interação planta-rizóbio, a exemplo do gênero *Bradyrhizobium*, capaz de nodular com leguminosas contribuindo para assegurar a produtividade e estabilidade das pastagens (TERRA et al., 2019).

Dentre as inúmeras leguminosas forrageiras adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas, o amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) vem sendo alvo de estudo, por ser um material promissor na recuperação de pastagem degradada, maximizando o

aporte de nitrogênio em virtude do elevado potencial de FBN (MUNIZ et al., 2017, MIRANDA; VIEIRA; CADISCH, 2003), dando suporte à produtividade de forrageira e ampliando a vida útil da pastagem (BARCELLOS et al., 2008).

Caracterizado como leguminosa perene de hábito herbáceo, o amendoim forrageiro tem crescimento rasteiro e altura de 20 a 40 cm, conferindo bom potencial para ser utilizado como cobertura do solo e adubo verde (PERIN et al., 2003). Apresenta excelentes características agronômicas, como adaptação a solos ácidos, resistência e tolerância a pragas e doenças (ARGEL; PIZARRO, 1992), apresentando também grande importância nas práticas de ciclagem de nutrientes devido à rápida mineralização das suas folhas ricas em nitrogênio (SPRENT, 2001).

De forma complementar aos efeitos das bactérias diazotróficas em associação com amendoim forrageiro, as substâncias húmicas podem potencializar o desenvolvimento das plantas, possibilitando aumento da absorção de nutrientes em virtude da maior permeabilidade da membrana plasmática por meio da ativação da H⁺-ATPase da membrana plasmática, além do estímulo na emissão de pelos radiculares e raízes laterais finas, que aumentam assim a área superficial do sistema radicular (TREVISAN et al., 2010, CANELLAS; OLIVARES, 2014), podendo haver influência na taxa de nodulação, em decorrência do estímulo na emissão de raízes (SANTOS; REIS, 2008).

Diante do exposto, torna-se necessário averiguar o efeito de diferentes concentrações de substâncias húmicas em *Arachis pintoii* cv. Amarillo MG 100 inoculado com *Bradyrhizobium* spp. cultivado em solo de pastagem degradada, quanto ao potencial bioestimulante no crescimento vegetativo e acúmulo de nutrientes em associação com bactérias diazotróficas.

2.0 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Caracterização física e química do solo

O solo utilizado foi representativo de uma área de pastagem degradada na região de Alegre-ES, sendo retirado do terço médio do relevo, na profundidade de 20 cm, classificado regionalmente como Argissolo vermelho-amarelo distrófico (CUNHA et al. 2016). Posteriormente, o solo foi seco ao ar e peneirado em peneira com malha de 2,0 mm para obtenção da terra fina seca ao ar (TFSA) e caracterização física e química do solo (Tabela 1).

Tabela 1: Caracterização física e química do solo utilizado no experimento em casa de vegetação.

| pH em H ₂ O | P | K | Ca | Mg | Al | H+Al | SB | T | V | m |
|------------------------|--------------------------|------|-----------------------------------|------|------|--------------|--------------|---------------|-------|-------|
| 4,86 | 1,75 | 43,0 | 0,20 | 0,23 | 0,70 | 3,14 | 0,78 | 3,91 | 19,83 | 47,44 |
| | --mg dm ⁻³ -- | | -----cmolc dm ⁻³ ----- | | | -----%----- | | | | |
| | MO | | Ds | | | Areia | Silte | Argila | | |
| | dag kg ⁻¹ | | kg dm ⁻³ | | | -----%----- | | | | |
| | 1,98 | | 1,16 | | | 40 | 11 | 49 | | |

pH em água: potenciometria em solução solo-água 1:2,5; fósforo e potássio disponível: extraído por Mehlich-1; cálcio, magnésio e alumínio extraível: extraídos com solução de KCl 1 mol L⁻¹; SB = Ca + Mg + K; CTC = SB + (H + Al); V% = SB x 100/CTC; MO: teor de C do solo x 1,724. Ds: método da proveta; Dp: método do balão volumétrico: teores de areia, silte e argila: análise granulométrica.

2.2 – Experimentação em casa de vegetação

O experimento foi conduzido no período de janeiro a março de 2019 em casa de vegetação, na área experimental do Centro de Ciências Agrárias de Alegre, pertencente a Universidade Federal do Espírito Santo (latitude 20° 45' Sul, longitude 41° 29' Oeste, com elevação de 112 metros). De acordo com o Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural a precipitação pluviométrica é de 1.200 mm ano⁻¹. Segundo a Classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Aw, clima tropical, caracterizado pelo inverno seco e verão chuvoso.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com cinco concentrações de substâncias húmicas (0, 20, 40, 60 e 80 mg L⁻¹ de C) e cinco repetições, totalizando 25 unidades experimentais.

2.3 – Inoculação de *Bradyrhizobium* spp. e preparo das mudas

Antes da desinfecção, as sementes de amendoim forrageiro tiveram o pericarpo removido, deixando apenas as amêndoas. Posteriormente, as sementes foram desinfestadas superficialmente com álcool etílico a 70% v/v por 1 min e hipoclorito de sódio a 2% por 20 min. Em seguida, foram lavadas 10 vezes com água destilada, para retirada de resíduos dos tratamentos anteriores (HUNGRIA et al., 2010), sendo após imersas em água destilada por uma hora, para ficarem embebidas e garantir a germinação.

Para inoculação de *Bradyrhizobium* spp. BR1433 (SEMIA 6440), foram utilizados a proporção de 1g de inoculante turfoso para 50 g de semente, conforme

recomendação da Embrapa Agrobiologia. A inoculação foi realizada misturando o inoculante turfoso com as sementes e uma solução adesiva a base de açúcar na concentração de 10%, sendo adicionado 100 g de açúcar em 1 litro de água, objetivando maior aderência do inoculante às sementes (PURCINO et al., 2000), posteriormente, deixando-as secar na sombra por 15 minutos.

No preparo das mudas utilizou-se bandeja de 128 células, sendo semeado 2 sementes por célula. Transcorridos 10 dias após a emergência (DAE), foram transplantadas 8 mudas para cada vaso definitivo com capacidade de 5 dm³, sendo realizado o desbaste aos 15 DAE selecionando-se 6 plantas por vaso, que apresentavam melhor homogeneidade, vigor e tamanho. A umidade do solo foi mantida em 60% do volume total de poros (VTP).

2.4 – Extração e aplicação de substâncias húmicas

As substâncias húmicas foram extraídas de vermicomposto (Tabela 2), sendo utilizados 200 g de vermicomposto e 1,8 L de água deionizada (relação vermicomposto: água deionizada de 1:9 v:v). O material foi agitado por um período de 6 horas, e após 12 horas de repouso o extrato solúvel foi retirado por decantação e armazenado. Posteriormente, foi determinado o teor de carbono (C) das substâncias húmicas, com base na metodologia adaptada de Mendonça; Matos (2005).

Tabela 2: Composição média do vermicomposto usado na extração de substâncias húmicas.

| pH | C | P | K ⁺ | Ca ²⁺ | Mg ²⁺ | Al ³⁺ | H+Al | SB | CTC |
|------|--------------------|---------------------|-----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------|-------|-------|
| | g kg ⁻¹ | mg dm ⁻³ | -----cmolc dm ⁻³ ----- | | | | | | |
| 6,29 | 60,4 | 987,50 | 2,57 | 7,71 | 8,25 | 0,0 | 1,80 | 18,52 | 20,32 |

pH em H₂O; SB: soma de bases trocáveis; CTC: capacidade de troca de cátions.

Na primeira aplicação de SH, realizada aos 20 DAE entre às 18 e 19 horas, foi pulverizado 12 mL vaso⁻¹ com auxílio de um pulverizador manual de pressão com bico regulável, correspondendo a 2,0 mL planta⁻¹. Transcorrido 40 DAE, foi realizada a segunda aplicação de SH, acompanhando o mesmo horário da 1ª aplicação e utilizando o mesmo equipamento de aplicação, aplicando 24 mL vaso⁻¹, correspondendo a 4,0 mL planta⁻¹. Para ambas as aplicações, objetivando a padronização da umidade na superfície

da folha, foram realizadas aplicações com mesmo volume em água, nos demais tratamentos.

2.5 – Avaliação dos atributos fisiológicos, fitotécnicos e nutricionais

Aos 60 dias após a emergência foram analisados: rendimento quântico do fotossistema II (F_v/F_M) e índice de clorofila Falker - conteúdo de clorofila, produção de massa seca da parte aérea e raiz, altura total das plantas, número de nódulos, teor e acúmulo de nutrientes.

2.5.1 – Teor total de clorofila e eficiência quântica do fotossistema II

A estimativa do teor de clorofila total (Chl_t), clorofila *a* (Chl *a*) e clorofila *b* (Chl *b*) foi estimada pelo Índice de Clorofila Falker (ICF), sendo realizado no terço mediano nas folhas em um folíolo totalmente expandido em duas plantas de cada um dos cinco vasos, em cada tratamento, por meio do medidor portátil de clorofila, ClorofiLOG (Falker Automação Agrícola, Brasil), entre 8:00 e 11:00 horas.

A determinação da eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_M) foi quantificada com utilização de fluorômetro portátil de luz modulada (PSI FluorPen, modelo FP 100, Drasov, República Checa), após adaptação do folíolo ao escuro por 15 minutos. As medições foram realizadas nos mesmos horários e folíolos, nos quais realizou-se a leitura do teor de clorofila.

2.5.2 – Altura das plantas, número de nódulos e massa seca

A determinação da altura total das plantas realizada mediante régua graduada, sendo utilizada três plantas de cada um dos cinco vasos, em cada tratamento. Após coleta e lavagem das raízes, os nódulos foram contados. Os dados utilizados resultaram da média das seis plantas, de cada parcela, e expressos em números de nódulos ($n^\circ \text{ nod planta}^{-1}$) - NNOD.

A parte aérea e a raiz foram coletadas, armazenadas em sacos de papel e colocadas em estufa a 65° C durante 72 horas (até atingir peso constante) para determinação da massa seca. Após a secagem em estufa, as amostras foram submetidas à trituração em moinho de facas para posterior determinação dos teores nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg).

2.5.3 – Análise nutricional

Para análise química do N foliar foi realizada digestão sulfúrica seguida de destilação Kjeldahl, de acordo com Embrapa (2000). Para análise química foliar de P, K, Ca e Mg foi realizada digestão nítrica. A leitura do P foi realizada por espectrofotômetro a 725 nm; K por fotômetro de chama e as leituras de Ca e Mg por espectroscopia de absorção atômica, de acordo com Johnson e Ulrich, (1959) e Malavolta et al. (1997).

2.6 – Análises estatísticas

Os dados foram analisados quanto a sua normalidade e homogeneidade de variância. Em seguida foram realizadas análises de regressão para os fatores quantitativos através do software SISVAR (FERREIRA, 2019), em que os modelos lineares ou quadráticos foram escolhidos com base na significância dos coeficientes de regressão, utilizando-se o teste t de student em nível de 5 % de probabilidade e o coeficiente de determinação (R^2). Para plotagem dos gráficos utilizou-se o software SigmaPlot® versão 10 (SYSTAT SOFTWARE Inc, 2006).

3.0 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 - Atributos fitotécnicos

Para as variáveis, massa da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NNOD) e altura de planta (AP) a análise de regressão apresentou significância ($p \leq 0,05$) para os efeitos das concentrações de substâncias húmicas, sendo quadrático o ajuste no modelo de regressão. A aplicação de diferentes concentrações de SH em amendoim forrageiro possibilitou aumento médio na MSPA de 10,98%. Baseado no modelo quadrático de regressão ajustado ($\hat{y} = -0,0002x^2 + 0,0126x + 1,8015$ $R^2=0,9231$), estimou-se que o rendimento máximo de MSPA seria obtido com a concentração de 31 mg L⁻¹ de C (Figura 1a).

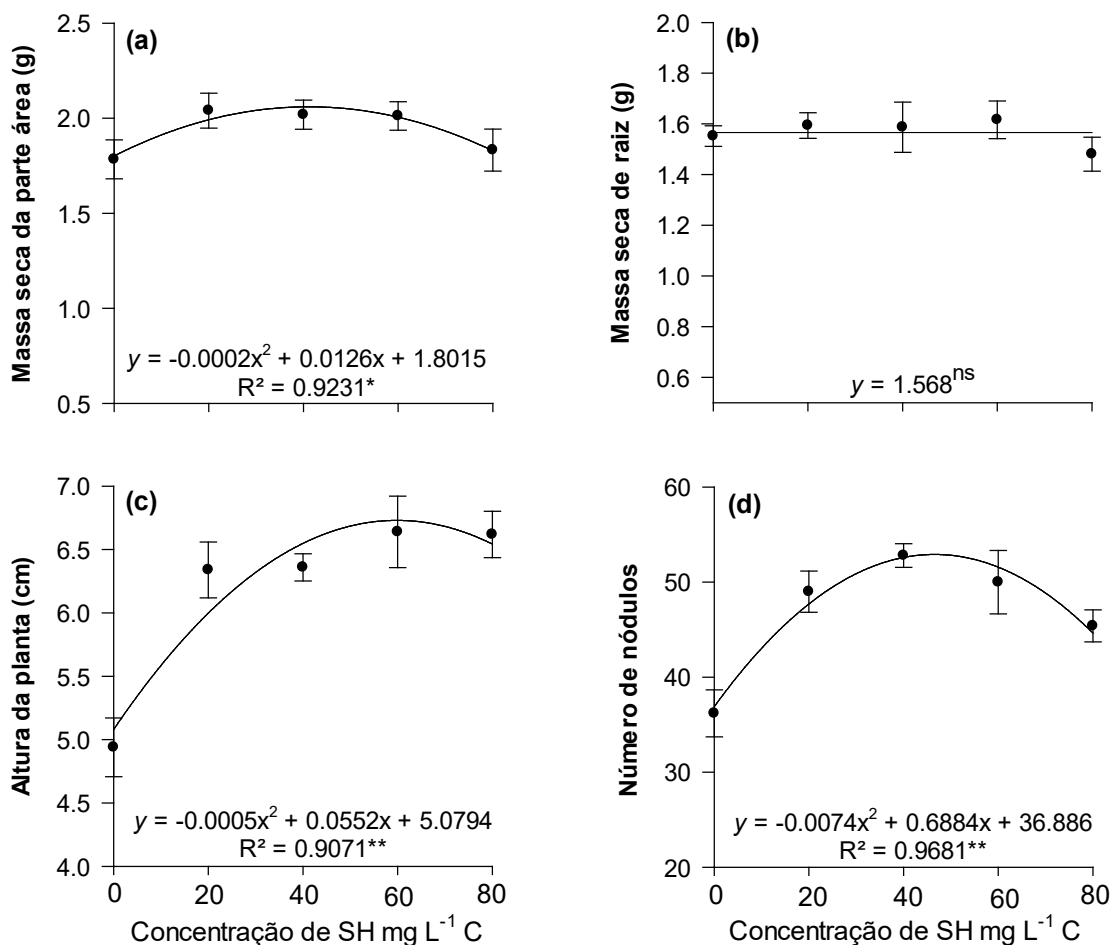


Figura 1: Média \pm erro padrão - massa seca de parte aérea (a), massa seca de raiz (b), altura de plantas (c) e número de nódulos (d) em *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 aos 60 dias, em resposta às concentrações de SH (0, 20, 40, 60 e 80 mg L⁻¹ C) aplicadas aos 20 e 40 DAE. Significativo * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: não significativo.

Para o atributo NNOD, houve aumento até a concentração de 40 mg L⁻¹ de C. Os resultados demonstram que a aplicação de SH influencia significativamente no aumento do número de nódulos em plantas de amendoim forrageiro (Figura 1d), variando de 25,41 a 45,85% superior ao tratamento controle. Com base no coeficiente de determinação (R^2) observa-se que 96,81% da variação obtida neste parâmetro está altamente relacionada com efeito das concentrações de substâncias húmicas.

O modelo quadrático ($R^2 = 0,90$; $p \leq 0,01$) descreve o efeito das diferentes doses de substâncias húmicas na altura das plantas (AP) (Figura 1c). Com base no modelo de regressão, o ponto máximo (6,60 cm) seria obtido na concentração de 55 mg L⁻¹ de C. Dentro dos intervalos de doses de SH avaliados, observa-se uma tendência na redução da AP ao elevar a dose de SH para 80 mg L⁻¹ de C. Este ganho no crescimento das plantas deve estar associado ao efeito hormonal da SH quando aplicado em baixa

concentração. Diferentemente do observado por Barral (2015), em que a aplicação de doses de SH influenciou negativamente na altura das plantas de feijão, para o autor o material de origem e o nível do composto refletem na qualidade do ácido húmico.

Os efeitos significativos da aplicação de doses crescentes de substâncias húmicas também foram relatados por outros autores, de modo que a concentração ótima depende da planta e do modo de aplicação. Rosa et al. (2009) ao avaliarem o efeito de diferentes doses de SH no crescimento, concentração e cinética de nutrientes em *Phaseolus vulgaris* L., encontraram efeito significativo para concentrações de SH na massa seca da parte aérea ao aplicarem dose correspondente a 11 mg L⁻¹ de C. De forma similar, Pinheiro et al. (2018) observaram que doses crescentes de substâncias húmicas promoveram aumento de 44% em altura de planta e 196% na produção de parte aérea de *Urochloa decumbens* na concentração de 60 mg L⁻¹ de C.

Esse resultado pode decorrer do efeito semelhante a hormônios ou das alcamidas ligadas a bioatividade das substâncias húmicas e o estímulo da H⁺-ATPases da membrana plasmática, que gera um gradiente eletroquímico com a extrusão de H⁺, e conseqüentemente, a permeabilidade da parede celular (RAMOS et al., 2015; CANELLAS et al., 2015; ZANDONADI et al., 2019), além do estímulo na emissão de pelos radiculares e raízes laterais finas, os quais aumenta a área superficial do sistema radicular, promove melhorias na absorção de nutrientes (TREVISAN et al., 2010, CANELLAS; OLIVARES, 2014).

O estímulo na emissão de raízes pode influenciar na taxa de nodulação, onde há maior excreção de flavonoides, que ativam a expressão de genes *nod* reguladores da nodulação (SANTOS; REIS, 2008). Preferencialmente, no gênero *Arachis* a penetração das bactérias diazotróficas na raiz pode ocorrer através dos pelos presentes na raiz jovem (UHEDA; DAIMON; YOSHIKAWA, 2001) ou através de aberturas (fissuras) na epiderme da raiz, contrário à grande maioria das leguminosas nodulíferas (CHANDLER, 1978).

A partir dos estudos de Gao et al. (2015), ao avaliarem o efeito de doses de SH extraída de lignito no crescimento de *Bradyrhizobium liaoningense* e sua nodulação na soja, observaram aumento no número de nódulos e na atividade da nitrogenase das plantas de soja inoculadas até a concentração de 500 mg L⁻¹ de C. Os autores atribuíram esses resultados à presença de compostos análogos a flavonoides presentes na SH, e concluíram que a SH estimulou o metabolismo celular e o transporte de nutrientes, o que resultou no aumento da densidade celular de *Bradyrhizobium* spp., além de

favorecer a indução da expressão de proteínas relacionadas ao gene *nod* e à fixação de nitrogênio. Neste estudo, resultados semelhantes foram observados na dinâmica da taxa de nodulação até a dose de 40 mg L⁻¹ de C, com posterior decréscimo com aumento da concentração de SH.

Ao comparar as médias de MSR obtidas pela aplicação das diferentes doses de SH, observou-se uma tendência quadrática, no entanto, a regressão não foi significativa ($p > 0,05$). Possivelmente obteve-se a máxima produção de massa seca de raiz em decorrência do efeito auxínico da SH e da promoção de crescimento vegetal da estirpe de *Bradyrhizobium* spp. Dados semelhantes foram observados por Santana (2018), ao avaliar concentrações de SH variando de 0 a 90 mg L⁻¹ de C em feijão-de-porco e crotalária inoculadas com *Rhizobium* spp., não observou ajuste nos modelos de regressão.

Barral (2015), ao estudar parâmetros fitotécnicos e produção de *Phaseolus vulgaris* L em resposta a fontes e doses de ácido húmico (0; 2; 8; 16; 32 kg ha⁻¹), não apontou a provável causa da redução linear do sistema radicular. De forma contrária, Rosa et al. (2009) avaliando a mesma cultura, constataram crescimento do sistema radicular ao aplicar concentrações de SH (0; 2,5; 5; 10; e 20 mg L⁻¹ de C) extraída de carvão mineral, em solução nutritiva. Pode-se inferir que as fontes e concentrações de SH influem nos ganhos de massa seca de raiz.

De acordo com Façanha et al. (2002), o resultado positivo no desenvolvimento do sistema radicular, com o uso de SH pode estar associado ao efeito auxínico, semelhante aos efeitos dos fitormônios. O desenvolvimento das raízes está diretamente relacionado com o fitormônio auxina, pois este atua nos estádios iniciais de formação do primórdio radicular, ativando a divisão das células do periciclo (CASIMIRO et al., 2001). Por outro lado, a promoção de crescimento vegetal por bactérias, decorrente do envolvimento direto ou indireto no crescimento das plantas, não se restringe somente ao fornecimento de nitrogênio (SINGH et al., 2019).

Diferentes isolados de bactérias diazotróficas têm potencial de produzir quantidades distintas de ácido indol acético - AIA, que contribuem no desenvolvimento radicular, aumentando o número de raízes (MUNIZ et al., 2011). Antoun et al. (1998) relatam dentre os gêneros de bactérias promotoras de crescimento vegetal em não leguminosas, as *Bradyrhizobium* spp. e *Rhizobium* spp., que têm potencial de produção de AIA.

