

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

Tese de Doutorado

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DO MICROBIOMA RIZOSFÉRICO DE ACÁCIA-  
NEGRA, COM POTENCIAL COMO PROMOTORAS DE CRESCIMENTO  
VEGETAL**

**Franquiéle Bonilha da Silva**

Porto Alegre, RS, Brasil  
2022

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

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DO MICROBIOMA RIZOSFÉRICO DE ACÁCIA-  
NEGRA, COM POTENCIAL COMO PROMOTORAS DE  
CRESCIMENTO VEGETAL**

por

**Franquiéle Bonilha da Silva**  
Engenheira Florestal (UNIPAMPA)  
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (UFRGS)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciência do Solo**.

Orientador:

**Enilson Luiz Saccol de Sá (UFRGS)**

Comissão examinadora da defesa de doutorado:

**Flávio Anastácio Camargo (PPG Ciência do Solo - UFRGS)**

**Claudimar Sidnei Fior (PPG Fitotecnia - UFRGS)**

**Rafael Goulart Machado (EMATER/RS)**

Porto Alegre, RS, Brasil  
31 de maio de 2022

### CIP - Catalogação na Publicação

Bonilha da Silva, Franquiéle  
Seleção de bactérias do microbioma rizosférico de  
acácia-negra, com potencial como promotoras de  
crescimento vegetal / Franquiéle Bonilha da Silva. --  
2022.  
149 f.  
Orientador: Enilson Luiz Saccol de Sá.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de  
Pós-Graduação em Ciência do Solo, Porto Alegre, BR-RS,  
2022.

1. PGPR. 2. plant-microbial interaction. 3.  
biotechnology. 4. abiotic stress. I. de Sá, Enilson  
Luiz Saccol, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FRANQUIÉLE BONILHA DA SILVA  
Engenheira Florestal - UNIPAMPA  
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - UFRGS

**TESE**

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

**DOUTORA EM CIÊNCIA DO SOLO**

Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 31/05/2022  
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 03/03/2023  
Por



ENILSON LUIZ SACCOL DE SÁ  
Orientador-PPG Ciência do Solo  
UFRGS

gov.br

Documento assinado digitalmente

ALBERTO VASCONCELLOS INDA JUNIOR

Data: 16/03/2023 16:44:36-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

CLAUDIMAR SIDNÊI FIOR  
PPG Fitotecnia/UFRGS  
(Plataforma MConf UFRGS)

FLÁVIO ANASTÁCIO DE OLIVEIRA CAMARGO  
PPG Ciência do Solo/UFRGS  
(Plataforma MConf UFRGS)

gov.br

Documento assinado digitalmente

CARLOS ALBERTO BISSANI

Data: 16/03/2023 19:38:03-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

RAFAEL GOULART MACHADO  
Instituto de Desenvolvimento Educacional  
de Passo Fundo  
(Plataforma MConf UFRGS)

CARLOS ALBERTO BISSANI  
Diretor da  
Faculdade de Agronomia/UFRGS

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa, assim como ao PPG Ciência do Solo, professores e funcionários, pela contribuição e oportunidade de realizar esse sonho. À empresa Tanac SA, pelo apoio financeiro, coletas e fornecimento de material para elaboração do trabalho. Aos professores Celso Auer, Tales Tiecher, Julierme Barbosa, Marcelo Gravina, Claudimar Sidnei Fior, Rafael Goulart Machado e Carlos Gustavo Tornquist pela colaboração técnica e científica, os quais foram essenciais para o desenvolvimento do meu trabalho de doutorado.

Ao meu orientador, Enilson Luiz Saccol de Sá, um ser humano ímpar. Pela amizade, por me conduzir até aqui, estando sempre disposto a me ouvir, me aconselhar e ajudar nos momentos em que eu precisei. Aos técnicos, Márcio e Adão, pelo apoio, gentilezas e amizade, os quais sempre pude contar, assim como o José (“tio Zé”), que sempre me ajudou na casa de vegetação, desde o mestrado. A Mara Emmanuelli (bibliotecária), pela formatação das referências da tese.

Aos meus colegas do PPG e principalmente os do laboratório, Franciane, Carolina, Fernanda, Juan, Daniela, Lucero e Bruno, por tudo que compartilhamos e vivemos nesses anos. Um agradecimento especial ao Victor, meu primeiro amigo do laboratório e fiel escudeiro até os dias de hoje. Aos muitos amigos que fiz nessa trajetória acadêmica, com destaque ao Pedro, com quem divido não só as colaborações em publicações e parcerias de sucesso, mas também as angústias de ser pós-graduando e pai/mãe ao mesmo tempo.