As quantidades de AIA produzidas por isolados de *Bradyrhizobium* spp. podem variar de 13,20 a 44,68 μM AIA em plantas de soja (BODDEY; HUNGRIA, 1997). Schlindwein et al. (2008) observaram valores de AIA dentro da faixa benéfica de concentração para desenvolvimento vegetal.

O efeito auxínico do biofertilizante e bioestimulante presente nos diferentes tratamentos possivelmente parece ter acarretado aumento da MSR, diminuindo a diferença entre as médias dos tratamentos.

3.2 – Atributos nutricionais

Na Tabela 3, são apresentados os valores médios dos teores de nutrientes na parte aérea de amendoim forrageiro.

Tabela 3: Médias \pm erro padrão dos teores de nutrientes na parte aérea de *Arachis pinto* cv. Amarillo MG 100 aos 60 dias após emergência (DAE) em resposta às doses de substâncias húmicas (0, 20, 40, 60 e 80 mg L^{-1} C) aplicadas aos 20 e 40 DAE.

| Doses SH (mg L^{-1} C) | N | P | K | Ca | Mg |
|-------------------------------------|--------------------|-------------------|------------------|------------------|-----------------|
| | g kg^{-1} | | | | |
| 0 | 20,85 \pm 0,59 | 0,311 \pm 0,013 | 19,76 \pm 0,22 | 12,28 \pm 0,95 | 5,46 \pm 0,14 |
| 20 | 21,06 \pm 0,51 | 0,251 \pm 0,003 | 19,47 \pm 0,49 | 12,79 \pm 0,91 | 5,40 \pm 0,22 |
| 40 | 21,10 \pm 0,47 | 0,258 \pm 0,004 | 19,30 \pm 0,43 | 13,28 \pm 0,52 | 5,32 \pm 0,21 |
| 60 | 21,31 \pm 0,28 | 0,266 \pm 0,004 | 19,52 \pm 0,55 | 12,55 \pm 0,76 | 5,39 \pm 0,26 |
| 80 | 21,38 \pm 0,28 | 0,306 \pm 0,024 | 19,47 \pm 1,04 | 11,52 \pm 0,81 | 5,42 \pm 0,08 |
| Média geral | 21,14 | 0,278 | 19,50 | 12,48 | 5,40 |
| CV% | 4,98 | 9,24 | 7,16 | 10,00 | 7,50 |

O maior teor de N na parte aérea de amendoim forrageiro é explicado pela fixação biológica de nitrogênio (PERIN et al., 2003). Os teores médios de N e P obtidos nas diferentes doses de substâncias húmicas foram inferiores ao relatado por Costa et al. (2015), em experimento realizado em casa de vegetação, avaliando a doses de K na composição química e produção de massa seca de *A. pinto* cv. Amarillo. Os autores observaram valores médios de N de 36,6 g kg^{-1} e P de 1,91 g kg^{-1} , nos tratamentos sem adubação potássica.

Costa et al. (2006) verificaram teores de N e P na biomassa aérea de *A. pinto* superior ao obtido nesta pesquisa, em ensaios estudando o efeito de níveis de fósforo. Valores médios de N abaixo dos obtidos neste estudo são citados por Miranda (2008)

para amendoim forrageiro, inoculados com diferentes espécies de fungo micorrízico arbuscular (FMA), que também não receberam fertilização adicional.

O teor de K variou de 19,30 a 19,76 g kg⁻¹, já os teores de Ca e Mg estiveram entre 11,52 a 13,28 g kg⁻¹ Ca e 5,32 a 5,46 g kg⁻¹ Mg (Tabela 3). Os teores de K foram superiores ao nível crítico (13 g kg⁻¹), ao passo que para Ca as plantas apresentaram valor ligeiramente inferior ao adequado para cultura que é de 18 g kg⁻¹, de acordo com relatado por Rao; Kerridge (1994). Valores médios de Mg abaixo dos obtidos neste estudo são relatados por Gobbi et al. (2010) para amendoim forrageiro cv. Amarillo (2,2 g kg⁻¹), em resposta a níveis de sombreamento.

De modo geral, os teores de nutrientes foram abaixo do descrito na literatura, em virtude da baixa disponibilidade de P, K, Ca e Mg no solo utilizado como substrato. Em relação ao nitrogênio, o menor pH do solo pode ter influenciado direta ou indiretamente de forma negativa na viabilidade da estirpe de *Bradyrhizobium* spp., os quais são fundamentais para desenvolvimento destes microrganismos. O pH do solo está entre os principais fatores limitantes da FBN por leguminosas, suprimindo ou retardando a formação dos nódulos (ABDULLAH, 2002).

Na figura 2, são apresentados os acúmulos de nutrientes – nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) na parte aérea de *A. pintoii* cv. Amarillo MG 100, para diferentes concentrações de SH. Observou-se significância do efeito das doses de SH na análise de regressão para N, K e Mg ($p \leq 0,05$) e, Ca ($p \leq 0,01$). As curvas de dose-resposta e o modelo quadrático descreveram os efeitos observados para acúmulo de nutrientes, exceto para P, em que não houve ajuste no modelo linear e quadrático.

Os efeitos da SH no conteúdo de nutrientes na parte aérea de amendoim forrageiro, de modo geral, foram superiores ao controle. A aplicação de SH possibilitou ganhos médios de 12% de N, 8,6% de K, 13,5% de Ca e 7,5% de Mg em relação ao controle. Os maiores incrementos nos acúmulos de N e K, baseados no modelo quadrático de regressão ajustado, seriam obtidos nas concentrações de 43 e 41 mg L⁻¹ de C, respectivamente. Para acúmulo de Ca e Mg estimou-se que os valores máximos seriam obtidos na concentração de 38 mg L⁻¹ de C.

Nas concentrações citadas, possivelmente, as SH potencializariam a atividade de FBN e a absorção de nutrientes, mesmo que em baixas concentrações no solo. Pinheiro et al. (2010) verificaram que o acúmulo N apresentou comportamento quadrático em resposta à aplicação de diferentes doses de ácido húmico em mudas de eucalipto. Efeito

significativo do ácido húmico no aumento do acúmulo de N, P, K, Ca e Mg também foi relatado por Baldotto et al. (2009) estudando a cultura do abacaxi e Júnior et al. (2019) em plantas de mangustão.

Os ácidos húmicos atuam na interação solo-microbiota-planta, principalmente na disponibilidade e na absorção de nutrientes (BALDOTTO; BALDOTTO, 2014). A contribuição da FBN em amendoim forrageiro pode chegar a 74% da sua demanda nutricional de N (CARVALHO et al., 2019). Os ganhos de N podem estar associados ao aumento na taxa de nodulação, decorrente do estímulo na emissão de pelos radiculares, proveniente da adição de SH. A absorção do N, elemento essencial às plantas, ocorre pela absorção de nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+) (TAIZ; ZEIGER, 2013). Estudos realizados em raiz de milho apontam que a aplicação de SH extraídas em água aumenta a absorção de NO_3^- , no qual está relacionado à maior modulação de genes envolvidos no transporte e assimilação de nitrato (ZANIN et al., 2018).

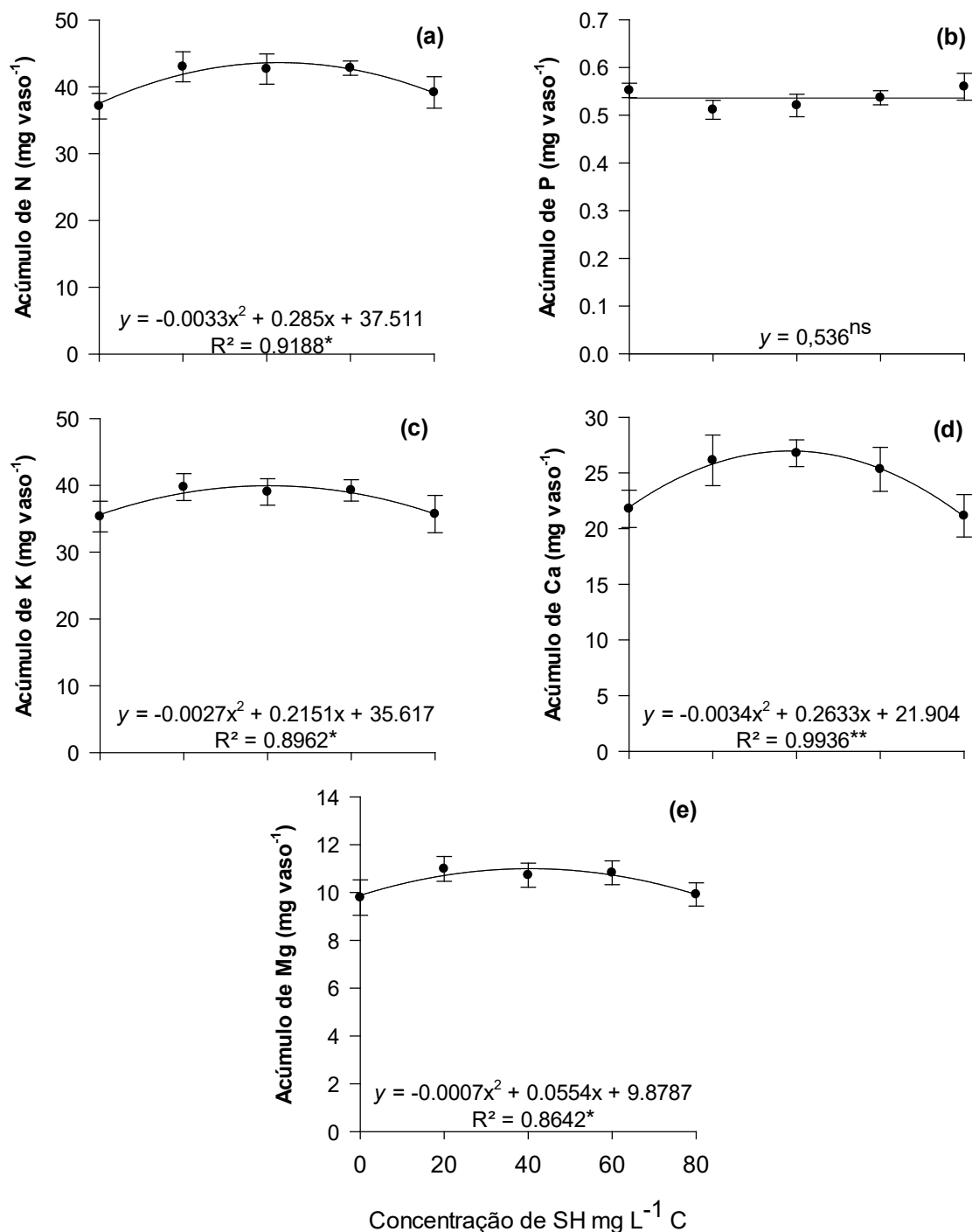


Figura 2: Média \pm erro padrão - acúmulo de nitrogênio (a), acúmulo de fósforo (b), acúmulo de potássio (c), acúmulo de cálcio (d) e acúmulo de magnésio (e) em parte aérea de *Arachis pintoii* cv. Amarillo MG 100 aos 60 dias, em resposta às doses de SH (0, 20, 40, 60 e 80 mg L⁻¹ C) aplicadas aos 20 e 40 DAE. Significativo * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: não significativo.

O acúmulo de K aumentou com as doses crescentes de SH até 40 mg L⁻¹ de C, demonstram que aplicação de SH favoreceu a absorção de K, contrariando o trabalho de Rosa et al. (2009), em que as SH diminuíram a cinética de absorção de potássio,

refletindo em quedas nas taxas de absorção de K em plantas de feijão. Em relação ao acúmulo de Ca e Mg, embora estivessem em menor concentração no solo, a aplicação de SH elevou a taxa de absorção, concordando com parte dos resultados de Pinheiro et al. (2010).

Dentre os nutrientes avaliados observou-se ligeiro decréscimo no acúmulo de P em relação à testemunha ($0,552 \text{ mg vaso}^{-1}$), variando de 2,71 a 7,42% em função da aplicação das diferentes concentrações de SH. As reduções no conteúdo de P foram mais expressivas nas doses de 20 e 40 mg L^{-1} de C, e aumentando na concentração de 80 mg L^{-1} de C. A provável hipótese para este menor acúmulo de P na parte aérea está atribuída ao efeito diluição destes nutrientes, devido ao maior acúmulo de biomassa na parte aérea nestas concentrações, associado ao baixo teor de P ($1,75 \text{ mg dm}^{-3}$) disponível no solo. Comportamento similar foi observado por Rosa et al. (2009) ao avaliarem doses crescentes de SH e constatarem redução no acúmulo de P em *Phaseolus vulgaris* L.

3.3 – Atributos fisiológicos

Após análise de variância verificou-se que houve efeito significativo das doses de SH ($p \leq 0,05$), com ajuste de modelo de regressão somente para rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m), observando comportamento linear, os demais parâmetros fisiológicos avaliados não se ajustaram aos modelos de regressão (Figura 3).

O rendimento quântico máximo do fotossistema II está entre os principais componentes observados nas medições da fluorescência da clorofila *a*, possibilitando julgar o estado fisiológico da planta (BAKER; ROSENQVIST, 2004). Os valores de F_v/F_m variam, normalmente, entre 0,750 a 0,850, onde valores abaixo sugerem danos fotoinibitórios no centro de reação do PSII (GUIDI; LO PICCOLO; LANDI, 2019).

No presente estudo valores médios do F_v/F_m variaram de 0,802 a 0,834, nos intervalos de doses de SH avaliados, demonstrando não haver danos ao centro de reações do PSII. Fan et al. (2014) relataram melhorias no F_v/F_m de crisântemo ao aplicar ácido húmico. Os autores sugerem que a maior parte da energia luminosa absorvida pelo PSII foi usada para fotossíntese, favorecendo o crescimento das plantas.

Para Lin et al. (2016), a baixa disponibilidade de N reduz a razão F_v/F_m , levando à diminuição da capacidade de transporte de elétrons, conseqüentemente à síntese de ATP, refletindo na atividade da Rubisco. De fato, o acréscimo nos valores de F_v/F_m

neste estudo está em concordância com as melhorias no aumento da taxa de nodulação e elevação no acúmulo de N ao aplicar SH.

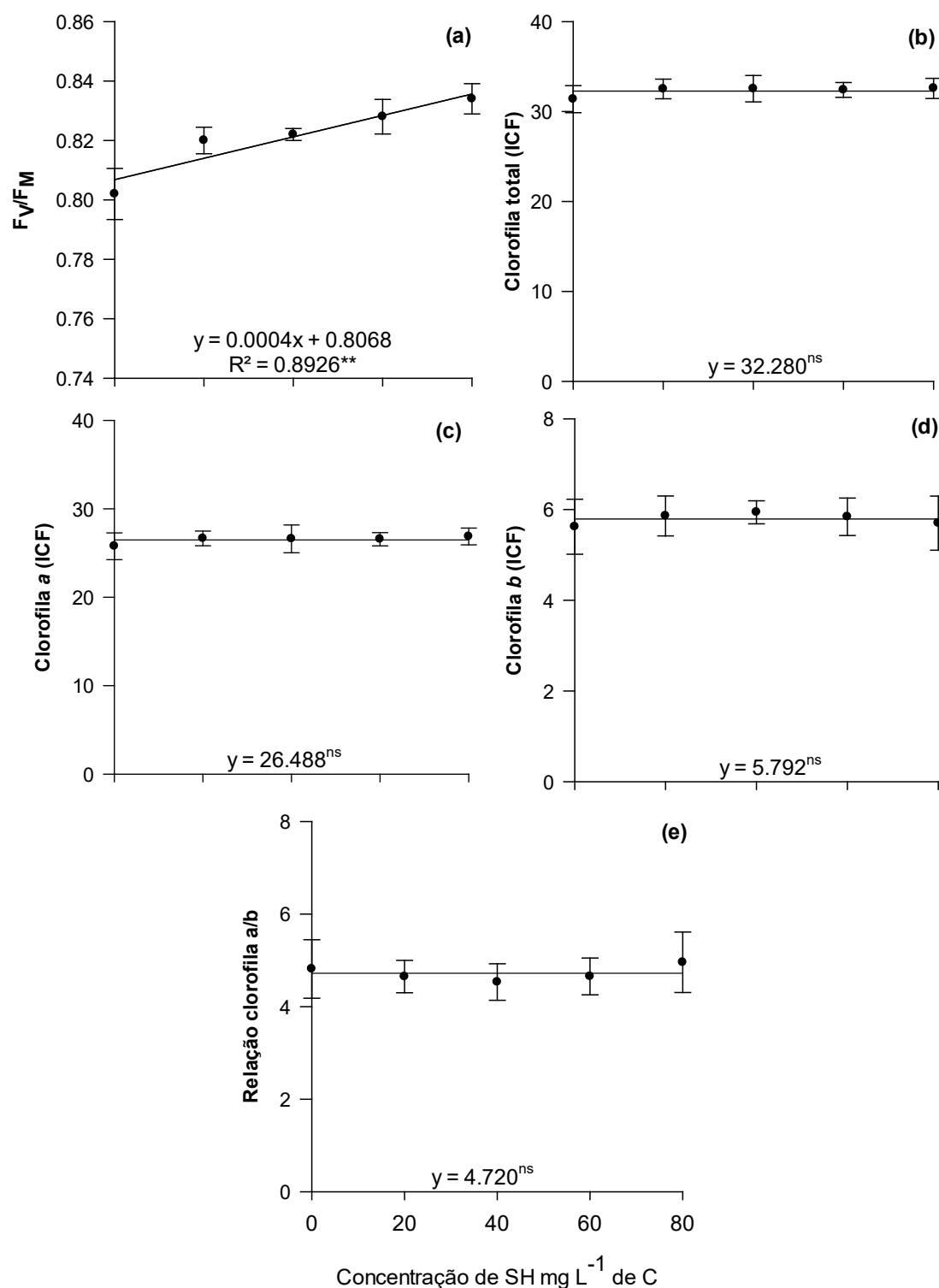


Figura 3: Médias \pm erro padrão - rendimento quântico do fotossistema II (a), clorofila total (b), clorofila a (c), clorofila b (d) e relação clorofila a/b (e) de *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 aos 60 dias, em resposta às doses de SH (0, 20, 40, 60 e 80 mg L⁻¹ C) aplicadas aos 20 e 40 DAE. Significativo * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: não significativo.

Os valores de índice de clorofila falker (ICF) para clorofila total (Chl_t), clorofila a (Chl *a*), clorofila b (Chl *b*) e relação Chl *a*/Chl *b* em função das diferentes concentrações de SH não se enquadraram nos modelos de regressão avaliados.

A eficiência simbiótica de estirpes de bactérias diazotróficas avaliadas por Sá et al. (2019) revelaram valores de índice de SPAD (25,33) em plantas *A. pintoi* inoculadas com *Bradyrhizobium* spp. (SEMIA 6440) inferior ao deste estudo ICF (32,28), podendo estar associada à maior taxa de nodulação.

4.0 – CONCLUSÕES

Substâncias húmicas extraídas de vermicomposto associado à estirpe de *Bradyrhizobium* spp influenciam positivamente no aumento de massa seca da parte aérea, altura e número de nódulos.

As substâncias húmicas elevaram o rendimento quântico máximo das plantas de *Arachis pintoi* cv. Amarillo, indicando melhorias no centro de reação do PSII.

Recomenda-se a concentração de 40 mg L⁻¹ de C para obter a absorção máxima de N, K, Ca e Mg em amendoim forrageiro.

5.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH M. K. A.. Factors affecting the efficiency of symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, [s.l.], v. 5, n. 11, p.1277-1293, 1 nov. 2002. Science Alert. <http://dx.doi.org/10.3923/pjbs.2002.1277.1293>.

ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C. J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R.. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, [s.l.], v. 204, n. 1, p.57-67, 1998. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1004326910584>.

ARGEL, P. J.; PIZARRO, E. A.. Germoplasm case study: *Arachis pintoi*. In.: **Pastures for the tropical Lowlands – CIAT's Contribution**. Cali: CIAT, p.57-76, 1992.

BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E.. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 55, n. 403, p.1607-1621, 16 jul. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erh196>.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; GIRO, V. B.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; BRESSAN-SMITH, R.. Desempenho do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante a aclimação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s.l.], v. 33, n. 4, p.979-990, ago. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-06832009000400022>.

BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B.. Ácidos húmicos. **Revista Ceres**, [s.l.], v. 61, p.856-881, dez. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201461000011>.

BARRAL, U. M.. **Efeito de fontes e doses de ácidos húmicos na produção do feijão** (*Phaseolus vulgaris* L.). 2015. 57f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2015.

BARCELLOS, A. O.; RAMOS, A. K. B.; VILELA, L.; MARTHA JUNIOR, G. B.. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol. 37, n. spe., p.51-67. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982008001300008>.

BODDEY, L. H.; HUNGRIA, M.. Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. **Biology and Fertility of Soils**, [s.l.], v. 25, n. 4, p.407-415, 30 out. 1997. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s003740050333>.

BODDEY, R. M.; MACEDO, R.; TARRÉ, R. M.; FERREIRA, E.; OLIVEIRA, O. C.; REZENDE, C. P.; CANTARUTTI, R. B.; PEREIRA, J. M.; ALVES, B. R. J.; URQUIAGA, S.. Nitrogen cycling in Brachiaria pastures: the key to understanding the process of pasture decline. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [s.l.], v. 103, n. 2, p.389-403, jul. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2003.12.010>.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.1-11, 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/2196-5641-1-3>.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; AGUIAR, N. O.; JONES, D. L.; NEBBIOSO, A.; MAZZEI, P.; PICCOLO, A.. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 196, p.15-27, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>.

CARVALHO, L. R., PEREIRA, L. E. T., HUNGRIA, M., CAMARGO, P. B., SILVA, S. C.. Nodulation and biological nitrogen fixation (BNF) in forage peanut (*Arachis pintoi*) cv. Belmonte subjected to grazing regimes. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [s.l.], v. 278, p.96-106, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2019.02.016>.

CARVALHO, W. T. V.; MINIGHIN, D. C.; GONÇALVES, L. C.; VILLANOVA, D. F. Q.; MAURICIO, R. M.; PEREIRA, R. V. G.. Pastagens degradadas e técnicas de recuperação: Revisão. **Pubvet**, [s.l.], v. 11, n. 10, p.1036-1045, out. 2017. Editora MV Valero. <http://dx.doi.org/10.22256/pubvet.v11n10.1036-1045>.

CASIMIRO, I.; MARCHANT, A.; BHALERAO, R. P.; BEECKMAN, T.; DHOOGHE, S.; SWARUP, R.; GRAHAM, N.; INZÉ, D.; SANDBERG, G.; CASERO, P. J.; BENNETT, M.. Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. **The Plant Cell**, [s.l.], v. 13, n. 4, p.843-852, abr. 2001. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.13.4.843>.

CHANDLER, M. R.. Some Observations on Infection of *Arachis hypogaea* L. by *Rhizobium*. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 29, n. 3, p.749-755, 1978. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/29.3.749>.

COSTA, N. L.; MAGALHÃES, J. A.; TOWNSEND, C. R.; PEREIRA, R. G. A.; OLIVEIRA, J. R. C.. **Utilização de leguminosas forrageiras na recuperação de pastagens degradadas**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2004. 4 p. (Embrapa Rondônia. Comunicado Técnico, 281).

COSTA, N. L.; PAULINO, V. T.; TOWNSEND, C. R.; MAGALHÃES, J. A.. Resposta de *Arachis pintoi* cv. Amarillo à níveis de fósforo. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. [s.l.], v. 6, n. 1, p.59-62, set. 2006.

COSTA, N. L.; PAULINO, V. T.; MAGALHÃES, J. A.; RODRIGUES, B. H. N.; RODRIGUES, A.. Adubação potássica na produção e composição química da forragem de *Arachis pintoi* cv. Amarillo. **Pubvet**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.65-69, fev. 2015. Editora MV Valero. <http://dx.doi.org/10.22256/pubvet.v9n2.65-69>.

CUNHA, A. M.; FEITOZA, H. N.; FEITOZA, L. R.; OLIVEIRA, F. S.; LANI, J. L.; CARDOSO, J. K. F.; TRINDADE, F. S.. Update to the legend of the reconnaissance soil map of Espírito Santo state and the implementation of Geobases interface for data usage in GIS. **Revista Geografares**, [s.l.], v. 23, p.32-65, 22 dez. 2016. Geografares. <http://dx.doi.org/10.7147/geo23.12356>.

DIAS-FILHO, M.B. **Degradação das pastagens: o que é e como evitar**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2017. 24p. (Embrapa Amazônia Oriental).

DIAS-FILHO, M.B. **Diagnóstico das Pastagens no Brasil**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2014. 36p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 402).

FAÇANHA, A. R.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A.; OLIVARES, F. L.; GURIDI, F.; ARAÚJO, S. G.; XAVIER, V. A. C.; RUMJANEK, V. M.; BRASIL, F.; SCHRIPSEMA, J.; BRAZ-FILHO, R.; OLIVEIRA, M. A.; CANELLAS, L. P.. Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 37, n. 9, p.1301-1310, set. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2002000900014>.

FAN, H.; WANG, X.; SUN, X.; LI, Y.; SUN, X.; ZHENG, C.. Effects of humic acid derived from sediments on growth, photosynthesis and chloroplast ultrastructure in chrysanthemum. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 177, p.118-123, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.05.010>.

FERREIRA, D. F.. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, [s.l.], v. 37, n. 4, p. 529, 20 dez. 2019. Revista Brasileira de Biometria. <http://dx.doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>.

GAO, T. G.; XU, Y. Y.; JIANG, F.; LI, B. Z.; YANG, J. S.; WANG, E. T.; YUAN, H. L.. Nodulation characterization and proteomic profiling of *Bradyrhizobium liaoningense* CCBAU05525 in response to water-soluble humic materials. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.1-13, 8 jun. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep10836>.

GUIDI, L.; LO PICCOLO, E.; LANDI, M.. Chlorophyll fluorescence, photoinhibition and abiotic stress: Does it make any difference the fact to be a C3 or C4 species?. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 10, p.1-11, 14 fev. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.00174>.

GOBBI, K. F.; GARCÍA, R.; GARCEZ NETO, A. F.; PEREIRA, O. G.; ROCHA, G. C.. Valor nutritivo do capim-braquiária e do amendoim forrageiro submetidos ao sombreamento. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba. v. 59, n. 227, p.379-390. sep. 2010.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, [s.l.], v. 331, n. 1-2, p.413-425, 13 jan. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>.

JOHNSON, C.M.; ULRICH, A. **Analytical methods for use in plants analyses**. Los Angeles, University of California, p.32-33. (Bulletin, 766), 1959.

JÚNIOR, G. A. G.; PEREIRA, R. A.; SODRÉ, G. A.; GROSS, E.. Humic acids from vermicompost positively influence the nutrient uptake in mangosteen seedlings1. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, [s.l.], v. 49, p.1-8, 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632019v4955529>.

LIN, Z.; ZHONG, Q.; CHEN, C.; RUAN, Q.; CHEN, Z.; YOU, X.. Carbon dioxide assimilation and photosynthetic electron transport of tea leaves under nitrogen deficiency. **Botanical Studies**, [s.l.], v. 57, n. 1, p.1-12, 17 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40529-016-0152-8>.

MACEDO, M. C. M.; ZIMMER, A. H.; KICHEL, A. N.; ALMEIDA, R. G.; ARAUJO, A. R.. Degradação de pastagens, alternativas de recuperação e renovação, e formas de mitigação. In: Anais de Congresso, Ribeirão Preto, SP, Embrapa Gado de Corte. p. 158–181.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, A.S. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: **Potafos**. 319p, 1997.

MENDONÇA, E. S., MATOS, E. S.. *Matéria orgânica do solo: métodos de análises*. Viçosa: UFV; 2005. 107 p.

MIRANDA, C. H. B.; VIEIRA, A.; CADISCH, G.. Determinação da fixação biológica de nitrogênio no amendoim forrageiro (*Arachis* spp.) por intermédio da abundância natural de ¹⁵N. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s.l.], v. 32, n. 62, p.1859-1865, dez. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-35982003000800008>.

MIRANDA, E. M.. **Fungos micorrízicos arbusculares em Amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* Krap. e Greg.)**. 2008. 95f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

MUNIZ, A. W.; DALAGNOL, G. L.; WORDELL FILHO, J. A.; SÁ, E. L. S. Promoção do crescimento de espécies de *Adesmia* por rizobactérias de nódulos produtoras de ácido indolacético. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 24, p. 60-64, 2011.

MUNIZ, A. W.; SOUZA, E. S.; CAVALLAZZI, J. R. P.; SÁ, E. L. S.; PERIN, R.; TONATO, F.; ASSIS, G. M. L.. **Inoculação de rizóbios em amendoim forrageiro cv. Mandobi em Manaus, AM**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2017. 4 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Comunicado técnico, 125).

PERIN, A.; GUERRA, J. G. M.; TEIXEIRA, M. G.. Cobertura do solo e acumulação de nutrientes pelo amendoim forrageiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 38, n. 7, p.791-796, jul. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2003000700002>.

PINHEIRO, G. L.; SILVA, C. A.; FURTINI NETO, A. E.. Crescimento e nutrição de clone de eucalipto em resposta à aplicação de concentrações de ácido húmico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s.l.], v. 34, n. 4, p.1217-1229, ago. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-06832010000400021>.

PINHEIRO, P. L.; PASSOS, R. R.; PEÇANHA, A. L.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; MENDONÇA, E. S.. Promoting the growth of *Brachiaria decumbens* by humic acids (HAs). **Australian Journal of Crop Science**, [s.l.], v. 12, n. 07, p.1114-1121, 20 jul. 2018. Southern Cross Publishing. <http://dx.doi.org/10.21475/ajcs.18.12.07.pne1038>.

PURCINO, H. M. A.; SÁ, N. M. H.; VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. C.. **Novas Estirpes de Rizóbio para a Inoculação do Amendoim Forrageiro (*Arachis pintoi*)**. 20. ed. Planaltina: Embrapa, 2000. 2 p.

RAMOS, A. C.; DOBBS, L. B.; SANTOS, L. A.; FERNANDES, M. S.; OLIVARES, F. L.; AGUIAR, N. O.; CANELLAS, L. P.. Humic matter elicits proton and calcium fluxes and signaling dependent on Ca²⁺-dependent protein kinase (CDPK) at early stages of lateral plant root development. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.1-12, 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40538-014-0030-0>.

RAO, I. M.; KERRIDGE, P. C. Mineral nutrition of forage *Arachis*. In: Kerridge, Peter C.; Hardy, Bill (Eds.). **Biology and agronomy of forage *Arachis***. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT): Cali, CO. p. 71-83, 1994. (CIAT, n. 240).

ROSA, C. M.; CASTILHOS, R. M. V.; VAHL, L. c.; CASTILHOS, D. d.; PINTO, L. BORTOLON, E. S. O.; LEAL, O. A.. 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**, [s.l.], v. 33, n. 4, p.959-967, ago. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-06832009000400020>.

SÁ, O. A. A. L.; ALMEIDA, P. R. R., RUFINI, M., CRUVINEL, I. A. F.; CASAGRANDE, D. R.; MOREIRA, F. M. S.. Microsymbionts of forage peanut under different soil and climate conditions belong to a specific group of *Bradyrhizobium* strains. **Applied Soil Ecology**, [s.l.], v. 143, p.201-212, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.07.018>.

SANTANA, P. H. L.. **Revegetação de rejeito oriundo do beneficiamento de minério de ferro: espécies associadas com estimulantes de crescimento**. 2018. 78f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2018.

SANTOS, L. A.; REIS, V. M.. **A formação do nódulo em leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 36 p. (Embrapa Agrobiologia. Documento, 251).

SCHLINDWEIN, G.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; AZAMBUJA, A. C.; GRANADA, C.; GABIATTI, N.; PRATES, F.; STUMPF, R.. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alfaca. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 38, n. 3, p.658-664, jun. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782008000300010>.

SINGH, M.; SINGH, D.; GUPTA, A.; PANDEY, K. D.; SINGH, P. K.; KUMAR, A.. Plant Growth Promoting Rhizobacteria. **PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture**, [s.l.], p.41-66, 2019. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-815879-1.00003-3>.

SPRENT, J.I. **Nodulation in legumes**. Kew, Royal Botanic Gardens. 146p. 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 5.ed. 2013. 918p.

TERRA, A. B. C.; FLORENTINO, L. A.; REZENDE, A. V.; SILVA, N. C. D.. Leguminosas forrageiras na recuperação de pastagens no Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 42, n. 2, p. 11-20, jun. 2019.

TOWNSEND, C. R.; PEREIRA, R. G. A.; COSTA, N. L.. **Aspectos econômicos da recuperação de pastagens no Bioma Amazônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2009. 28 p. (Embrapa Rondônia. Documento, 131).

TREVISAN, S.; FRANCIOSO, O.; QUAGGIOTTI, S.; NARDI, S.. Humic substances biological activity at the plant-soil interface. **Plant Signaling & Behavior**, [s.l.], v. 5, n. 6, p.635-643, jun. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/psb.5.6.11211>.

UHEDA, E.; DAIMON, H.; YOSHIZAKO, F. Colonization and invasion of peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots by gusA-marked *Bradyrhizobium* sp. **Canadian Journal of Botany**, [s.l.], v. 79, n. 6, p.733-738, 1 jun. 2001. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/b01-050>.

ZANDONADI, D. B.; MATOS, C. R. R.; CASTRO, R. N.; SPACCINI, R.; OLIVARES, F. L.; CANELLAS, L. P.. Alkamides: a new class of plant growth regulators linked to humic acid bioactivity. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-12, dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40538-019-0161-4>

ZANIN, L.; TOMASI, N.; ZAMBONI, A.; SEGA, D.; VARANINI, Z.; PINTON, R.. Water-extractable humic substances speed up transcriptional response of maize roots to nitrate. **Environmental and Experimental Botany**, [s.l.], v. 147, p.167-178, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.12.014>.

CAPÍTULO 4: POTENCIAL DOS BIOFERTILIZANTES E BIOESTIMULANTE NO CRESCIMENTO DE *Arachis pintoï* cv. Amarillo MG 100 CULTIVADO EM SOLO DE PASTAGEM DEGRADADA

RESUMO

A recuperação das pastagens com introdução de leguminosas forrageiras associadas a biofertilizantes e bioestimulantes é alternativa para restabelecer o potencial produtivo das pastagens em áreas degradadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes biotecnologias nos atributos fitotécnicos, nutricionais e fisiológicos em plantas de amendoim forrageiro (*Arachis pintoï* cv. Amarillo MG 100) e seus efeitos sobre a atividade microbiológica no solo. O experimento foi realizado em casa de vegetação, em delineamento experimental de blocos casualizados em fatorial 2x5, com 4 repetições, consistindo de dois manejos: 1- sem calagem e adubação (SCA); 2 – com calagem e adubação (CCA), associados a cinco tecnologias: 1) *Bradyrhizobium* spp.; 2) Fungo micorrízico arbuscular (FMA) - *Rhizogloinus clarum*; 3) Inoculação via semente com *Bradyrhizobium* spp. associado a aplicação foliar de substâncias húmicas - SH (concentração 40 mg L⁻¹ de C) aos 20 e 40 dias após emergência; 4) Coinoculação de *Bradyrhizobium* spp e FMA; e 5) Testemunha sem inoculação. Aos 60 dias após emergência foram avaliados os parâmetros: trocas gasosas, rendimento quântico do fotossistema II (F_v/F_m), teor de clorofila total, massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR), altura total das plantas, diâmetro do caule, número de nódulos (NNOD), taxa de colonização de FMA, atividade microbiana no solo (FDA), teores e conteúdos de N, P, K, Ca e Mg no tecido da parte aérea. Plantas cultivadas no manejo CCA apresentaram maior MSPA, MSR e NNOD. As maiores produções de MSR foram observadas na presença de *Bradyrhizobium* spp. e SH+*Brad.* spp. Os maiores acúmulos de nutrientes foram observados nos tratamentos *R. clarum* e coinoculação. Houve aumento na atividade do diacetato de fluoresceína no manejo SCA. As plantas cultivadas no manejo SCA apresentaram taxa de colonização micorrízica 24,5% superior àquelas cultivadas em solo com calagem e adubação. As biotecnologias melhoram os resultados de trocas gasosas, especialmente nas plantas coinoculadas e que receberam SH+*Brady.* spp.

Palavras-chave: amendoim forrageiro, *Bradyrhizobium* spp., *Rhizogloinus clarum*, substâncias húmicas.

ABSTRACT

The recovery of pastures with the introduction of forage legumes associated with biofertilizers and biostimulants is an alternative to restore the productive potential of pastures in degraded areas. The aim of this work was to evaluate the effect of different biotechnologies on phytotechnical, nutritional and physiological attributes in forage peanut plants (*Arachis pintoii* cv. Amarillo MG 100) and their effects on soil microbiological activity. The experiment was carried out in a greenhouse, in a randomized block design in a 2x5 factorial, with 4 replications, consisting of two managements: 1- without liming and fertilization (SCA); 2 - with liming and fertilization (CCA), associated with five technologies: 1) *Bradyrhizobium* spp .; 2) Arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) - *Rhizoglossum clarum*; 3) Inoculation via seed with *Bradyrhizobium* spp. associated with foliar application of humic substances - SH (40 mg L⁻¹ concentration of C) at 20 and 40 days after emergence; 4) Co-inoculation of *Bradyrhizobium* spp and FMA; and 5) Witness without inoculation. At 60 days after emergence, the parameters were evaluated: gas exchange, quantum yield of photosystem II (F_v/F_M), total chlorophyll content, dry mass of the aerial part (MSPA) and root (MSR), total plant height, diameter of the stem, number of nodules (NNOD), colonization rate of AMF, microbial activity in the soil (AMF), contents and contents of N, P, K, Ca and Mg in the tissue of the aerial. Plants grown in CCA management showed higher MSPA, MSR and NNOD. The highest production of MSR was observed in the presence of *Bradyrhizobium* spp. and SH+*Brad.* spp. The greatest accumulations of nutrients were observed in *R. clarum* and co-inoculation treatments. There was an increase in the activity of fluorescein diacetate in SCA management. Plants grown in SCA management showed a mycorrhizal colonization rate 24.5% higher than those grown in soil with liming and fertilization. Biotechnologies improve gas exchange results, especially in co-inoculated plants that received SH+*Brady.* spp.

Keywords: forage peanuts, *Bradyrhizobium* spp., *Rhizoglossum clarum*, humic substances.

1.0 INTRODUÇÃO

O setor agropecuário vem impulsionando o crescimento do produto interno bruto (PIB) brasileiro, em que a produção de bovinos apresenta a maior contribuição positiva, sendo o produto de maior peso no componente, apresentando crescimento de 2,7% para o fechamento de 2019 (KRETER; JÚNIOR, 2019). No entanto, o rebanho brasileiro em sua grande maioria é criado em pastagem extensiva, no qual o sistema de produção favorece a degradação das pastagens, fenômeno de preocupação global, que impacta diretamente as propriedades físicas, químicas e biológicas dos solos (SATTLETER et al., 2017).

A degradação de pastagens contribui consideravelmente para subutilização destas áreas, sendo usadas abaixo do seu real potencial produtivo. A limitação no desenvolvimento das forragens decorre especialmente da escolha incorreta da forrageira, da deficiência de macro e micronutrientes, sobretudo em solos altamente intemperizados (DIAS-FILHO, 2017).

Dentre os nutrientes essenciais, o nitrogênio além de requerido em maior quantidade, é um elemento primordial para potencializar a produção de matéria seca, aumentar o vigor de rebrota e promover o crescimento rápido de forrageiras (TEIXEIRA et al., 2011), no entanto, o aporte do nitrogênio nos solos ocorre principalmente por meio de fertilizantes sintéticos, em que, perdas econômicas e poluição ambiental, decorrem no manejo inadequado desses fertilizantes (DUBEUX; SOLLENBERGER, 2020).

Neste contexto, os estudos da associação de leguminosas forrageiras com bactérias diazotróficas (BD) em diferentes condições edafoclimáticas, contribuem para a redução no uso de fertilizantes sintéticos, favorecendo a proteção do solo, a ciclagem de nutrientes e, em última análise, em uma melhor suplementação proteica do rebanho (CARVALHO, 2014; DIAS-FILHO, 2017). No entanto, somente a introdução desta tecnologia não possibilita ganhos expressivos no desenvolvimento da forrageira, uma vez que a fixação biológica de nitrogênio (FBN) requer outros nutrientes essenciais que são frequentemente deficientes em solos de pastagens, como P, K, S, B, Mo e, em alguns casos, Fe (DUBEUX; SOLLENBERGER, 2020). Desta forma, mesmo com introdução de leguminosas eficientes na FBN é necessário realizar a correção do pH e aplicar fertilizantes adequadamente, afim de diminuir o processo de degradação destas áreas.

Inúmeras leguminosas forrageiras vêm sendo estudadas, mas, a introdução de amendoim forrageiro (*Arachis pintoi* Krap. & Greg.) por ser uma planta amplamente utilizada nas regiões tropicais, em virtude da boa produção de matéria seca, elevado valor nutritivo, excelente capacidade de cobrir o solo, reflete positivamente na recuperação de áreas degradadas (MIRANDA et al., 2008a), principalmente quando inoculado com rizóbio, que pode contribuir com até 74% do N derivado do processo de FBN (CARVALHO et al., 2019).

Associado aos benefícios do amendoim forrageiro, a utilização de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) favorece o crescimento das plantas, em decorrência do maior influxo de minerais, especialmente, fósforo, cobre e zinco, em virtude da maior exploração do solo pelas hifas e o desenvolvimento intra e extrarradicular do FMA (SMITH; RED, 2008). Além do mais, pode ocorrer interação com outros microorganismos do solo capazes de aumentar absorção e transferência de nutrientes às plantas hospedeiras (PIERRE et al., 2014, MENG et al., 2015).

Em sistemas agrícolas de pastagem, de modo geral os solos são pobres quimicamente e a reposição dos nutrientes não segue as necessidades da cultura, comprometendo o ciclo bioquímico do vegetal. A utilização de bioestimulantes, a exemplo das substâncias húmicas (SH), pode melhorar a absorção dos nutrientes mesmo que em menores concentrações (DU JARDIN et al., 2015), decorrente do maior estímulo na emissão de raízes laterais e pelos radiculares, favorecendo a indução de rotas de sinalização ligadas à ação das auxinas na promoção do crescimento radicular (SILVA et al., 2011). As SH estimulam a H^+ -ATPases presentes na membrana plasmática, favorecendo a extrusão de H^+ , e conseqüentemente, no relaxamento da parede celular, permitindo crescimento vegetal (CANELLAS et al., 2002, RODDA et al., 2006).