A Bruna, hoje minha comadre, a quem tantas vezes pude recorrer, independente da situação. À minha mãe, Jussara, que foi a grande responsável por boa parte do que conquistei até aqui e a quem espero poder retribuir um pouco do suor derramado e dos sacrifícios que passou para criar os três filhos, sem nunca se deixar abalar.

Por último e não menos importante, a meu esposo José Bernardo e meu filho José Ignacio, a minha linda família que conquistei durante o doutorado, amores da minha vida e minhas motivações.

A todos o meu muito obrigada!

# SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DO MICROBIOMA RIZOSFÉRICO DE ACÁCIA-NEGRA, COM POTENCIAL COMO PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL <sup>(1)</sup>

**Autor:** Franquiéle Bonilha da Silva

**Orientador:** Enilson Luiz Saccol de Sá

## RESUMO

A acácia-negra é uma das principais espécies florestais cultivadas no estado do Rio Grande do Sul. Por isso, a adoção de tecnologias, como é o caso da inoculação de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, pode ser uma estratégia eficaz e sustentável para produção de mudas, tanto de origem seminal quanto clonal. Nesse contexto, foram isoladas bactérias do solo rizosférico de acácia-negra, diretamente dos plantios, nos municípios de Jaguarão e Cristal/RS. Os isolados foram avaliados quanto à capacidade de produzir auxinas equivalentes aos ácido indol-acético (AIA), ácido aminociclopropano carboxílico (ACC) desaminase e ácido cianídrico (HCN) e caracterizados genotipicamente. Também foram avaliados quanto à capacidade de tolerar condições de estresse como diferentes faixas de pH, temperaturas, estresse hídrico e salinidade e então avaliados quanto à capacidade de promover a germinação de sementes de acácia-negra e capim-sudão sob condições de estresse. Também foi realizada uma meta-análise, para avaliar o efeito da coinoculação no crescimento de plantas leguminosas a nível mundial, a partir de 122 publicações, distribuídas em 32 países. Além disso, os isolados produtores de AIA e ACC desaminase foram avaliados quanto a capacidade de colonizar o tecido e no enraizamento em microestacas de acácia-negra, bem como quanto a capacidade de promover o crescimento de mudas seminais, tanto em inoculação, quanto em coinoculação com a estirpe SEMIA 6163. Dos 32 isolados avaliados, 14 foram capazes de produzir AIA em meio de cultura, sendo os isolados 21N, 33N, 52K, 77J e 81L selecionados quanto aos demais mecanismos. Os isolados 21N e 33N foram classificados como *Bacillus megaterium* e os demais como *Pseudomonas* sp. O isolado 81L foi capaz de promover o crescimento da radícula de acácia-negra em pH 5 e favorece a germinação de capim-sudão sob estresse hídrico (-0,15 MPa) e em 35°C. A meta-análise revelou que a coinoculação é mais eficiente que a inoculação, independente da leguminosa, da rizobactéria coinoculada, da condição ambiental (presença de estresse e condição biogeoquímica do solo), exceto quando o carbono orgânico do solo é maior que 1%. O isolado 52K foi capaz de colonizar o rizoplano de acácia-negra e foi eficiente no desenvolvimento de microestacas e de mudas seminais em casa de vegetação. Já na coinoculação, o isolado 33N foi o organismo que apresentou sinergia na inoculação composta. A inoculação de rizobactérias isoladas diretamente do microbioma rizosférico de acácia-negra é benéfica, sendo que há uma especificidade quanto a condição e tipo de cultivo.

<sup>(1)</sup>Tese de Doutorado em Ciência do Solo – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. (135p.) – May, 2022. O presente estudo realizado com o apoio da Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

# SELECTION OF BACTERIA FROM THE BLACK ACACIA RHIZOSPHERIC MICROBIOMA, WITH POTENTIAL AS PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA <sup>(1)</sup>