Como hipótese do presente trabalho, acredita-se na utilização de estirpes de BD e FMA em forrageiras, associadas à aplicação de SH visando atender à necessidade parcial de N e P, permitindo um maior desenvolvimento das plantas, conseqüentemente, um melhor potencial produtivo.

2.0 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Caracterização física e química do solo

O solo utilizado foi representativo de uma área de pastagem degradada na região de Jerônimo Monteiro-ES, sendo retirado do terço médio do relevo, na profundidade de 0-20 cm, classificado regionalmente como Argissolo vermelho-amarelo distrófico (CUNHA et al. 2016). Posteriormente, o solo foi seco ao ar e peneirado em peneira com malha de 2,0 mm para obtenção da terra fina seca ao ar (TFSA) e caracterização física e química do solo (Tabela 1).

Tabela 1: Caracterização física e química do solo utilizado no experimento em casa de vegetação.

| pH em H ₂ O | pH em CaCl ₂ | P | K | Ca | Mg | Al | H | H+Al | SB | T | t | |
|------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|------|--------|-------|-------|--------|
| ----- | | --mg dm ⁻³ -- | | | -----cmolc dm ⁻³ ----- | | | | | | | |
| 4,10 | 3,88 | 1,46 | 26,5 | 0,23 | 0,08 | 0,80 | 4,7 | 5,50 | 0,38 | 5,88 | 1,18 | |
| V | m | MO | P-rem | S | B | Fe | Cu | Mn | Zn | Areia | Silte | Argila |
| -----% | ----- | g kg ⁻¹ | mgL ⁻¹ | -----mg dm ⁻³ ----- | | | ----- | | -----% | | | |
| 6,46 | 67,8 | 7,4 | 26,28 | 24,8 | 0,55 | 48,73 | 0,15 | 1,74 | 0,66 | 54,36 | 2,96 | 42,68 |

pH em água: potenciometria em solução solo-água 1:2,5; fósforo e potássio disponível: extraído por Mehlich-1; cálcio, magnésio e alumínio extraível: extraídos com solução de KCl 1 mol L⁻¹; SB = Ca + Mg + K; CTC = SB + (H + Al); V% = SB x 100/CTC; MO: teor de C do solo x 1,724.

2.2 – Experimentação em casa de vegetação

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação no período de março a maio de 2019, localizada na área experimental do Centro de Ciências Agrárias de Alegre, pertencente a Universidade Federal do Espírito Santo (latitude 20° 45' Sul, longitude 41° 29' Oeste, com elevação de 112 metros). De acordo com o Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural a precipitação pluviométrica é de 1.200 mm/ano e o clima da região é quente úmido. Segundo a Classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Aw, clima tropical, caracterizado pelo inverno seco e verão chuvoso. Diariamente foram registrados os valores de temperatura máxima e mínima no interior da casa de vegetação. As temperaturas diárias máximas variaram de 26,0 °C a 38,0 °C, com média de 34,7 °C, e as temperaturas diárias mínimas entre 19,0 °C a 23,0 °C, com média de 20,9 °C.

O delineamento experimental foi de blocos casualizados em fatorial 2x5, com 4 repetições, totalizando 40 unidades experimentais. Os fatores consistiram em dois manejos, agrupados de acordo com a adição de calcário e adubação (SCA - sem calagem e adubação; CCA – com calagem e adubação), e quatro biotecnologias e um controle: 1) Inoculação via semente com *Bradyrhizobium* spp.; 2) Inoculação com

fungo micorrízico arbuscular (FMA) da espécie *Rhizoglyphus clarum* (T.H. Nicolson & N.C. Schenck) Sieverd., G.A. Silva & Oehl (2014) (CNPAB 005); 3) Inoculação via semente com *Bradyrhizobium* spp. associado à aplicação foliar de substâncias húmicas - SH (concentração 40 mg L⁻¹ de C) aos 20 e 40 dias após emergência; 4) Coinoculação de *Bradyrhizobium* spp. e *R. clarum*; e 5) Testemunha sem inoculação.

No manejo CCA (com calagem e adubação) as unidades experimentais receberam calagem determinada pelo método da saturação por bases, para elevar o valor V a 60%, utilizando-se o produto comercial GEOX HD (PRNT = 134%) e incubado por 21 dias em sacos plásticos. Durante a reação do GEOX no solo, a umidade foi mantida a 60% do volume total de poros (VTP).

Transcorrido o período de incubação do solo, foi realizada a adubação de implantação com macro e micronutrientes. As doses dos macronutrientes - fósforo, potássio e enxofre - utilizadas foram de 120, 60 e 40 mg dm⁻³, respectivamente, em que P, K foram aplicados na proporção de 40% do recomendado por Novais et al. (1991). Para adubação com micronutrientes foram aplicadas as doses de 0,81 mg dm⁻³ B; 1,33 mg dm⁻³ Cu; 1,55 mg dm⁻³ Fe; 3,66 mg dm⁻³ Mn; 0,15 mg dm⁻³ Mo e 4,00 mg dm⁻³ Zn (NOVAIS et al., 1991), sendo utilizados para fornecimento de macro e micronutrientes os seguintes reagentes pa: KH₂PO₄; CaHPO₄; H₃BO₃; CuSO₄.5H₂O; MnSO₄.H₂O; Na₂SO₄; FeSO₄.H₂O; ZnSO₄.7H₂O, Na₂MoO₄.2H₂O. A umidade do solo foi mantida em 60% do volume total de poros (VTP).

2.3 – Inoculação de *Bradyrhizobium* spp. e *Rhizoglyphus clarum*

Inicialmente, foram removidos o pericarpo das sementes, deixando apenas as amêndoas. Em seguida, as sementes foram desinfestadas superficialmente com álcool etílico a 70% v/v por 1 min e hipoclorito de sódio a 2% por 20 min, posteriormente foram lavadas 10 vezes com água destilada, para retirada de resíduos dos tratamentos anteriores (HUNGRIA et al., 2010). Em seguida foram imersas em água destilada por uma hora, para ficarem embebidas e garantir a germinação.

Para inoculação de *Bradyrhizobium* spp. BR1433 (SEMIA 6440), foi utilizada a proporção de 1g de inoculante turfoso para 50 g de semente, conforme recomendação pela Embrapa Agrobiologia. A inoculação foi realizada misturando o inoculante com as sementes e uma solução adesiva, a base de açúcar na concentração de 10%, sendo adicionado 100 g de açúcar em 1 litro de água, objetivando maior aderência do

inoculante às sementes, posteriormente, deixando-as secar na sombra por 15 minutos conforme (PURCINO et al. 2000).

Após inoculação das bactérias diazotróficas realizou-se o plantio em bandeja de 128 células, semeado 2 sementes por célula. Transcorrido 12 dias após a emergência (DAE), foram transplantadas 8 mudas para cada vaso definitivo com capacidade de 5 dm³, sendo realizado o desbaste aos 15 DAE, selecionando 6 plantas por vaso, que apresentavam melhor homogeneidade, vigor e tamanho.

Para os tratamentos onde foi realizada a inoculação com FMA isoladamente ou coinoculado, as micorrizas arbusculares foram inoculadas no momento do transplante das mudas, sendo colocados a 5 cm abaixo do nível de transplante cerca de 0,73 g de inóculo/vaso (solo+esporos+raízes) de *Rhizoglyphus clarum* (T.H. Nicolson & N.C. Schenck) Sieverd., G.A. Silva & Oehl (2014) (CNPAB 005), conforme recomendado pela Embrapa Agrobiologia. Nos tratamentos sem inóculo foram colocados 0,73 g de solo-inóculo autoclavado, visando à padronização entre os tratamentos, conforme metodologia de Miranda et al. (2008b).

2.4 – Extração e aplicação de substâncias húmicas

As substâncias húmicas foram isoladas de vermicomposto (Tabela 2), sendo utilizados 200 g de vermicomposto e 1,8 L de água deionizada (relação vermicomposto: água deionizada de 1:9 v:v). O material foi agitado por um período de 6 horas, e após 12 horas de repouso o extrato solúvel foi retirado por decantação e armazenado. Posteriormente foi determinado o teor de carbono (C) das SH (MENDONÇA; MATOS, 2005). A concentração de SH se baseou no teor de carbono, sendo realizada a pulverização foliar aos 20 e 40 DAE na concentração de 40 mg L⁻¹ de C de SH.

Tabela 2: Composição média do vermicomposto usado na extração de substâncias húmicas.

| pH | C | P | K ⁺ | Ca ²⁺ | Mg ²⁺ | Al ³⁺ | H+Al | SB | CTC |
|------|--------------------|---------------------|-----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------|-------|-------|
| | g kg ⁻¹ | mg dm ⁻³ | -----cmolc dm ⁻³ ----- | | | | | | |
| 6,29 | 60,4 | 987,50 | 2,57 | 7,71 | 8,25 | 0,0 | 1,80 | 18,52 | 20,32 |

pH em H₂O; SB: soma de bases trocáveis; CTC: capacidade de troca de cátions.

A primeira aplicação da SH foi realizada aos 20 DAE, onde as temperaturas máxima e mínima diária encontravam-se a 38° C e 21° C, respectivamente. A

pulverização foi realizada entre às 18 e 19 h, pulverizando 12 mL vaso⁻¹, correspondendo a 2,0 mL planta⁻¹, com auxílio de um pulverizador manual de pressão com bico regulável. Transcorrido 40 DAE, foi realizada a segunda aplicação da SH, acompanhando o mesmo horário da 1ª aplicação. No decorrer do dia as temperaturas máxima e mínima diária encontravam-se a 35° C e 23° C, respectivamente. Utilizando o mesmo equipamento de aplicação, foi aplicado 24 mL vaso⁻¹ correspondendo a 4,0 mL planta⁻¹. Para ambas as aplicações, objetivando a padronização da umidade na superfície da folha, foram realizadas aplicações com o mesmo volume em água deionizada, nos demais tratamentos.

2.5 – Avaliação dos atributos fisiológicos, fitotécnicos, nutricionais e microbiológicos

Aos 60 dias após a emergência foram analisadas medidas de trocas gasosas, rendimento quântico do fotossistema II, teor de clorofila total (Índice de Clorofila Falker), produção de massa seca da parte aérea e raiz, altura total das plantas, diâmetro do caule, número de nódulos, acúmulo de nutrientes na parte aérea, taxa de colonização de FMA e atividade microbiana no solo pelo método de diacetato de fluoresceína (FDA).

2.5.1 – Trocas gasosas

A medição das trocas gasosas foi realizada no terço mediano nas folhas em um folíolo totalmente expandido, entre 9:00 e 11:00 horas, por meio do analisador a gás infravermelho portátil (IRGA), modelo LI 6400 XT Portable Photosynthesis System (LI-COR, Lincoln, NE, USA), utilizando uma fonte luminosa fixa em 1000 mmol m⁻² s⁻¹ de intensidade de fluxo de fótons fotossintéticos onde foram obtidas as seguintes variáveis: *A* – taxa de assimilação líquida de CO₂ (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹); *E* – taxa de transpiração (mmol H₂O m⁻² s⁻¹); *g_s* – condutância estomática (mol H₂O m⁻² s⁻¹); *C_i* – concentração interna de CO₂ (μmol CO₂ mol⁻¹). De posse desses dados foram quantificadas a eficiência instantânea no uso da água (EUA) (*A/E*) [(μmol CO₂ m⁻² s⁻¹)/(mmol H₂O m⁻² s⁻¹)] e a eficiência instantânea de carboxilação (EiC) (*A/C_i*) [(μmol CO₂ m⁻² s⁻¹)/(μmol CO₂ mol⁻¹)] (KONRAD et al., 2005).

2.5.2 – Teor total de clorofila e rendimento quântico do fotossistema II (PSII)

A estimativa do teor de clorofila, através do índice de clorofila falker (ICF), foi realizada no terço mediano nas folhas em um folíolo totalmente expandido, em duas plantas de cada um dos quatro vasos, em cada tratamento, por meio do medidor portátil de clorofila, ClorofiLOG (Falker Automação Agrícola, Brasil), entre 9:00 e 11:00 horas.

A determinação do rendimento quântico do fotossistema II – PSII - (F_v/F_M), foi quantificada com utilização de fluorômetro portátil de luz modulada (PSI FluorPen, modelo FP 100, Drasov, República Checa), após adaptação dos folíolos ao escuro por 15 minutos. As medições foram realizadas nos mesmos horários e folíolos no qual realizou-se a leitura do teor de clorofila.

2.5.3 – Massa seca, altura da planta, diâmetro do caule

A determinação da altura total das plantas foi realizada com régua graduada. Para a determinação do diâmetro do caule foi utilizado um paquímetro digital. Em ambas as avaliações foram utilizadas quatro plantas de cada um dos quatro vasos, em cada tratamento, ao final do experimento.

A parte aérea e a raiz foram coletadas, armazenadas em sacos de papel e colocadas em estufa a 65° C durante 72 horas (até atingir peso constante) para determinação da massa seca.

2.5.4 – Análise nutricional

Após a secagem em estufa da parte aérea e raiz, as amostras foram submetidas à trituração em moinho de facas para posterior determinação dos teores nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg).

A análise química do N foliar foi realizada por digestão sulfúrica seguida de destilação Kjeldahl, de acordo com Embrapa (2000). Para análise química foliar de P, K, Ca e Mg foi realizada digestão nítrica. A leitura do P foi realizada por espectrofotômetro a 725 nm; K por fotômetro de chama e as leituras de Ca e Mg por espectroscopia de absorção atômica, de acordo com Johnson e Ulrich, (1959) e Malavolta et al. (1997).

2.6 – Avaliação de parâmetro microbiológico

2.6.1 – Contagem de nódulos

Após coleta e lavagem das raízes, os nódulos foram contados. Os dados foram resultantes da média das seis plantas, de cada parcela, e expressos em números de nódulos.

2.6.2 – Avaliação da porcentagem de colonização micorrízica

A taxa de colonização micorrízica foi avaliada pela presença ou ausência de colonização em 10 segmentos de raízes, por repetição, com aproximadamente 1 cm de comprimento, montados em lâminas para microscopia.

As amostras de raízes obtidas foram coletadas, lavadas com água corrente e as raízes finas foram cortadas em aproximadamente 1 cm de comprimento e armazenadas em álcool etílico 50% para a avaliação sequencial da porcentagem de colonização micorrízica. A coloração das raízes em azul de tripano foi efetuada de acordo com a metodologia descrita por Grace e Stribley (1991), adaptada com KOH (5%) a 85°C por 10 minutos em banho-maria, sendo em seguida lavadas novamente e transferidas para solução de peróxido de hidrogênio 3% e hidróxido de amônia 20% por 20 minutos para clarificação. Posteriormente lavado em água corrente e deixado em HCl (5%) por 5 minutos, em seguida transferido para corante azul de tripano em banho-maria a 85° C por 10 minutos. Após a coloração em azul de tripano, 10 segmentos de raízes foram depositados, com o auxílio de uma pinça, sobre lâminas, onde foram adicionadas algumas gotas de glicerol ácido sobre as raízes, sendo posteriormente cobertas por uma lamínula e contadas com auxílio de microscópio estereoscópico (40x). Para determinar a porcentagem de colonização micorrízica, os segmentos de raízes foram levados ao microscópio óptico para a observação da presença de estruturas de FMAs.

2.6.3 – FDA - Hidrólise de diacetato de fluoresceína

A atividade microbiana foi identificada a partir da atividade do diacetato de fluoresceína (FDA) no solo. O FDA foi dissolvido em acetona, para a obtenção da solução estoque 1,0 g L⁻¹. Para demonstração da atividade microbiana foram pesados

0,5 g de solo de cada amostra, ao qual foi acrescentado 6 mL de tampão fosfato 50mM pH 7,6 autoclavado e 120 µL da solução de FDA. A amostra foi incubada por 1 hora, em shaker rotativo a 180 rpm a 32° C ao abrigo da luz, em tubo Falcon de 15 mL. O controle negativo foi obtido a partir de 0,5 g de solo autoclavado e deixado nas mesmas condições descritas acima. Após este período, o material foi centrifugado a 5000 rpm por 20 min, uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi retirada da amostra e distribuída em placas de 96 poços em triplicata. Posteriormente foi realizada a leitura no espectrofotômetro *Hidex Chameleon Multilabel Detection Platform* com absorvância de 492 nm pelo programa *MikroWin 2000*.

2.7 – Análises estatísticas

Os dados foram analisados quanto à sua normalidade e homogeneidade de variância. Em seguida, foram feitas análises de variância e o teste Tukey em 5% de probabilidade para separação das médias pelo programa R (ExpDes) (R Development Core Team, 2016). Para variável FDA, os dados foram transformados $\sqrt{x + 0,5}$ para obtenção da normalidade e homogeneidade da variância. Para confecção dos gráficos utilizou-se o software SigmaPlot® versão 10 (SYSTAT SOFTWARE Inc, 2006).

3.0 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 – Atributos fitotécnicos

Constatou-se efeito altamente significativo ($p \leq 0,01$) na interação manejo e biotecnologia para a massa seca de parte aérea (MSPA) (Figura 1a). Para os demais atributos fitotécnicos foi observada significância somente do efeito simples dos fatores. As plantas cultivadas no manejo com calagem e adubação (CCA) apresentaram aumento médio de 75,04% da MSPA e 12,07% da massa seca de raiz (MSR), quando comparadas aos tratamentos cultivados no manejo sem calagem e adubação (SCA).

Resultado positivo na MSPA e MSR no manejo com calagem e adubação já era esperado pelo fato da melhoria dos atributos químicos do solo decorrente da calagem e ao fornecimento de nutrientes via adubação, que favoreceram a disponibilidade e conseqüentemente a absorção de nutrientes pelas plantas. Deste modo, o crescimento de

A. pintoi cv. Amarillo é severamente afetado pela baixa disponibilidade de nutrientes e toxidez de Al, tanto que Rheinheimer et al. (1997) somente observaram ganhos significativos na produção de leguminosas forrageiras após melhorias de tais condições.

Tabela 3: Valores de F, níveis de significância, coeficientes de variação e médias da altura de planta (AP), diâmetro do caule (DC), número de nódulos (NNOD), massa seca de parte aérea (MSPA) e raiz (MSR) de *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100.

| Fonte Variação | AP | DC | NNOD | MSPA | MSR |
|--------------------|----------------------|--------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| Bloco | 0,84 ^{ns} | 3,75 [*] | 2,14 ^{ns} | 0,27 ^{ns} | 0,67 ^{ns} |
| Man. (M) | 179,33 ^{**} | 0,15 ^{ns} | 24,20 ^{**} | 417,24 ^{**} | 9,78 ^{**} |
| Biot. (B) | 1,50 ^{ns} | 2,50 ^{ns} | 5,64 ^{**} | 6,26 ^{**} | 10,08 ^{**} |
| M*B | 1,18 ^{ns} | 0,71 ^{ns} | 1,16 ^{ns} | 5,75 ^{**} | 1,00 ^{ns} |
| Média geral | 4,76 | 2,26 | 33,12 | 3,17 | 1,49 |
| CV(%) | 9,39 | 7,35 | 30,56 | 8,45 | 11,51 |

Man.: Manejo; Biot.: Biotecnologia. Significativo pelo teste F: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: não significativo.

As maiores produções de MSPA no manejo CCA associado às biotecnologias foram obtidas – *R. clarum* (FMA) (4,58 g vaso⁻¹), seguida da coinoculação (4,40 g vaso⁻¹). As plantas que receberam SH+*Brad.* spp. (3,87 g vaso⁻¹) e somente inóculos de *Bradyrhizobium* spp. (3,68 g vaso⁻¹) não diferiram estatisticamente do controle, embora tenha ocorrido aumento de até 6,31% no rendimento de MSPA. Sugere-se que nos tratamentos com FMA em decorrência do maior volume de solo explorado, na ação conjunta entre sistema radicular e hifas, tenham contribuído para aumento na absorção de nutrientes, favorecendo o ganho expressivo de massa seca.

Estes resultados podem ser comprovados a partir dos estudos de Fellbaum et al. (2014), em que a potencialização da colonização micorrízica é controlada por mecanismos diretamente envolvidos nos níveis de nitrogênio (N) e fósforo (P) na planta. Em condições de alta disponibilidade de P reduz-se a colonização por FMA, no entanto, este efeito é invertido pela falta de N, sinalizando de forma positiva a colonização (BREUILLIN-SESSOMS et al., 2015). Justificando o ocorrido nos tratamentos em que houve a inoculação isolada do *R. clarum* e na coinoculação, sendo menos expressivo na coinoculação, possivelmente em decorrência do fornecimento do nitrogênio via FBN, melhorando o aporte de N e P da planta.

De forma contrária, no manejo SCA as médias dos tratamentos foram estatisticamente iguais, porém observou-se incremento médio na MSPA de 16,54%,

com utilização das biotecnologias em relação à testemunha (sem inoculação). As prováveis hipóteses para o baixo desempenho das biotecnologias neste manejo estão as condições abióticas desfavoráveis (pH ácido e baixa disponibilidade de nutrientes), influenciando no desenvolvimento das bactérias diazotróficas, conseqüentemente das plantas e, o maior efeito dreno imposto pelos fungos, em decorrência de uma provável maior exploração do solo em busca de nutrientes.

O baixo pH dos solos representa um problema que afeta grandes áreas agrícolas comprometendo a disponibilidade de nutrientes. Nestas condições efeitos negativos são observados na microbiota do solo, especialmente os microrganismos benéficos à produção das plantas como os rizóbios, afetando sua sobrevivência e, conseqüentemente, interferindo na nodulação e fixação de nitrogênio (MIGUEL; MOREIRA, 2001).