**Author:** Franquiele Bonilha da Silva

**Advisor:** Enilson Luiz Saccol de Sá

## ABSTRACT

The black wattle is one of the main forest species cultivated in Rio Grande do Sul state (BR). Therefore, the adoption of clean technologies, such as the inoculation of plant growth-promoting bacteria, can be an effective and sustainable strategy for the seedling's production, both of seminal and clonal origin. In this context, bacteria were isolated from the rhizospheric soil of black wattle, directly from the plantations, in Jaguarão and Cristal, cities of Rio Grande do Sul state. The isolates were evaluated for their ability to produce auxins equivalent to indole acetic acid (IAA), aminocyclopropane carboxylic acid (ACC) deaminase, and hydrocyanic acid (HCN) and genotypically characterized. They were also evaluated for the ability to tolerate stress conditions such as different pH ranges, temperatures, water stress, and salinity and then evaluated for the ability to promote the germination of black wattle and Sudan grass seeds under stress conditions. A meta-analysis was also carried out to evaluate the effect of co-inoculation on the growth of leguminous plants worldwide, based on 122 publications, distributed in 32 countries. In addition, AIA and ACC deaminase-producing isolates were evaluated for their ability to colonize tissue and root in black wattle micro cuttings, as well as their ability to promote the growth of seminal seedlings, both in inoculation and co-inoculation. with the strain SEMIA 6163. Of the 32 isolates evaluated, 14 were able to produce AIA in a culture medium, and the isolates 21N, 33N, 52K, 77J, and 81L were selected for the other mechanisms. Isolates 21N and 33N were classified as *Bacillus megaterium* and the others as *Pseudomonas* sp. Isolate 81L was able to promote black wattle rootlet growth at pH 5 and favored Sudan grass germination under water stress (-0.15 MPa) and at 35°C. The meta-analysis revealed that co-inoculation is more efficient than inoculation, regardless of the legume, the co-inoculated rhizobacteria, the environmental condition (presence of stress and soil biogeochemical condition), except when soil organic carbon is greater than 1%. The 52K isolate was able to colonize the black wattle rhizoplane and was efficient in the development of micro cuttings and seedlings in a greenhouse. In the co-inoculation, the 33N isolate was the organism that presented synergy in the composite inoculation. The inoculation of rhizobacteria isolated directly from the rhizospheric microbiome of black wattle is beneficial, and there is a specificity regarding the condition and cultivation mode.

<sup>(1)</sup>Doctoral Thesis in Soil Science – Soil Science Graduate Program, Agronomy Faculty, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. (135p.) – May, 2022. This study was sponsored by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
1 <i>Acacia mearnsii</i> .....	4
2 Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP).....	6
2.1 Solubilização de fosfato.....	8
2.2 Produção de substâncias fitorreguladoras .....	9
2.3 Produção de ácido amino ciclopropano carboxílico desaminase (ACC desaminase).....	11
2.4 Produção de ácido cianídrico (HCN) .....	12
2.5 Produção de sideróforos .....	14
3 Uso de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas em espécies florestais .....	15
<b>CAPÍTULO III – Estudo 1: Isolamento, caracterização e seleção de bactérias do microbioma radicular de <i>Acacia mearnsii</i> quanto aos mecanismos de promoção de crescimento de plantas</b> .....	<b>17</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
2.1 Isolamento dos microrganismos .....	19
2.2 Quantificação da produção de auxinas equivalentes ao Ácido Indol-acético (AIA) .....	20
2.3 Produção de ácido cianídrico .....	21
2.4 Produção da enzima ACC Desaminase .....	21
2.5 Avaliação da capacidade dos isolados em tolerar diferentes temperaturas, faixas de pH, salinidade e déficit hídrico.....	22
2.6 Efeito da inoculação sobre a germinação de acácia-negra ( <i>Acacia mearnsii</i> ) e capim-sudão ( <i>Sorghum sudanense</i> ) em diferentes temperaturas, faixas de pH, salinidade e déficit hídrico .....	23
2.7 Caracterização genotípica .....	24
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
3.1 Isolamento de bactérias rizosféricas.....	26