Os FMA habitam dois ambientes – raízes das plantas, onde recebem C orgânico e, o solo, onde absorvem nutrientes (SMITH; SMITH, 2011). As respostas da inoculação de FMA podem variar para uma mesma espécie vegetal, dependendo do fungo associado à planta. Em determinadas situações a micorriza pode representar um dreno fotoassimilado, levando a um desbalanço fisiológico entre fungo e planta hospedeira (SIQUEIRA et al., 2007).

Avaliando o efeito simples das biotecnologias, foi observado influência fortemente significativa ($p \leq 0,01$) sobre o parâmetro MSR. A maior MSR foi observada na presença de *Bradyrhizobium* spp. (1,74 g vaso⁻¹), apesar da mesma não diferir estatisticamente do tratamento com SH+*Brad.* spp. (1,60 g vaso⁻¹). Quando comparados os tratamentos de *R. clarum* e coinoculação com as plantas que receberam somente o inóculo de *Bradyrhizobium* spp., verifica-se valores de MSR equivalentes a 85,37; 78,21%, respectivamente, embora não tenham diferido estaticamente do controle (1,25 g vaso⁻¹) (Figura 1b).

Apesar da menor MSR nos tratamentos com FMA isolados ou conjuntamente com *Bradyrhizobium* spp., observou-se maior ganho de MSPA e redução na relação raiz/parte aérea nestes tratamentos, devido ao efeito – aquisição e facilitador - no transporte de nutrientes para planta, decorrente da micorrização, sugerindo que estes microrganismos atuaram como extensão do sistema radicular, possibilitando maior acesso das plantas aos nutrientes, compensando o gasto energético do vegetal no crescimento radicular, direcionando nutrientes para o desenvolvimento da parte aérea e, fotoassimilado para FMA.

Em um extenso trabalho de meta-análise sobre o impacto dos FMA na relação raiz/parte aérea, Veresoglou et al. (2011) detectaram um considerável declínio nesta relação quando as plantas foram cultivadas a partir de sementes na ausência de estresses abióticos. A provável explicação seria que a disponibilidade de nutrientes causa diminuição da alocação de biomassa radicular, investindo no maior aporte de parte aérea quando as plantas são inoculadas com FMA.

Um estudo recente sobre efeito de biofertilizante de FMA em *Panax quinquefolius* L. não observou efeito significativo na MSR entre os tratamentos – cultivo contínuo e FMA – sugerindo que nas plantas com biofertilizante, muito provavelmente, o transporte de nutrientes foi direcionado para parte aérea do que as raízes, minimizando os efeitos da colheita sucessiva (LIU et al., 2020).

O efeito de inoculação isolada ou conjunta de *Glomus intraradícios* e *Rhizobium* spp. na biomassa total de genótipos de feijão foi estudado por Ballesteros-Almanza (2010) sobre duas condições hídricas. Os autores constataram que a biomassa total das plantas inoculadas com *Rhizobium* spp. demonstrou superioridade sob as plantas inoculadas com *Glomus* e aquelas coinoculadas e efeito negativo da inoculação micorrízica no desenvolvimento dos nódulos, quando comparadas às plantas inoculadas apenas com *Rhizobium* spp.

Diferentemente do observado na simbiose planta-bactéria diazotrófica, em que houve maiores respostas de MSR, uma vez que a produção de biomassa de parte aérea demonstrou ser menor nos tratamentos *Bradyrhizobium* spp. e SH + *Brad.* spp., nestas condições os efeitos destes tratamentos foram mais evidentes na expansão do sistema radicular, a fim de atender a demanda de nutrientes por parte da planta e das bactérias, podendo ser encarado como uma estratégia das plantas em absorver mais nutrientes em uma condição de baixo suprimento de nutrientes.

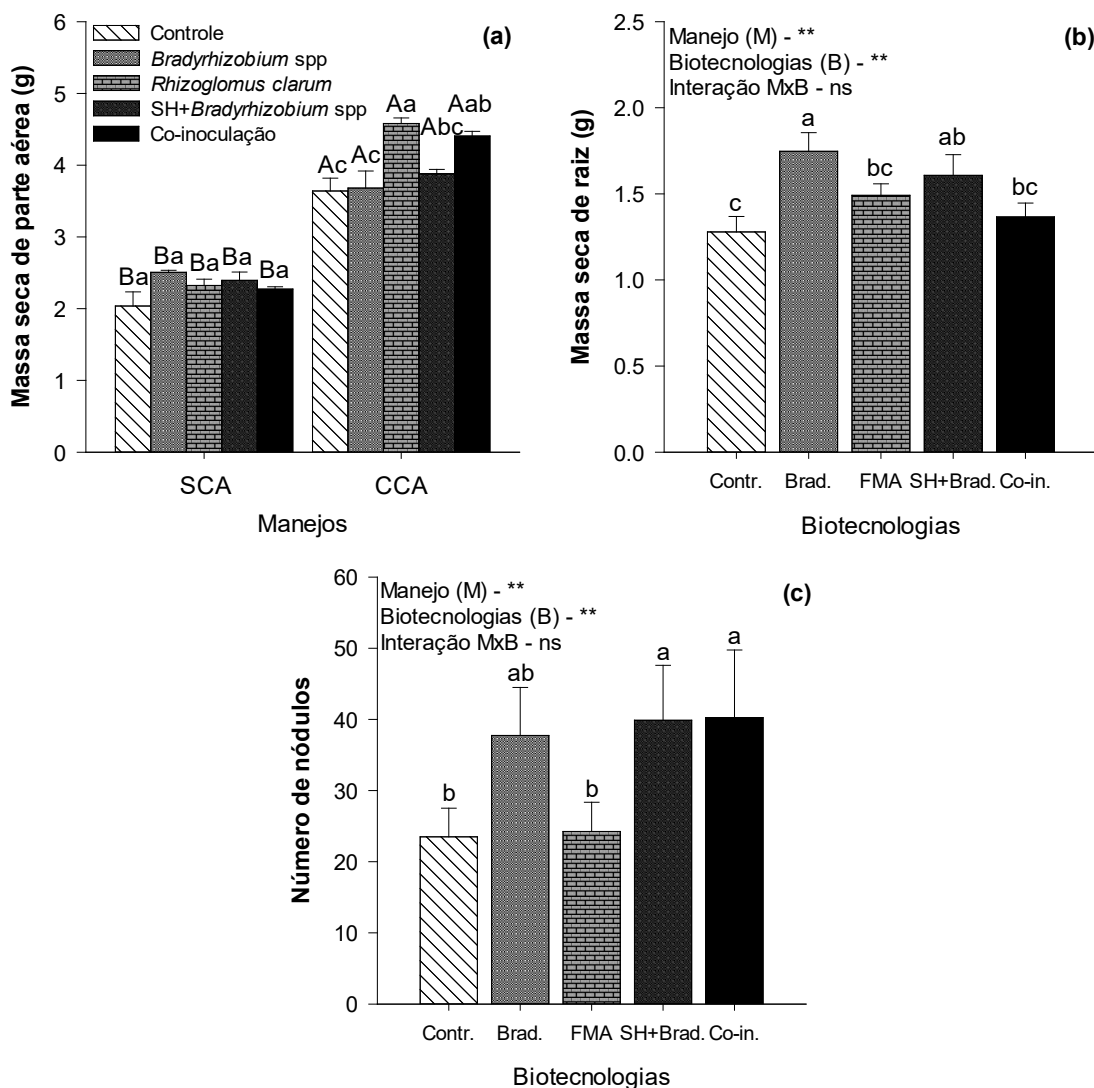


Figura 1: Massa seca de parte aérea (a), massa seca de raiz (b), número de nódulos (c) em *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 aos 60 dias. SCA: sem calagem e adubação; CCA: com calagem e adubação; Contr. (controle); Brad. (*Bradyrhizobium* spp); FMA (*Rhizoglopus clarum*); SH+Brad. (Substâncias húmicas - 40 mg L⁻¹ C e *Bradyrhizobium* spp); Co-in. (coinoculação). Médias ± erro padrão seguidas da mesma letra maiúscula entre manejos e minúscula entre biotecnologias, não diferem entre si, pelo teste Tukey para $p \leq 0,05$. Significativo * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: não significativo.

Em relação ao número de nódulos, observa-se (Tabela 3) que houve efeito significativo do manejo sobre a taxa de nodulação ($p \leq 0,01$). Na ausência de calagem e adubação registrou-se decréscimo no número de nodulação (NNOD) em média de 37%. O menor pH do solo no manejo SCA pode ter influenciado direta ou indiretamente de forma negativa na viabilidade da estirpe de *Bradyrhizobium* spp., o qual é fundamental para desenvolvimento destes microrganismos. O pH do solo está entre os principais

fatores limitantes da FBN por leguminosas, suprimindo ou retardando a formação dos nódulos (ABDULLAH, 2002).

No presente estudo constatou-se média de 33,12 nódulos planta⁻¹. Muniz et al. (2016) avaliando o efeito da inoculação de rizóbios em amendoim forrageiro durante 102 dias, observaram média de 43,87 nódulos planta⁻¹, enquanto que, Sá et al. (2019) relataram média de 39 nódulos planta⁻¹ ao inocular estirpes de *Bradyrhizobium* spp. (SEMIA 6440).

Com base na figura 1c, verificou-se que a taxa de nodulação aumentou cerca de 1,5 vezes ao aplicar as biotecnologias, sendo constatados maiores NNOD nos tratamentos – coinoculação, SH+*Brad.* spp e *Bradyrhizobium* spp.

O processo de FBN em leguminosas ocorre nos nódulos e demanda grandes quantidades de energia na forma de ATP, de modo que o adequado fornecimento de P pelo FMA contribui para o processo de nodulação (JESUS; SCHIAVO; FARIA, 2005). Já os resultados satisfatórios do tratamento SH+*Brad.* spp., decorrem do estímulo na emissão de pêlos radiculares e raízes laterais finas pelas aplicações da SH (CANELLAS; OLIVARES, 2014), onde há maior excreção de flavonóides, que ativam a expressão de genes *nod* reguladores da nodulação (SANTOS; REIS, 2008).

Nota-se que houve nodulação nos tratamentos controle e *R. clarum*, mesmo que em menor proporção. Esses resultados podem estar associados ao fato do substrato utilizado não ter sido autoclavado e, que provavelmente à presença de bactérias nativas no solo, favoreceu a nodulação.

3.2 - Atributos nutricionais

Na Tabela 4, são apresentadas as médias dos teores de macronutrientes N, P, K, Ca e Mg na parte aérea de *A. pintoi*, após 60 DAE. Ocorreu diferença significativa ($p \leq 0,05$) para os teores foliares de P e Ca. De modo geral, independente do manejo utilizado, as biotecnologias influenciaram de forma positiva no teor de nutrientes na parte aérea do amendoim forrageiro, exceto para o N no sistema de cultivo SCA inoculado com *R. clarum* e K no manejo CCA, em que receberam inóculos de *Bradyrhizobium* spp.

Tabela 4: Média \pm erro padrão dos teores de nutrientes (g kg^{-1}) em parte aérea de *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 aos 60 dias, cultivados sobre dois manejos com diferentes biotecnologias.

| Manejo | Biotec. | g kg^{-1} | | | | |
|--------------------|----------------------|---------------------|------------------|---------------------|------------------|--------------------|
| | | N | P | K | Ca | Mg |
| SCA | Controle | 23,79 \pm 0,53 | 0,36 \pm 0,017 | 16,71 \pm 0,43 | 7,92 \pm 0,18 | 5,24 \pm 0,12 |
| | <i>Brad. spp</i> | 24,24 \pm 0,72 | 0,37 \pm 0,014 | 18,07 \pm 0,98 | 8,03 \pm 0,45 | 5,28 \pm 0,28 |
| | <i>R. clarum</i> | 23,58 \pm 0,63 | 0,42 \pm 0,015 | 18,17 \pm 0,27 | 8,37 \pm 0,37 | 5,30 \pm 0,15 |
| | SH+ <i>Brad. spp</i> | 24,44 \pm 0,49 | 0,41 \pm 0,013 | 19,81 \pm 0,87 | 8,07 \pm 0,07 | 5,29 \pm 0,17 |
| | Co-inoc. | 24,46 \pm 0,55 | 0,43 \pm 0,014 | 18,18 \pm 0,26 | 8,60 \pm 0,34 | 5,39 \pm 0,07 |
| CCA | Controle | 24,52 \pm 0,16 | 0,70 \pm 0,017 | 20,87 \pm 0,61 | 13,15 \pm 0,48 | 4,81 \pm 0,14 |
| | <i>Brad. spp</i> | 26,60 \pm 0,93 | 0,78 \pm 0,211 | 20,05 \pm 1,41 | 16,66 \pm 1,03 | 4,87 \pm 0,15 |
| | <i>R. clarum</i> | 26,27 \pm 0,24 | 1,12 \pm 0,133 | 21,42 \pm 0,81 | 16,99 \pm 1,02 | 5,09 \pm 0,11 |
| | SH+ <i>Brad. spp</i> | 25,96 \pm 0,12 | 0,70 \pm 0,093 | 21,35 \pm 0,65 | 16,89 \pm 0,48 | 4,87 \pm 0,05 |
| | Co-inoc. | 26,94 \pm 0,58 | 1,23 \pm 0,195 | 21,55 \pm 0,37 | 17,67 \pm 1,40 | 5,27 \pm 0,11 |
| Média geral | | 25,50 ^{ns} | 0,743* | 19,98 ^{ns} | 12,40* | 5,15 ^{ns} |
| CV (%) | | 4,42 | 29,69 | 7,59 | 9,99 | 6,03 |

SCA: sem calagem e adubação; CCA: com calagem e adubação; *Brad. spp*: *Bradyrhizobium spp*; *R. clarum*: *Rhizoglossum clarum*; SH+ *Brad. spp*: Substâncias húmicas (40 mg L⁻¹ de C)+*Bradyrhizobium spp*; Co-inoc.: Coinoculação. * significativo e ^{ns} não significativo a 5% pelo Teste F.

Com base nas faixas adequadas de nutrientes na parte aérea de *A. pintoi*, determinada por Rao e Kerridge (1994), observou que os teores de nutrientes, exceto N e Mg, em ambos os manejos estão abaixo da faixa de concentração considerada adequada.

Os teores de N observados neste estudo são similares ao relatado por Miranda et al. (2003), que avaliaram o potencial de FBN de acessos de *Arachis spp*. E, obtiveram teores de N variando de 21,3 a 26,3 g kg^{-1} . Para os demais nutrientes observou-se somente teores Ca similares ao relatado por Santos (2012), avaliando genótipos de amendoim forrageiro no Acre – P (1,38 a 1,71 g kg^{-1}); K (25,47 a 29,37 g kg^{-1}); Ca (13,98 a 16,62 g kg^{-1}) e Mg (5,23 a 6,03 g kg^{-1}). Porém, os dados são parcialmente similares aos observados por Azevedo (2010) – P (0,97 a 2,30 g kg^{-1}); K (7,61 a 22,68 g kg^{-1}); Ca (14,24 a 21,06 g kg^{-1}) e Mg (4,42 a 9,16 g kg^{-1}) ao estudar o comportamento de genótipos de amendoim forrageiro sob o efeito de doses de P e presença de micorriza. As variações observadas neste trabalho decorrem da ausência de calagem e adubação no manejo SCA e da redução de 60% na dose de P e K no sistema de cultivo com calagem e adubação, sendo que os demais nutrientes foram fornecidos na dose recomendada, exceto o N, no qual dependeu do desempenho da biotecnologia.

A análise de variância (Tabela 5) demonstrou o efeito altamente significativo ($p \leq 0,01$) da interação manejo e biotecnologia no acúmulo dos nutrientes N, P, K, Ca e Mg na parte aérea das plantas de *A. pintoi* (Figura 2), sendo o efeito do manejo adotado sobre a atuação dos microrganismos claramente observado na absorção de nutrientes para as plantas. Observaram-se maiores acúmulos de nutrientes nas plantas submetidas ao manejo CCA, demonstrando que independente da biotecnologia há aumento da absorção do nutriente do substrato em relação ao controle.

Tabela 5: Valores de F, níveis de significância, coeficientes de variação e médias do acúmulo de N, P, K Ca e Mg na parte aérea de *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100.

| Fonte Variação | N | P | K | Ca | Mg |
|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Bloco | 0,94 ^{ns} | 2,37 ^{ns} | 0,21 ^{ns} | 1,91 ^{ns} | 0,15 ^{ns} |
| Man. (M) | 516,22 ^{**} | 117,42 ^{**} | 444,83 ^{**} | 498,52 ^{**} | 248,69 ^{**} |
| Biot. (B) | 9,65 ^{**} | 6,37 ^{**} | 7,05 ^{**} | 8,53 ^{**} | 7,90 ^{**} |
| M*B | 7,58 ^{**} | 5,42 ^{**} | 6,17 ^{**} | 5,90 ^{**} | 6,66 ^{**} |
| Média geral | 80,47 | 2,34 | 63,67 | 42,53 | 16,20 |
| CV(%) | 8,61 | 35,26 | 10,21 | 15,70 | 9,82 |

Man.: Manejo; Biot.: Biotecnologia. Significativo pelo teste F: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: não significativo.

Os resultados do acúmulo de nutrientes no manejo SCA não demonstraram diferença significativa entre as médias dos tratamentos, no entanto, a utilização de biotecnologias favoreceu o incremento de acúmulo. Em média as biotecnologias elevaram os acúmulos de N (19%), P (30%), K (29%), Ca (21%) e Mg (18%) comparados ao controle.

No manejo CCA, de maneira geral, o acúmulo de nutrientes na parte aérea foi influenciado positivamente pelas biotecnologias. O tratamento inoculado com *R. clarum* revelou maiores incrementos de N (120,37 mg vaso⁻¹), K (98,15 mg vaso⁻¹) e Mg de (23,34 mg vaso⁻¹), correspondendo a ganhos de 35, 29 e 34% respectivamente, comparado à testemunha (sem inoculação), não diferindo estatisticamente das plantas coinoculadas, que demonstraram incrementos ligeiramente inferiores para estes nutrientes.

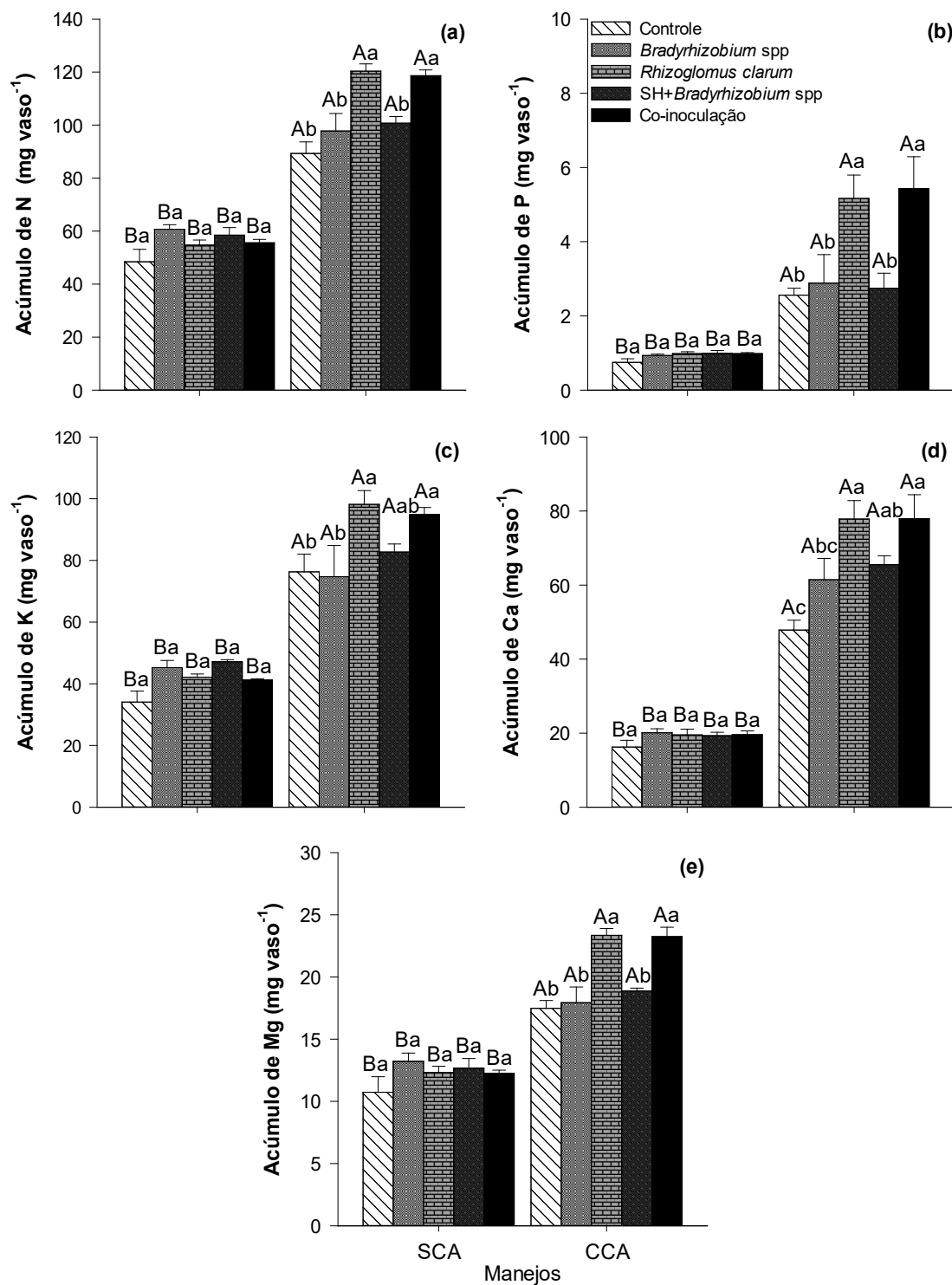


Figura 2: Acúmulo de nitrogênio (a), acúmulo de fósforo (b), acúmulo de potássio (c), acúmulo de cálcio (d) e acúmulo de magnésio (e) em parte aérea de *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 aos 60 dias, cultivados sobre dois manejos com diferentes biotecnologias. SCA: sem calagem e adubação; CCA: com calagem e adubação. Médias \pm erro padrão seguidas da mesma letra maiúscula entre manejos e minúscula entre biotecnologias, não diferem entre si, pelo teste Tukey para $p \leq 0,05$.