3.2 Caracterização dos isolados quanto à produção de AIA, produção de ACC desaminase e produção de HCN.....	26
3.3 Avaliação do crescimento de rizobactérias do microbioma radicular de acácia-negra em diferentes condições de estresse abiótico.....	28
3.4 Avaliação da capacidade de germinação de sementes de acácia-negra e capim-sudão submetidas diferentes condições de temperatura, pH, salinidade e estresse hídrico e inoculadas com bactérias do microbioma radicular de acácia-negra.....	30
3.4.1 Germinação de acácia-negra.....	30
3.4.2 Germinação de capim-sudão.....	34
3.5 Caracterização genotípica.....	39
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>45</b>
<b>CAPÍTULO IV – Estudo 2: Resposta de leguminosas à coinoculação de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e rizóbios: uma meta-análise.....</b>	<b>46</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
2.1 Pesquisa na literatura e compilação de dados.....	49
2.2 Variáveis moderadoras.....	51
2.3 Meta-análise.....	52
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
4.1 A coinoculação é eficiente em leguminosas, independente da espécie. ....	62
4.2 O efeito da inoculação de rizóbios e rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e o sinergismo entre eles. ....	64
4.3 Os fatores ambientais influenciando a coinoculação.....	66
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
<b>CAPÍTULO V – Estudo 3: Efeito da inoculação e coinoculação de bactérias produtoras de AIA e ACC desaminase no desenvolvimento de mudas <i>Acacia mearnsii</i>.....</b>	<b>71</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>74</b>

2.1 Interação de bactérias isoladas no microbioma rizosférico de acácia negra, com plântulas da mesma espécie .....	74
2.1.1 Avaliação da capacidade de colonização em plantas de <i>Acacia mearnsii</i> .....	74
2.2 Avaliação do enraizamento de microestacas de acácia-negra, submetidas a inoculação de bactérias isoladas do microbioma rizosférico da mesma espécie	76
2.3 Avaliação da eficiência simbiótica de rizóbios de <i>Acacia mearnsii</i> .....	77
2.4 Efeito da inoculação e coinoculação de rizóbios e bactérias promotoras de crescimento em mudas de <i>Acacia mearnsii</i> .....	78
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>80</b>
3.1 Interação de bactérias isoladas no microbioma rizosférico de acácia-negra, com plântulas da mesma espécie .....	80
3.2 Avaliação do enraizamento de microestacas de acácia-negra, submetidas a inoculação de bactérias isoladas do microbioma rizosférico da mesma espécie	81
3.3 Avaliação da eficiência simbiótica de rizóbios de <i>Acacia mearnsii</i> .....	82
3.4 Promoção de crescimento de mudas de acácia-negra pela inoculação de bactérias produtoras de AIA e ACC desaminase isoladas do microbioma rizosférico de plantas da mesma espécie.....	84
3.5 Promoção de crescimento de mudas de acácia-negra pela coinoculação de bactérias produtoras de AIA e ACC desaminase isoladas do microbioma rizosférico da mesma espécie, em conjunto com a SEMIA6163 .....	84
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>86</b>
4.1 Influência do nível de interação bacteriana na rizosfera e o seu efeito na micropropagação .....	86
4.2 Efeito da inoculação e coinoculação na produção de mudas de acácia-negra .....	89
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
<b>CAPÍTULO VI - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>92</b>
<b>APÊNDICE 1 .....</b>	<b>125</b>
<b>APÊNDICE 2 .....</b>	<b>128</b>
<b>APÊNDICE 3 .....</b>	<b>137</b>

## RELAÇÃO DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Avaliação da produção de auxinas semelhantes ao AIA em meio de cultura sem adição de triptofano (AIA ST) e com adição de triptofano (AIA CT), e da produção de ACC desaminase e de HCN por bactérias isoladas do microbioma radicular de plantas de acácia-negra.....	27
<b>Tabela 2</b> – Isolados bacterianos provenientes do microbioma radicular de acácia-negra, selecionados para avaliação com promotores de crescimento de plantas.....	29
<b>Tabela 3</b> – Nível de tolerância dos isolados à diferentes condições de estresse abiótico.....	29
<b>Tabela 4</b> – Efeito da inoculação dos isolados bacterianos estudados na germinação de sementes de acácia-negra em diferentes condições de pH.....	31
<b>Tabela 5</b> – Efeito da inoculação dos isolados bacterianos estudados na germinação de sementes de acácia-negra em diferentes condições de potencial hídrico.....	32
<b>Tabela 6</b> – Efeito da inoculação dos isolados bacterianos estudados na germinação de sementes de acácia-negra em diferentes condições de salinidade.....	33
<b>Tabela 7</b> – Efeito da inoculação dos isolados bacterianos estudados na germinação de sementes de acácia-negra em diferentes condições de temperatura.....	34
<b>Tabela 8</b> – Efeito da inoculação dos isolados bacterianos estudados na germinação de sementes de capim-sudão em diferentes condições de pH.....	35
<b>Tabela 9</b> – Efeito da inoculação dos isolados bacterianos estudados na germinação de sementes de capim-sudão em diferentes condições de potencial hídrico.....	37
<b>Tabela 10</b> – Efeito da inoculação dos isolados bacterianos estudados na germinação de sementes de capim-sudão em diferentes condições de salinidade.....	38
<b>Tabela 11</b> – Efeito da inoculação dos isolados bacterianos estudados na germinação de sementes de capim-sudão em diferentes condições de temperatura.....	40
<b>Tabela 12</b> – Atributos de plantas de acácia-negra cultivadas in vitro, inoculadas com bactérias isoladas do microbioma radicular de plantas da mesma espécie.....	80