Os maiores acúmulos de P (5,43 mg vaso⁻¹) e Ca (77,93 mg vaso⁻¹) foram observados nas plantas coinoculadas. Por outro lado, a inoculação das plantas com *Bradyrhizobium* spp. e SH + *Brad.* spp. revelou médias nos acúmulos de nutrientes estatisticamente semelhantes quando comparado à testemunha, apesar de serem observados incrementos de até 12,8% N; 12,6% P, 8,5% K, 28,5% Ca e 8,0% Mg em relação ao controle. Estes resultados indicam que a inoculação isolada de *R. clarum* e simbiose tripartida – planta x bactéria diazotrófica x micorriza, contribuiu significativamente na absorção e transporte de nutrientes, favorecendo a maior concentração na biomassa da parte aérea.

Na simbiose entre raízes e micorrizas, a absorção de nutrientes ocorre tanto por via micorrízica, em que estão presentes transportadores de NH₄⁺, NO₃⁻ e H₂PO₄⁻, além da H⁺-ATPases que favorece o transporte de nutrientes, quanto pela ação do sistema radicular, atuando na captação de nutrientes da rizosfera por meio de transportadores localizados na epiderme e nos pelos radiculares (VERGARA et al., 2019). Ao associar a ação das bactérias diazotróficas, a melhora no aporte de N é potencializada pelo efeito sinérgico entre os microrganismos, uma vez que o processo de FBN, o qual demanda maior P, é suprido parcialmente pela presença do FMA, que aumenta a captação de nutrientes de baixa mobilidade, como o P (JOU; BESALATPOUR, 2017), influenciando no número de nódulos e na FBN (KOUAS et al., 2005).

Estudos mostram que a inoculação simultânea com bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos podem aumentar o crescimento de leguminosas e a absorção de nutrientes. Melhorias nos atributos fitotécnicos e nutricionais decorrentes de simbiose tripartida têm sido observadas em plantas de *Glycine max* L., em que colonização radicular por micorriza teve um efeito positivo na nodulação e no maior aporte de N e P na parte aérea da cultura (ANTUNES et al., 2006; JOU; BESALATPOUR, 2017).

Em condições de estresse salino, plantas de *Medicago sativa* L. duplamente inoculadas com *Glomus mosseae* e *Sinorhizobium meliloti* apresentaram ganhos consideráveis na produção de biomassa, número de nódulo e acúmulo de nutrientes decorrente do maior aporte de nutrientes nos tecidos das plantas face ao estímulo da H⁺-ATPases e do aumento na absorção de nutrientes pelas hifas de micorrizas extra radicais além das zonas capilares e de depleção de nutrientes (ASHRAFI; ZAHEDI; RAZMJOO, 2014).

3.3 – Atributos microbiológicos

Na Tabela 6, são apresentados os valores de F, níveis de significância, média e coeficiente de variação dos atributos microbiológicos: quantidade de diacetato de fluoresceína (FDA) hidrolisado ($\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$) e porcentagem de colonização micorrízica (CM) em raízes de amendoim forrageiro. Nota-se que não houve interação entre os parâmetros avaliados ($p > 0,05$). Efeito simples do manejo e biotecnologia ($p \leq 0,01$) foram observados no FDA e CM.

Tabela 6: Valores de F, níveis de significância, coeficientes de variação e médias das variáveis: hidrólise da atividade do diacetato de fluoresceína (FDA) do solo e taxa de colonização micorrízica (CM) nas raízes de *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100.

| Fonte Variação | FDA | CM |
|--------------------|---------------------|----------------------|
| Bloco | 0,26 ^{ns} | 2,73 ^{ns} |
| Man. (M) | 14,02 ^{**} | 9,78 ^{**} |
| Biot. (B) | 4,75 ^{**} | 221,42 ^{**} |
| M*B | 2,30 ^{ns} | 1,71 ^{ns} |
| Média geral | 4,93 | 38,66 |
| CV(%) | 3,77 | 15,10 |

Man.: Manejo; Biot.: Biotecnologia. Significativo pelo teste F: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: não significativo.

A hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) avalia a atividade enzimática de populações microbianas e pode fornecer uma avaliação de atividade microbiana total no solo, porque inclui várias classes de enzimas (lipases, esterases e proteases) (PATLE; NAVNAGE; BARANGE, 2018). No entanto, as enzimas presentes nesta reação podem persistir no solo associadas aos coloides ou a complexos inorgânicos (TAYLOR et al., 2002).

A atividade microbiológica foi mais intensa no manejo SCA, sendo 12,18% superior ao observado no CCA ($4,64 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$). Esses resultados são inferiores aos obtidos de Freitas et al. (2011), que registraram hidrólise da FDA de $6,56 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ em sistema convencional cultivando com uva em Neossolo Quartzarênico. Os autores concluíram que a menor atividade microbiana pode ser devido aos níveis mais baixos de matéria orgânica do solo. Geralmente taxa mais baixa de atividade enzimática está associada à diminuição do conteúdo de matéria orgânica (TAYLOR et al., 2002; BŁOŃSKA; LASOTA; ZWYDAK, 2017).

O estresse nutricional decorrente da baixa disponibilidade de nutrientes influencia qualitativamente e quantitativamente nos exsudatos radiculares liberados pelas plantas (LIU et al., 2004). Embora, não haja evidências na literatura que vinculem o FDA a qualidade ou quantidade da hidrólise e exsudato radicular. Entretanto, a atividade enzimática dos exsudatos radiculares pode influenciar na produção de outras enzimas (STARK et al., 2006). Em condições estressantes, a atividade microbiológica pode aumentar sem um aumento na biomassa microbiana, o que reflete em aumento no quociente metabólico (YADA et al., 2015).

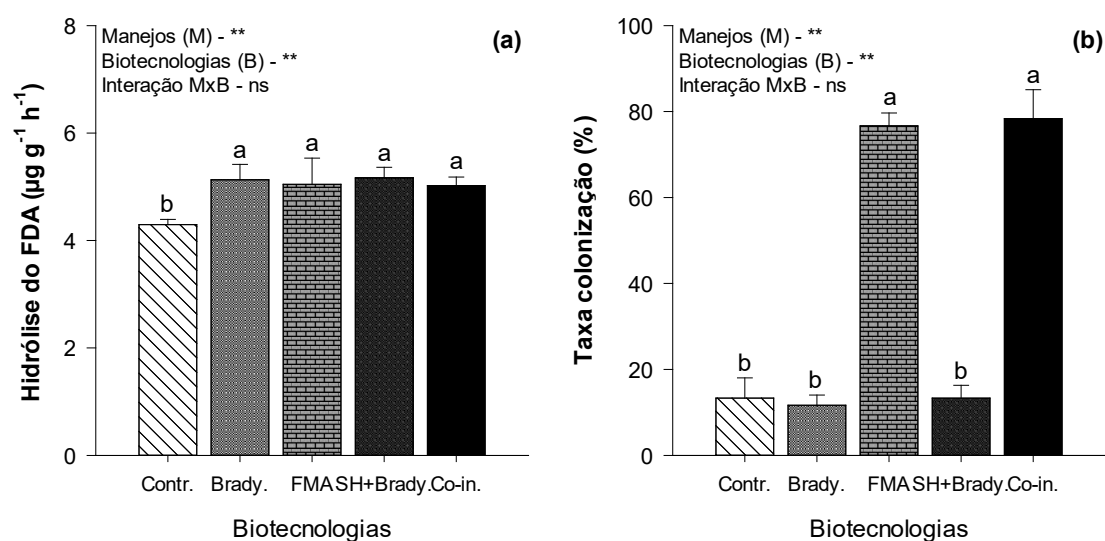


Figura 3: Quantidade de diacetato de fluoresceína (FDA) hidrolisado $\mu\text{g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ (a); taxa de colonização micorrízica em % (b). Contr. (controle); Brady. (*Bradyrhizobium* spp); FMA (*Rhizoglossum clarum*); SH+Brady. (Substâncias húmicas - $40 \text{ mg L}^{-1} \text{ C}$ e *Bradyrhizobium* spp); Co-in. (coinoculação). Médias \pm erro padrão seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Tukey para $p \leq 0,05$. Significativo ** $p \leq 0,01$; ns: não significativo.

O baixo pH do solo e menor teor de P podem ter contribuído para maior atividade micorrízica nativa e inoculado. Nahas (2002) relatou aumentos das populações de fungos em tratamentos não fertilizados e sem calagem, ao contrário das bactérias que diminuiram nestas condições. As micorrizas associadas às raízes excretam enzimas extracelulares e isso contribui para o aumento da atividade enzimática (BŁOŃSKA; LASOTA; ZWYDAK, 2017). Por outro lado, Rakshit et al. (2016) confirmam que a aplicação excessiva de fertilizantes causou depressão significativa na atividade microbiológica do solo.

A aplicação de biotecnologias elevou significativamente a atividade microbiana no solo, em média 18,31% comparado ao controle ($4,29 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$). O aumento em resposta às biotecnologias, sugere primeiramente que decorre da introdução de microrganismos no processo de inoculação. Por outro lado, o estímulo à comunidade microbiana do solo pode ser regulado pelos exsudatos radiculares das plantas inoculadas (LIU et al., 2020).

Não houve interação significativa entre os fatores ($p > 0,05$) para taxa de colonização micorrízica (CM) em raízes de *A. pintoi*. Analisando o efeito simples do manejo, observou-se efeito significativo ($p \leq 0,01$) para a variável CM. As plantas cultivadas no manejo SCA apresentaram taxa de colonização micorrízica 19% superior àquelas cultivadas em solo com calagem e adubação. Para esta mesma variável, quanto ao efeito simples das biotecnologias, observou-se efeito significativo ($p \leq 0,01$), para os tratamentos com coinoculação e *R. clarum*, que proporcionaram maior porcentagem de colonização micorrízica, com valores médios de 78,33 e 76,66% respectivamente, sendo superiores aos demais tratamentos (Figura 3b).

O manejo SCA foi mais eficiente na multiplicação das micorrizas favorecendo, conseqüentemente, a colonização do amendoim. Os resultados sugerem que em condições de solos ligeiramente ácidos e deficientes em P, houve o favorecimento para colonização micorrízica, além da elevada capacidade de competição com a microbiota nativa, culminando em melhorias na nutrição e produção da cultura. Para Azevedo (2010), o favorecimento da colonização por micorrizas decorre do resultado da interação dos fatores compatibilidade entre espécie vegetal e fungo utilizado, condições ambientais vigentes, tipo de solo, pH e disponibilidade de nutrientes, especialmente P.

Miranda et al. (2016), estudando amendoim forrageiro inoculado com diferentes espécies de FMA e doses crescentes de fósforo em solo esterilizado, concluíram que nas menores doses de P a espécie *R. clarum* proporciona maior resposta, em virtude da intensa colonização micorrízica nesta condição, resultando em maior taxa de crescimento. Trabalhando com amendoim forrageiro em pastagem consorciada Miranda et al. (2010) observaram uma taxa de colonização radicular de 63% nas estações chuvosas.

As biotecnologias influenciaram na porcentagem de colonização micorrízica, em que as maiores taxas de colonização ocorreram nos tratamentos com coinoculação e FMA, decorrente da utilização de inóculos de *R. clarum* no plantio. Nos demais tratamentos observou-se colonização radicular em menor porcentagem, decorrente da

presença de fungos micorrízicos nativos, uma vez que o solo utilizado neste estudo não passou por processo de esterilização.

Em plantas coinoculadas Artursson et al. (2006), verificaram aumento na taxa de colonização, evidenciando o efeito sinérgico entre os simbiontes. Os autores sugerem que tal efeito está relacionado ao incremento de P suprido parcialmente pela FMA a planta-bactéria diazotróficas, o qual acarretou em melhorias na FBN e conseqüentemente, aumento na produção de compostos fotossintetizados pelas plantas, favorecendo a maior multiplicação e colonização micorrízica.

3.4 – Atributos fisiológicos

Após análise de variância verificou-se que houve interação ($p \leq 0,05$) para os parâmetros concentração interna de CO_2 (C_i), eficiência instantânea de carboxilação (EiC) e índice de clorofila falker – clorofila total (Chl). Houve efeito simples dos fatores sobre a taxa de assimilação de CO_2 (A), condutância estomática (g_s) e transpiração (E). Não foi observado efeito significativo ($p > 0,05$) dos fatores sobre a eficiência no uso de água (EUA).

Tabela 7: Valores de F, níveis de significância, coeficientes de variação e médias das variáveis fisiológicas avaliadas: taxa de assimilação de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), concentração interna de CO_2 (C_i), transpiração (E), eficiência no uso de água (EUA), eficiência instantânea de carboxilação (EiC), rendimento quântico máximo (F_v/F_m) e teor de clorofila total – índice de clorofila falker (Chl).

| Fonte | A | g_s | C_i | E | EUA | EiC | F_v/F_m | Chl |
|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|----------|
| Variação | | | | | | | | |
| Bloco | 2,33 ^{ns} | 1,42 ^{ns} | 0,65 ^{ns} | 1,26 ^{ns} | 0,53 ^{ns} | 0,28 ^{ns} | 3,30* | 3,99* |
| Man. (M) | 47,99** | 6,57* | 71,48** | 12,15** | 0,40 ^{ns} | 82,24** | 5,69* | 221,50** |
| Biot. (B) | 10,87** | 8,42** | 7,30** | 2,83* | 0,61 ^{ns} | 13,60 ^{ns} | 3,84* | 7,73** |
| M*B | 0,70 ^{ns} | 0,57 ^{ns} | 2,73* | 0,47 ^{ns} | 0,24 ^{ns} | 3,77* | 2,62 ^{ns} | 3,29* |
| Média | 4,68 | 0,054 | 247,16 | 1,89 | 2,60 | 0,020 | 0,82 | 27,99 |
| CV(%) | 17,38 | 22,69 | 11,19 | 32,50 | 31,50 | 25,06 | 1,24 | 4,65 |

Man.: Manejo; Biot.: Biotecnologia. Significativo pelo teste F: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: não significativo.

Analisando o efeito simples do manejo nos parâmetros A , g_s e E , notou-se valores de $5,57 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$; $0,059 \text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e $2,23 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente, nas plantas conduzidas no manejo CCA, representando incrementos de 47% (A), 20% (g_s) e 44% (E) comparado ao manejo em que não houve calagem e adubação. A utilização de

biotecnologia interferiu positivamente na A , g_s e E em relação à testemunha (Figura 4a, b e c).

De modo geral, dentre as biotecnologias avaliadas a coinoculação e SH+ *Brad.* spp. demonstraram resultados das trocas gasosas que indicam melhores desempenhos do aparelho fotossintético das plantas de amendoim forrageiro, possibilitando ganhos de crescimento mais rápido da forrageira. Todavia, deve-se salientar que independente do manejo e da biotecnologia os valores observados da taxa de assimilação de CO_2 e condutância estomática encontram-se abaixo do relatado para planta de metabolismo C_3 , que variam normalmente entre 10 a 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (A) e 0,21 a 0,40 $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (g_s) (TAIZ; ZEIGER, 2013).

No presente trabalho os valores de A , g_s e E , são parcialmente similares aos encontrados por Baligar et al. (2010) investigando o comportamento fisiológico de *A. pintoi* cultivado como plantas de cobertura em sub-bosque de *Theobroma cacao*. Os autores relataram valores médios dos parâmetros fotossintéticos A (10 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), g_s (0,08 $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e E (2,1 $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Os valores de A e g_s foram inferiores ao observado por Baligar et al. (2010), uma vez que os autores utilizaram adubação completa N-P-K para estabelecimento da cultura, diferentemente deste estudo, em que o fornecimento de N derivou do potencial das biotecnologias em disponibilizar o elemento e somente fósforo e potássio foram fornecidos, embora com redução de 60% na dose.

Nas plantas há uma íntima relação entre status do N e taxas de pigmentos fotossintéticos, logo incrementos de nitrogênio favorecem o aumento no teor de clorofila (DEBAEKE; ROUET; JUSTES, 2006; SORATTO; CARVALHO; ARF, 2004). A elevação no teor de clorofila das plantas pode colaborar para melhoria da taxa fotossintética, uma vez que há maior captação de luz e, conseqüentemente, ganhos na etapa bioquímica (ROCHA, 2018).

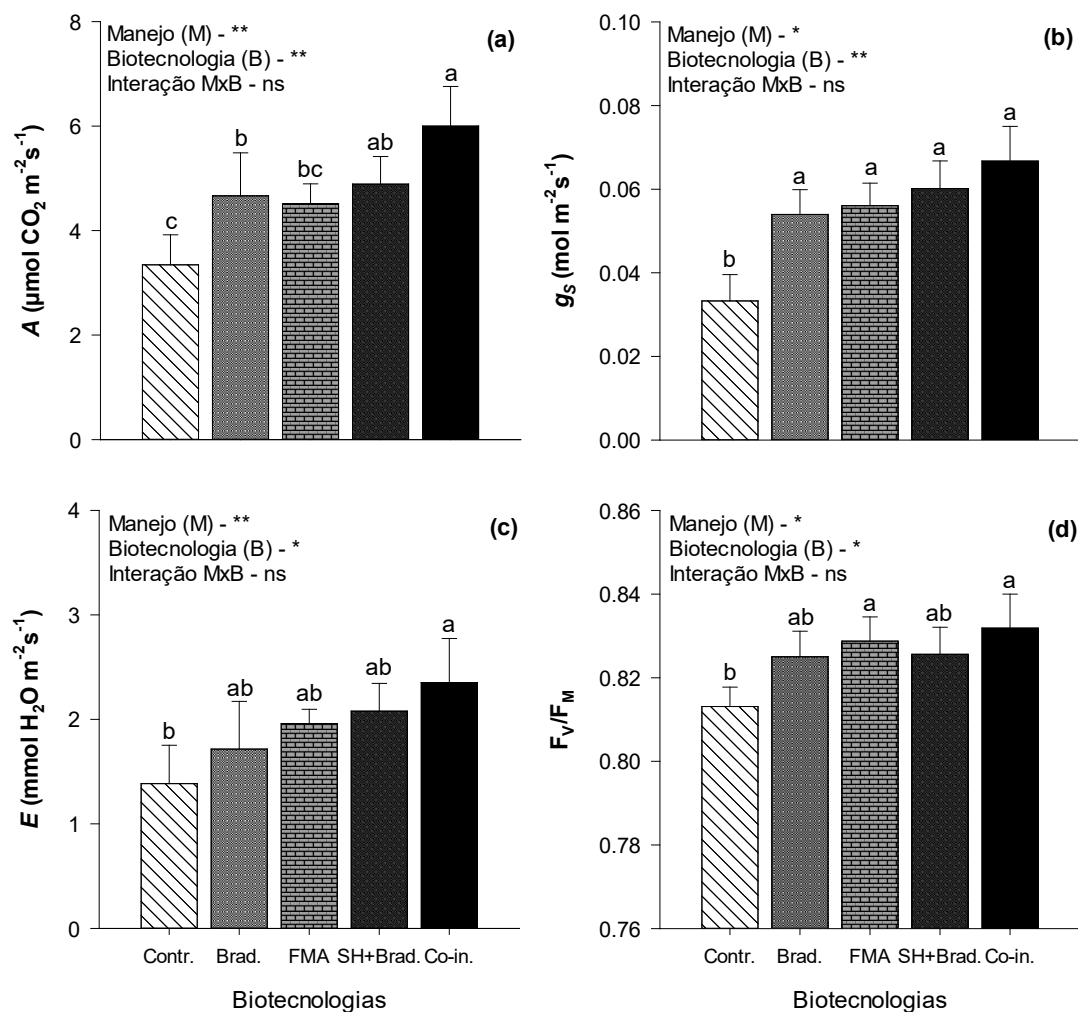


Figura 4: Taxa de assimilação de CO_2 (a), condutância estomática (b), transpiração (c) e rendimento quântico do fotossistema II (d) em *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 aos 60 dias, cultivados sobre dois manejos com diferentes biotecnologias. Contr.: controle; Brad.: *Bradyrhizobium* spp.; FMA: *Rhizogloium clarum*; SH+Brad.: SH + *Bradyrhizobium* spp.; Co-in.: coinoculação. SCA: sem calagem e adubação; CCA: com calagem e adubação. Médias \pm erro padrão seguidas da mesma letra minúscula, não diferem entre si, pelo teste Tukey para $p \leq 0,05$. Significativo * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; ns: não significativo.

Sabe-se que os estômatos regulam as trocas gasosas foliares, afetando o comportamento da A e E em condições de deficiência nutricional. A ausência de adubação equilibrada de N e K pode comprometer a osmorregulação estomática, levando a interferir na dinâmica da g_s , conseqüentemente, pode ocorrer reduções na taxa de assimilação de CO_2 e transpiração (MELO et al., 2008).

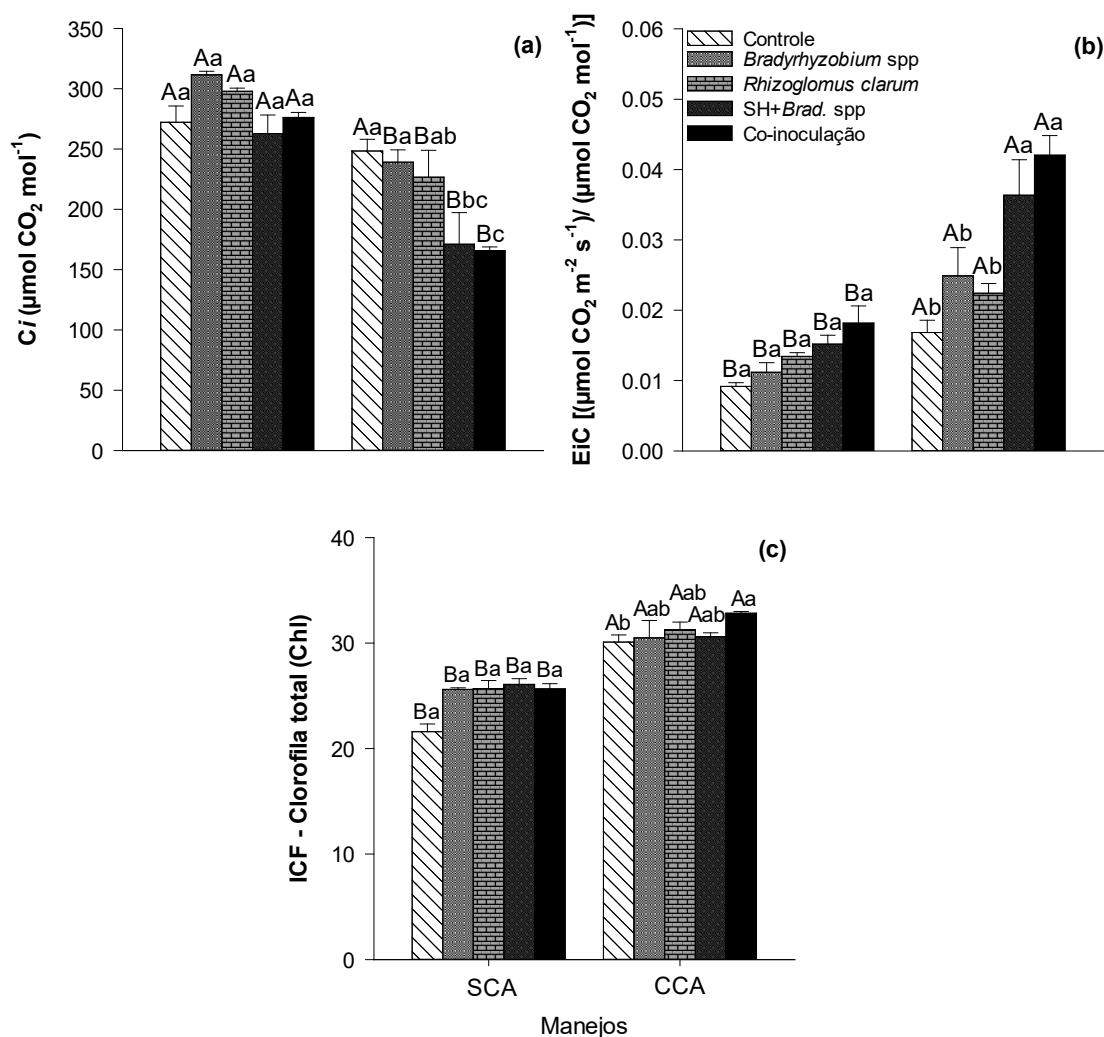


Figura 5: Concentração interna de CO₂ (a), eficiência instantânea de carboxilação (b) e clorofila total (d) em *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 aos 60 dias, cultivados sobre dois manejos com diferentes biotecnologias. SCA: sem calagem e adubação; CCA: com calagem e adubação. Médias ± erro padrão seguidas da mesma letra maiúscula entre manejos e minúscula entre biotecnologias, não diferem entre si, pelo teste Tukey para $p \leq 0,05$.

Na interação manejo x biotecnologia para variável C_i observou-se entre os manejos maiores concentrações internas de CO₂ nas plantas que foram conduzidas sem calagem e adubação, em média 35% superior ao manejo CCA (Figura 5a). Analisando o efeito das biotecnologias dentro do manejo SCA, não foram observadas diferenças significativas entre as médias no manejo SCA, embora curiosamente o tratamento inoculado com SH + *Brad.* spp. apresentou valor de C_i inferior ao controle (sem inoculação). De modo contrário, o comportamento das plantas no manejo CCA inoculadas com diferentes biotecnologias demonstrou redução média na C_i de 19%

comparada à testemunha ($248,42 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), destacando os tratamentos com coinoculação ($165,76 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e SH + *Brad. spp.* ($171,07 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), significando uma maior retomada das taxas fotossintéticas. Comportamento similar foi observado por Jin et al. (2011) avaliando o efeito de doses de K sobre os parâmetros fotossintéticos de *Carya cathayensis*.

A menor C_i nos tratamentos em que houve calagem e adubação pode ser explicada pela maior taxa fotossintética, aumentando o consumo de C_i , reduzindo sua concentração, levando ao maior estímulo da abertura estomática elevando a g_s (KUWAHARA; SOUZA, 2009). Os mesmos autores relatam que o estímulo para abertura estomática está associado tanto a pressão de turgor da célula guarda quanto a concentração interna de CO_2 , conseqüentemente, menor A leva a redução no consumo de CO_2 intracelular, em virtude da Rubisco não estar totalmente ativada, assim o CO_2 não é carboxilado e incorporado ao Ciclo de Calvin, aumentando a C_i (BULEGON et al., 2017).

A eficiência instantânea de carboxilação (EiC) é calculada com base na relação A/C_i (KONRAD et al., 2005). Na figura 5b, observa-se que no manejo CCA houve maior EiC, correspondendo a 2,0 vezes o valor obtido no manejo SCA. Nota-se que na omissão de calagem e adubação não promoveu diferença significativa entre as biotecnologias, embora sejam observados ganhos de 58,10% na EiC com as biotecnologias comparado ao controle. Os máximos valores de EiC no manejo CCA foram constatados nos tratamentos com coinoculação [$0,0420 (\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}) / (\mu\text{mol mol}^{-1})$] e SH + *Brad. spp.* [$0,0363 (\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}) / (\mu\text{mol mol}^{-1})$]. Para os demais tratamentos não foi observada diferença significativa entre as médias, entretanto, houve aumento médio de 40,35% em relação ao controle.

Nota-se na figura 5c que no manejo CCA houve maior índice de clorofila falker (ICF) 31,05, indicando acréscimos de 24,55% em relação ao valor observado nas plantas que foram cultivadas no solo sem calagem e adubação. As médias observadas dos ICF nas plantas tratadas com biotecnologia no manejo sem calagem e adubação não diferiram entre si, embora, incremento médio de 19,27% no ICF foi observado com utilização de biotecnologias comparado ao controle (21,60).

No manejo CCA, o valor máximo de ICF (32,82) foi verificado nas plantas coinoculadas, sendo o valor mínimo de 30,08 alcançado pelo tratamento controle. Observa-se que os demais tratamentos não diferiram do controle, embora tenha obtido acréscimo de 2,31% em relação às plantas que receberam somente calagem e adubação

(testemunha). Sá et al. (2019) avaliando eficiência simbiótica de estirpes de bactéria diazotróficas relataram valores de índice de SPAD (25,33) em plantas *A. pintoi* inoculadas com *Bradyrhizobium* spp.

No complexo enzimático da nitrogenase há uma alta demanda de ATP (NUNES; RAIMONDI; NIEDWIESKI, 2003). Em condições de baixa disponibilidade de P, a FBN é afetada diretamente, reduzindo o aporte de N para planta e, conseqüentemente, a taxa de pigmentos fotossintetizantes (DEBAEKE; ROUET; JUSTES, 2006). Outro fator associado é a menor concentração de magnésio (Mg) no manejo SCA. As clorofilas são formadas por moléculas complexas, tendo como elemento central o Mg, onde na ausência deste elemento há comprometimento na formação da clorofila (STREIT et al., 2005).

4.0 – CONCLUSÕES

As biotecnologias influenciaram positivamente na produção de MSPA no manejo CCA, destacando as plantas que receberam inóculos de *Rhizoglonus clarum*.

As maiores produções de MSR foram observadas na presença de *Bradyrhizobium* spp. e SH+*Bradyrhizobium* spp.

Os tratamentos com coinoculação e SH+*Brad.* spp. apresentaram maiores taxas de nodulação.

As plantas inoculadas com *R. clarum* e coinoculação apresentaram maiores acúmulos de nutrientes.

Houve aumento na atividade do diacetato de fluoresceína no solo SCA.

As plantas cultivadas na ausência de calagem e adubação apresentaram taxa de colonização micorrízicas 24,5% superior àquelas cultivadas em solo com calagem e adubação.

As biotecnologias melhoram os resultados de trocas gasosas, especialmente nas plantas coinoculadas e que receberam SH+*Bradyrhizobium* spp.

5.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH M. K. A.. Factors affecting the efficiency of symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, [s.l.], v. 5, n. 11, p.1277-1293, 1 nov. 2002. Science Alert. <http://dx.doi.org/10.3923/pjbs.2002.1277.1293>.

ANTUNES, P. M.; DE VARENNES, A.; RAJCAN, I.; GOSS, M. J.. Accumulation of specific flavonoids in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) as a function of the early tripartite symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan. **Soil Biology and Biochemistry**, [s.l.], v. 38, n. 6, p.1234-1242, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.09.016>.

ARTURSSON, V.; FINLAY, R. D.; JANSSON, J. K.. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-10, jan. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00942.x>.

ASHRAFI, E.; ZAHEDI, M.; RAZMJOO, J.. Co-inoculations of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia under salinity in alfalfa. **Soil Science and Plant Nutrition**, [s.l.], v. 60, n. 5, p.619-629, 5 ago. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00380768.2014.936037>.

AZEVEDO, J. M. A. **Variabilidade genética entre acessos de amendoim forrageiro quanto à associação micorrízica e resposta ao fósforo**. 2010. 156 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2010.

BALIGAR, V. C.; BUNCE, J. A.; ELSON, M. K., FAGERIA, N. K.. Irradiance, external carbon dioxide concentration and temperature influence photosynthesis in tropical cover crop legumes. **Tropical Grasslands**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.24-32, mar. 2010.

BALLESTEROS-ALMANZA. Effect of co-inoculation with mycorrhiza and rhizobia on the nodule trehalose content of different bean genotypes. **The Open Microbiology Journal**, [s.l.], p.83-92, 2010. Bentham Science Publishers Ltda. <http://dx.doi.org/10.2174/1874285801004010083>.

BŁOŃSKA, E.; LASOTA, J.; ZWYDAK, M.. The relationship between soil properties, enzyme activity and land use. **Forest Research Papers**, [s.l.], v. 78, n. 1, p.39-44, 1 mar. 2017. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/frp-2017-0004>.

BREUILLIN-SESSOMS, F.; FLOSS, D. S.; GOMEZ, S. K.; PUMPLIN, N.; DING, Y.; LEVESQUE-TREMBLAY, V.; NOAR, R. D.; DANIELS, D. A.; BRAVO, A.; EAGLESHAM, J. B.; BENEDITO, V. A.; UDVARDI, M. K.; HARRISON, M. J.. Suppression of arbuscule degeneration in *Medicago truncatula* phosphate transporter4 mutants is dependent on the ammonium transporter 2 family protein AMT2;3. **The Plant Cell**, [s.l.], v. 27, n. 4, p.1352-1366, abr. 2015. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.114.131144>.

BULEGON, L. G.; BATTISTUS, A. G.; GUIMARÃES, V. F.; INAGAKI, A. M.; OFFEMANN, L. C.; SOUZA, A. K. P.; OLIVEIRA, P. S. R.. Physiological responses of *Urochloa ruziziensis* inoculated with *Azospirillum brasilense* to severe drought and rehydration conditions. **Australian Journal of Crop Science**, [s.l.], v. 11, n. 10, p.1283-1289, 20 out. 2017. Southern Cross Publishing. <http://dx.doi.org/10.21475/ajcs.17.11.10.pne577>.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.1-11, 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/2196-5641-1-3>.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L.; FAÇANHA, A. R.. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 130, n. 4, p.1951-1957, 14 nov. 2002. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.007088>.

CARVALHO, J. E. B.; SOUZA, L. S.; AZEVEDO, C. L. L.; OLIVEIRA, A. A. R. Adubação verde em fruteiras tropicais. In: LIMA FILHO, O. F. de; AMBROSANO, E. J.; ROSSI, F.; CARLOS, J. A. D. (Orgs.). **Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil: fundamentos e prática**. Brasília, DF: Embrapa, 2014. v. 2, p.159-200.

CARVALHO, L. R., PEREIRA, L. E. T., HUNGRIA, M., CAMARGO, P. B., SILVA, S. C.. Nodulation and biological nitrogen fixation (BNF) in forage peanut (*Arachis pintoi*) cv. Belmonte subjected to grazing regimes. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [s.l.], v. 278, p.96-106, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2019.02.016>.

CUNHA, A. M.; FEITOZA, H. N.; FEITOZA, L. R.; OLIVEIRA, F. S.; LANI, J. L.; CARDOSO, J. K. F.; TRINDADE, F. S.. Update to the legend of the reconnaissance soil map of Espírito Santo state and the implementation of Geobases interface for data usage in GIS. **Revista Geografares**, [s.l.], v. 23, p.32-65, 22 dez. 2016. Geografares. <http://dx.doi.org/10.7147/geo23.12356>.

DEBAEKE, P.; ROUET, P.; JUSTES, E.. Relationship Between the Normalized SPAD Index and the Nitrogen Nutrition Index: Application to Durum Wheat. **Journal of Plant Nutrition**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.75-92, jan. 2006. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01904160500416471>.

DIAS-FILHO, M.B. **Degradação das pastagens: o que é e como evitar**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2017. 24p. (Embrapa Amazônia Oriental).

DU JARDIN, P.. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 196, p.3-14, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>.

DUBEUX, J. C. B.; SOLLENBERGER, L. E.. Nutrient cycling in grazed pastures. **Management Strategies for Sustainable Cattle Production in Southern**

Pastures, [s.l.], p.59-75, 2020. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-814474-9.00004-9>.

FELLBAUM, C. R.; MENSAH, J. A.; CLOOS, A. J.; STRAHAN, G. E.; PFEFFER, P. E.; KIERS, E. T.; BÜCKING, H.. Fungal nutrient allocation in common mycorrhizal networks is regulated by the carbon source strength of individual host plants. **New Phytologist**, [s.l.], v. 203, n. 2, p.646-656, 2 maio 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.12827>.

FREITAS, N. O.; YANO-MELO, A. M.; SILVA, F. S. B.; MELO, N. F.; MAIA, L. C.. Soil biochemistry and microbial activity in vineyards under conventional and organic management at Northeast Brazil. **Scientia Agricola**, [s.l.], v. 68, n. 2, p.223-229, abr. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-90162011000200013>.

GRACE, C.; STRIBLEY, D. P.. A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycological Research**, [s.l.], v. 95, n. 10, p.1160-1162, out. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0953-7562\(09\)80005-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0953-7562(09)80005-1).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, [s.l.], v. 331, n. 1-2, p.413-425, 13 jan. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>.

JESUS, E. C.; SCHIAVO, J. A.; FARIA, S. M.. Dependência de micorrizas para a nodulação de leguminosas arbóreas tropicais. **Revista Árvore**, [s.l.], v. 29, n. 4, p.545-552, ago. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-67622005000400006>.

JIN, S. H.; HUANG, J. Q.; LI, X. Q.; ZHENG, B. S.; WU, J. S.; WANG, Z. J.; LIU, G. H.; CHEN, M.. Effects of potassium supply on limitations of photosynthesis by mesophyll diffusion conductance in *Carya cathayensis*. **Tree Physiology**, [s.l.], v. 31, n. 10, p.1142-1151, 1 out. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/treephys/tpr095>.

JOHNSON, C. M.; ULRICH, A.. **Analytical methods for use in plants analyses**. Los Angeles, University of California, p.32-33. (Bulletin, 766), 1959.

JOU, M. H. H.; BESALATPOUR, A. A.. Interactive effects of co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* strains and mycorrhiza species on soybean growth and nutrient contents in plant. **Journal of Plant Nutrition**, [s.l.], v. 41, n. 1, p.10-18, 13 nov. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01904167.2017.1346666>.

KONRAD, M. L. F.; SILVA, J. A. B; FURLANI, P. R.; MACHADO, E. C.. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia**, [s.l.], v. 64, n. 3, p.339-347, 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0006-87052005000300004>.

KOUAS, S.; LABIDI, N.; DEBEZ, A.; ABDELLY, C.. Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. **Agronomy for Sustainable Development**, [s.l.], v. 25, n. 3,

p.389-393, jul. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1051/agro:2005034>.

KRETER, A. C.; JÚNIOR, J. R. C. S.. Economia agrícola. Carta de conjuntura nº 45 - 4º trimestre de 2019. Rio de Janeiro: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA). <http://www.ipea.gov.br/cartadeconjuntura/index.php/category/agropecuaria/>. Acesso em: jan. 2020.

KUWAHARA, F. A.; SOUZA, G. M.. Fósforo como possível mitigador dos efeitos da deficiência hídrica sobre o crescimento e as trocas gasosas de *Brachiaria brizantha* cv. MG-5 Vitória. **Acta Scientiarum. Agronomy**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.261-267, 19 maio 2009. Universidade Estadual de Maringá. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v31i2.836>.

LIU, N., SHAO, C., SUN, H., LIU, Z., GUAN, Y., WU, L., ZHANGA, L., PANA, X., ZHANGA, Z., ZHANGA, Y., ZHANGB, B., 2020. Arbuscular mycorrhizal fungi biofertilizer improves American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) growth under the continuous cropping regime. **Geoderma**, [s.l.], v. 363, p.1-10, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.114155>.

LIU, Y.; MI, G.; CHEN, F.; ZHANG, J.; ZHANG, F.. Rhizosphere effect and root growth of two maize (*Zea mays* L.) genotypes with contrasting P efficiency at low P availability. **Plant Science**, [s.l.], v. 167, n. 2, p.217-223, ago. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.02.026>.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, A.S. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações (2. ed.). Piracicaba, **Potafos**. 319p, 1997.

MELO, A. S.; JÚNIOR, C. D. S.; FERNANDES, P. D.; SOBRAL, L. F.; BRITO, M. E. B.; DANTAS, J. D. M.. Alterações das características fisiológicas da bananeira sob condições de fertirrigação. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 39, n. 3, p.733-741, 12 dez. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782008005000101>.

MENDONÇA, E. S., MATOS, E. S.. Matéria orgânica do solo: métodos de análises. Viçosa: UFV; 2005. 107 p.

MENG, L.; ZHANG, A.; WANG, F.; HAN, X.; WANG, D.; LI, S.. Arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobium facilitate nitrogen uptake and transfer in soybean/maize intercropping system. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 6, p.1-10, 13 maio 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00339>.

MIGUEL, D. L.; MOREIRA, F. M. S.. Influência do pH do meio de cultivo e da turfa no comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s.l.], v. 25, n. 4, p.873-883, dez. 2001. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-06832001000400010>.

MIRANDA, C. H. B.; VIEIRA, A.; CADISCH, G.. Determinação da fixação biológica de nitrogênio no amendoim forrageiro (*Arachis* spp.) por intermédio da abundância

natural de 15N. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s.l.], v. 32, n. 62, p.1859-1865, dez. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-35982003000800008>.

MIRANDA, E. M.; JÚNIOR, O. J. S.; SILVA, E. M. R.. **Amendoim forrageiro: importância, usos e manejos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 85p. (Embrapa Agrobiologia, Documento 259).

MIRANDA, E. M.; SILVA, E. M. R.; JÚNIOR, O. J. S. Comunidades de fungos micorrízicos arbusculares associados ao amendoim forrageiro em pastagens consorciadas no Estado do Acre, Brasil. **Acta Amazonica**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.13-22, mar. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0044-59672010000100002>.

MIRANDA, E. M.; SILVA, E. M. R.; JÚNIOR, O. J.S.. Mycorrhizal inoculation and phosphate fertilizer in the production of seedlings of the forage peanut. **Revista Ciência Agronômica**, [s.l.], v. 47, n. 2, p.240-246, 2016. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20160028>.

MIRANDA, E. M.; JÚNIOR, O. J.S.; SILVA, E. M. R.. Seleção de fungos micorrízicos arbusculares para o amendoim forrageiro consorciado com braquiária. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 43, n. 9, p.1185-1191, set. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2008000900013>.

MUNIZ, A. W.; CÔRREA, R. B.; SILVA, T. A. C.; PERIN, R.; TONATO, F.; ASSIS, G. M. L. **Inoculação de rizóbios em amendoim forrageiro cv. Amarelo em Manaus, AM**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2016. 4 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Circular Técnica, 56).

NAHAS, E.. Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. **Bragantia**, [s.l.], v. 61, n. 3, p.267-275, dez. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0006-87052002000300008>.

NOVAIS, R. F.; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. F.. Ensaio em ambiente controlado. In: OLIVEIRA, A. J.; GARRIDO, W. E.; ARAUJO, J. D.; LOURENÇO, S.. **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. Brasília: EMBRAPA-SEA, 1991. p.189-253. (EMBRAPA-SEA. Documento, 3).

NUNES, F. S.; RAIMONDI, A. C.; NIEDWIESKI, A. C.. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**, [s.l.], v. 26, n. 6, p.872-879, dez. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422003000600016>.

PATLE, P. N.; NAVNAGE, N. P.; BARANGE, P. K.. Fluorescein Diacetate (FDA): Measure of total microbial activity and as indicator of soil quality. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, [s.l.], v. 7, n. 06, p.2103-2107, 10 jun. 2018. Excellent Publishers. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2018.706.249>.

PIERRE, M. J.; BHOPLE, B. S.; KUMAR, A.; ERNESTE, H.; EMMANUEL, B.; SINGH, Y. N.. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi (AM Fungi) and

Rhizobium inoculation on crop growth and chemical properties of rhizospheric soils in high plants. **Journal of Agriculture and Veterinary Science**, [s.l.], v. 7, n. 9, p.45-55, 2014. IOSR Journals. <http://dx.doi.org/10.9790/2380-07944555>.

PURCINO, H. M. A.; SÁ, N. M. H.; VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. C.. **Novas Estirpes de Rizóbio para a Inoculação do Amendoim Forrageiro (*Arachis pintoi*)**. 20. ed. Planaltina: Embrapa, 2000. 2 p.

RAKSHIT, R.; PATRA, A. K.; PURAKAYASTHA, T. J.; SINGH, R. D.; DHAR, S.; PATHAK, H.; DAS, A.. Effect of super-optimal levels of fertilizers on soil enzymatic activities during growth stages of wheat crop on an Inceptisol. **Journal of Applied and Natural Science**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.1398-1403, 1 set. 2016. ANSF Publications. <http://dx.doi.org/10.31018/jans.v8i3.972>.

RAO, I. M.; KERRIDGE, P. C. Mineral nutrition of forage *Arachis*. In: Kerridge, Peter C.; Hardy, Bill (eds.). *Biology and agronomy of forage Arachis*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. p. 71-83, 1994. (CIAT, n. 240).

RHEINHEIMER, D. S.; SANTOS, J. C. P.; KAMINSKI, J.; MAFRAN, A. L.. Crescimento de leguminosas forrageiras afetado pela adição de fósforo, calagem do solo e micorrizas, em condições de casa de vegetação. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 27, n. 4, p.571-576, dez. 1997. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84781997000400008>.

ROCHA, L. D. **Efeitos dos ácidos húmicos extraídos de lodo de esgoto em plântulas *Zea mays* L. cultivadas sob restrição hídrica e estresse salino**. 2018. 139 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2018.

RODDA, M. R. C.; CANELLAS, L. P.; FAÇANHA, A. R.; ZANDONADI, D. B.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L.; SANTOS, G. A.. 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**, [s.l.], v. 30, n. 4, p.649-656, ago. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-06832006000400005>.

SÁ, O. A. A. L.; ALMEIDA, P. R. R., RUFINI, M., CRUVINEL, I. A. F.; CASAGRANDE, D. R.; MOREIRA, F. M. S.. Microsymbionts of forage peanut under different soil and climate conditions belong to a specific group of *Bradyrhizobium* strains. **Applied Soil Ecology**, [s.l.], v. 143, p.201-212, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.07.018>.

SANTOS, E. C. **Características agronômicas e bromatológicas de amendoim forrageiro em diferentes intervalos de corte**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2012.

SANTOS, L. A.; REIS, V. M.. **A formação do nódulo em leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 36 p. (Embrapa Agrobiologia. Documento, 251).

SATTLER, D.; SELIGER, R.; NEHREN, U.; TORRES, F. N.; SILVA, A. S.; RAEDIG, C.; HISSA, H. R.; HEINRICH, J.. Pasture degradation in south east Brazil: status, drivers and options for sustainable land use under climate change. **Climate Change Management**, [s.l.], p.3-17, 24 out. 2017. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-56946-8_1.

SILVA, A. C.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; DOBBSS, L. B.; AGUIAR, N. O.; FRADE, D. A. R.; REZENDE, C. E.; PERES, L. E. P.. Root growth of tomato seedlings intensified by humic substanciality from peat bogs. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s.l.], v. 35, n. 5, p.1609-1617, out. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-06832011000500015>.

SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S.; SANTOS, J. G. D.; CARNEIRO, M. A. C.. **Micorrizas e degradação do solo: caracterização, efeitos e ação recuperadora**. In: TÓPICOS em Ciência do Solo. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 219-306.

SMITH, S. E.; SMITH, F. A. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. **Annual Review of Plant Biology**, v.62, p.227-250, 2011. <http://dx.doi.org/10.1146/annurevplant-042110-103846>.

SORATTO, R. P.; CARVALHO, M. A. C.; ARF, O.. Teor de clorofila e produtividade do feijoeiro em razão da adubação nitrogenada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 39, n. 9, p.895-901, set. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2004000900009>.

STARK, C.; CONDRON, L. M.; STEWART, A.; DI, H. J.; O'CALLAGHAN, M.. Effects of past and current crop management on soil microbial biomass and activity. **Biology and Fertility of Soils**, [s.l.], v. 43, n. 5, p.531-540, 8 ago. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-006-0132-3>.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H.. As clorofilas. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.748-755, jun. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782005000300043>.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 5.ed. 2013. 918p.

TAYLOR, J. P.; WILSON, B.; MILLS, M. S.; BURNS, R. G. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. **Soil Biology and Biochemistry**, [s.l.], v. 34, n. 3, p.387-401, mar. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0038-0717\(01\)00199-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0038-0717(01)00199-7).

TEIXEIRA, F. A.; BONOMO, P.; PIRES, A. J. V.; SILVA, F. F.; FRIES, D. D.; HORA, D. S.. Produção anual e qualidade de pastagem de *Brachiaria decumbens* diferida e estratégias de adubação nitrogenada. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, [s.l.], v. 33, n. 3, p.241-248, 8 jun. 2011. Universidade Estadual de Maringá. <http://dx.doi.org/10.4025/actascianimsci.v33i3.10194>.

VERESOGLOU, S. D.; MENEXES, G.; RILLIG, M. C.. Do arbuscular mycorrhizal fungi affect the allometric partition of host plant biomass to shoots and roots? A meta-analysis of studies from 1990 to 2010. **Mycorrhiza**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.227-235, 28 jun. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-011-0398-7>.

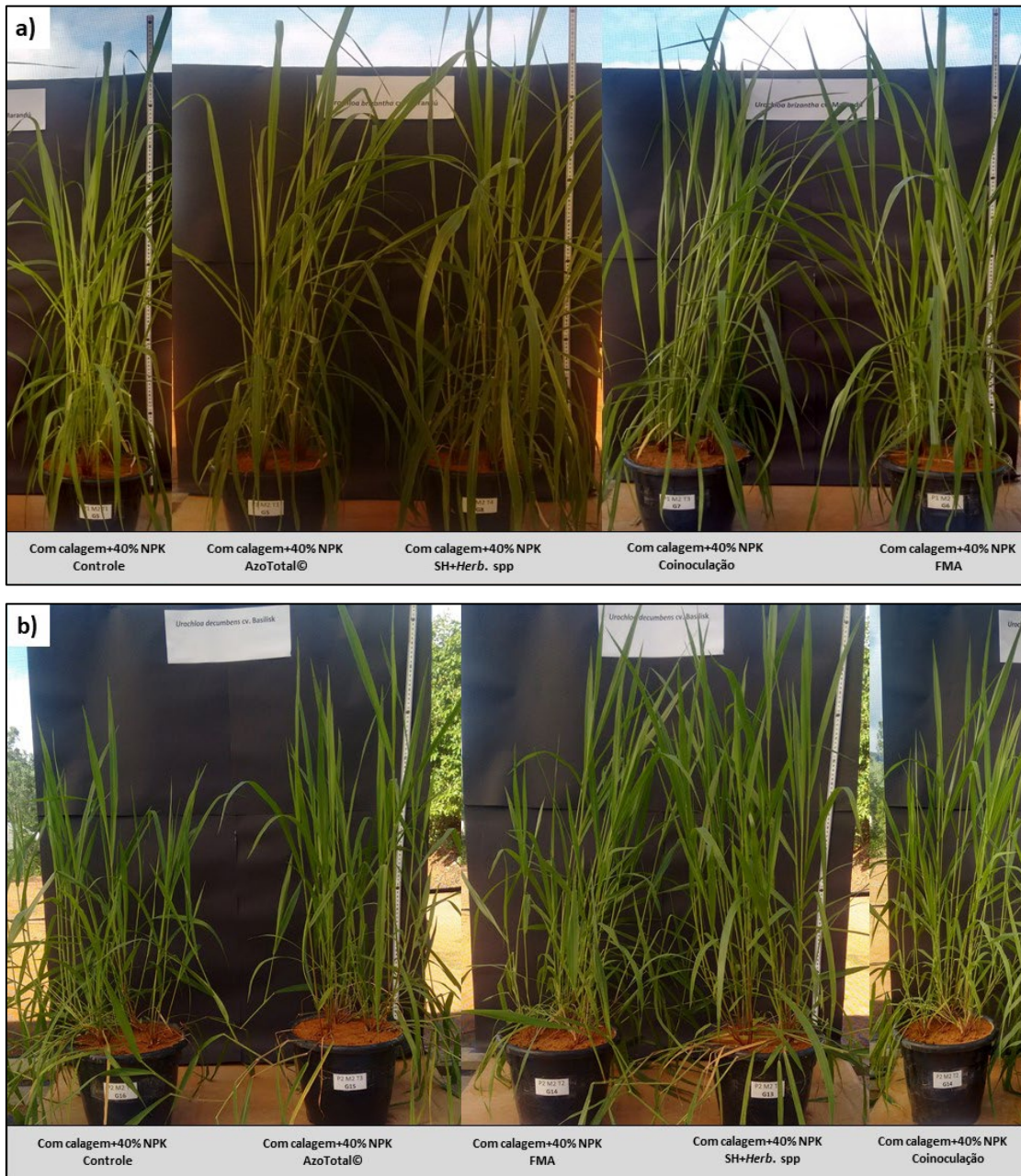
VERGARA, C.; ARAUJO, K. E. C.; SOUZA, S. R.; SCHULTZ, N.; JAGGIN JÚNIOR, O. J.; SPERANDIO, M. V. L.; ZILLI, J. E.. Plant-mycorrhizal fungi interaction and response to inoculation with different growth-promoting fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 54, p.1-25, 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-3921.pab2019.v54.25140>.

YADA, M. M.; MELO, W. J.; MINGOTTE, F. L. C.; MELO, V. P.; MELO, G. M. P.. Chemical and biochemical properties of oxisols after sewage sludge application for 16 years. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s.l.], v. 39, n. 5, p.1303-1310, out. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/01000683rbc20140728>.

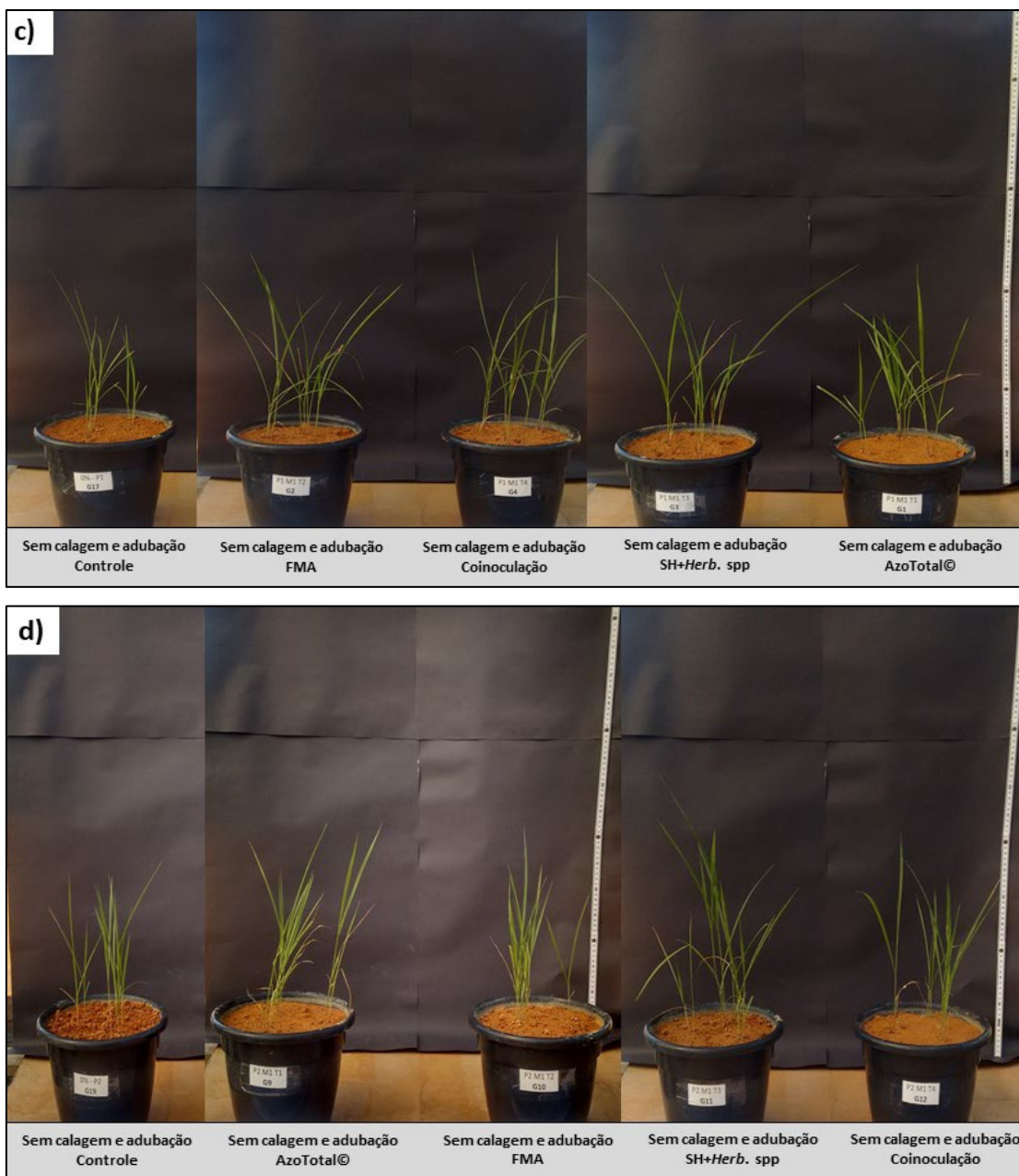
APÊNDICE

APÊNDICE A

Capítulo 1



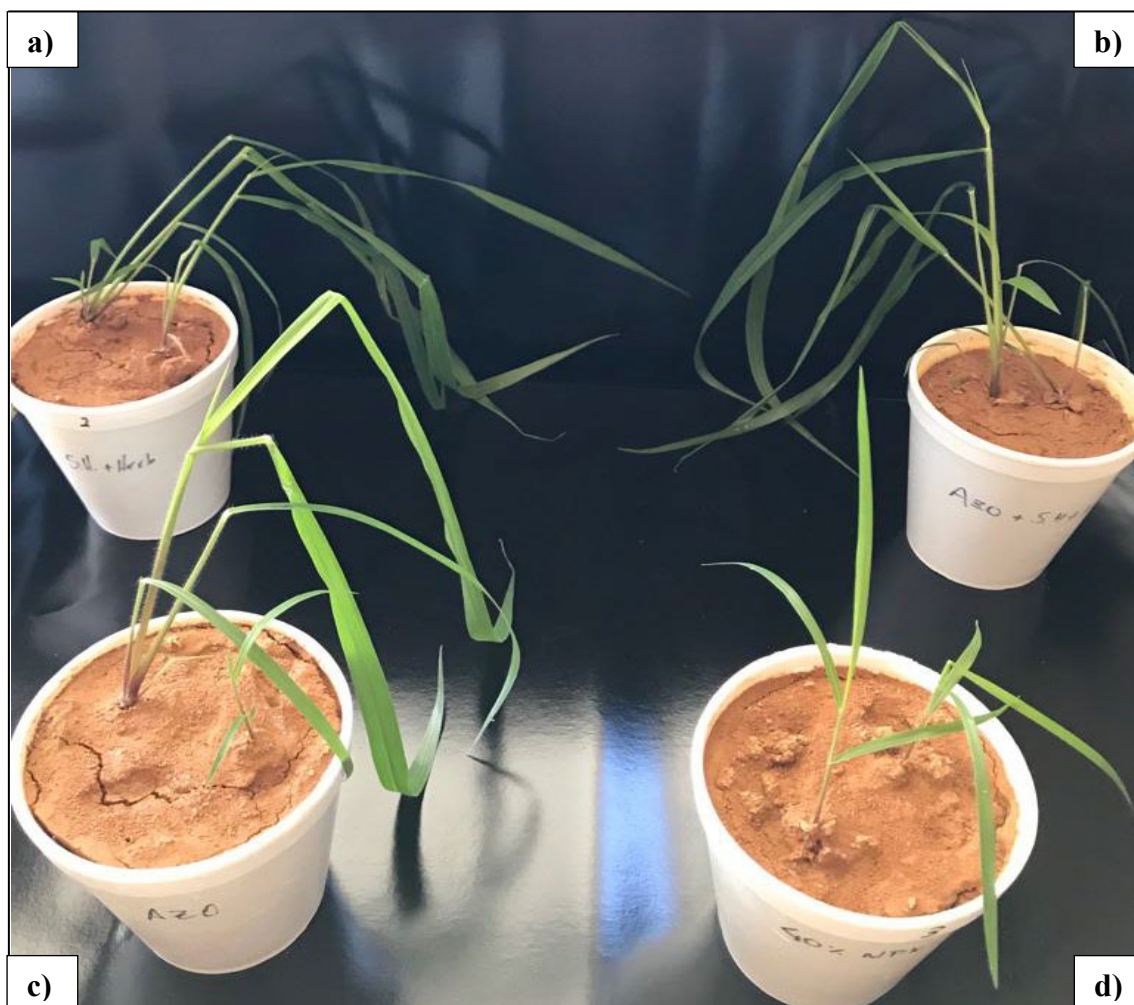
(continuação)



Tratamentos de *Urochloa* spp. aos 60 dias após emergência. As figuras (A e B) demonstram a comparação entre os genótipos no manejo com calagem e adubação, já as figuras (C e D) comparam os genótipos na ausência de calagem e adubação. *Urochloa brizantha* cv. Marandu; (A e C), *Urochloa decumbens* cv. Basilisk (B e D).

APÊNDICE B

Capítulo 2



Plantas de *Urochloa brizantha* cv. Marandu submetido aos tratamentos: a) Substâncias húmicas (SH) juntamente com *Herbaspirillum* spp; b) AzoTotal[®] + SH juntamente com *Herbaspirillum* spp; c) AzoTotal[®]; d) Controle (40% de NPK).

APÊNDICE C

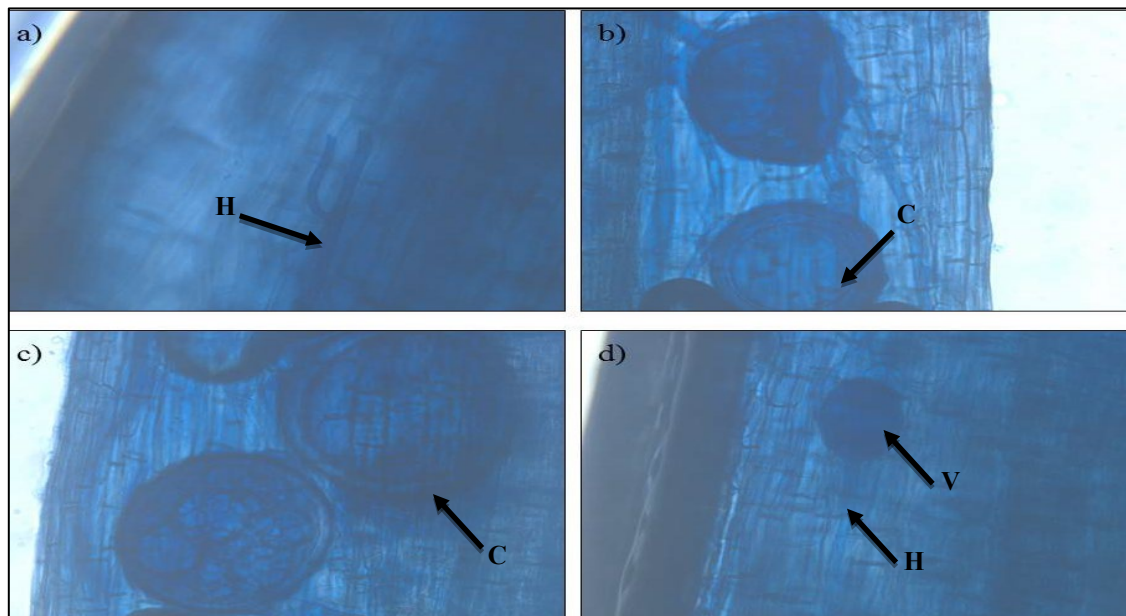
Capítulo 3



Plantas de *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 aos 60 dias após emergência submetido a diferentes concentrações de substâncias húmicas.

APÊNDICE D

Capítulo 4



Estruturas do fungo micorrízico arbuscular *Rhizoglyphus clarum* em raízes de *Arachis pintoi* cv. Amarillo MG 100 após 60 de emergência. a) Hifa; b) Clamidósporos com hifas; c) Clamidósporos e esporos d) Vesícula. **H**: hifas; **C**: clamidósporos e **V**: vesículas.