**Tabela 13** – Eficiência simbiótica de SEMIAs em plantas de acácia-negra, cultivadas em casa de vegetação por 90 dias.....83

**Tabela 14** – Efeito da inoculação de bactérias do microbioma rizosférico de acácia-negra no crescimento de mudas de acácia-negra, cultivadas em casa de vegetação por 120 dias.....84

**Tabela 15** – Efeito da coinoculação de bactérias do microbioma rizosférico de acácia-negra e SEMIA 6163 no crescimento de mudas de acácia-negra, cultivadas em casa de vegetação por 120 dias.....85

## RELAÇÃO DE FIGURAS

- Figura 1** – Produção de HCN por bactérias isoladas do microbioma radicular de acácia-negra.....28
- Figura 2** – Número de publicações em cada país que apresentou estudo sobre coinoculação de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas e rizóbio em leguminosas.....51
- Figura 3** – Efeito geral da coinoculação com rizobactérias promotoras do crescimento de plantas e rizóbio sobre o rendimento de grãos, matéria seca de raiz e parte aérea, teor de N na parte aérea e nodulação (número e matéria seca de nódulos) de leguminosas (a) e coeficientes de correlação de Pearson entre os valores de *effect size* dos atributos avaliados nas plantas no campo (b) e em casa de vegetação (c).....55
- Figura 4** – Efeito da coinoculação com rizobactérias promotoras do crescimento de plantas e rizóbio sobre rendimento de grãos, matéria seca de raiz e parte aérea, teor de N na parte aérea e nodulação (número e matéria seca de nódulos) de leguminosas.....56
- Figura 5** – Efeito da coinoculação com rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) e rizóbios sobre o rendimento de grãos, matéria seca de raiz e parte aérea, teor de N na parte aérea e nodulação (número e matéria seca de nódulos) em função do tipo de RPCP.....57
- Figura 6** – Efeito da coinoculação com rizobactérias promotoras do crescimento de plantas e rizóbio sobre o rendimento de grãos, matéria seca de raiz e parte aérea, teor de N na parte aérea e nodulação (número e matéria seca de nódulos) em função do tipo de rizóbio.....58
- Figura 7** – Efeito da coinoculação com rizobactérias promotoras do crescimento de plantas e rizóbio sobre matéria seca de raiz e parte aérea e nodulação (número e matéria seca de nódulos) em função do tipo de estresse para experimentos conduzidos em casa de vegetação.....59
- Figura 8** – Efeito da coinoculação com rizobactérias promotoras do crescimento de plantas e rizóbio sobre rendimento de grãos, matéria seca de raiz e parte aérea, teor de N na parte aérea e nodulação (número e matéria seca de nódulos) em função de atributos biogeoquímicos do solo.....60
- Figura 9** – Avaliação da capacidade endofítica e rizosférica de bactérias isoladas do microbioma rizosférico de acácia-negra, em plântulas de origem seminal cultivadas *in vitro*.....81
- Figura 10** – Efeito da inoculação de bactérias produtoras de AIA e ACC desaminase isoladas do microbioma rizosférico de acácia-negra no enraizamento de microestacas de acácia-negra.....82

## **CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL**

A acácia-negra é uma leguminosa arbórea originária da Oceania, que foi introduzida no Brasil na segunda década do século XX. Atualmente, sua madeira é utilizada para produção de energia, celulose e papel, enquanto da casca se extrai o tanino, que tem sido utilizado principalmente para tratamento de água (SKORONSKI et al., 2014), como também na indústria farmacêutica e têxtil (MORA, 2002; OLIVEIRA, 1968).

Por ser uma das principais espécies florestais cultivadas na região sul do Brasil (com relevância comercial apenas no Rio Grande do Sul), a acácia-negra desempenha um importante papel socioeconômico devido à geração de empregos diretos e indiretos. Além disso, essa espécie é amplamente utilizada em sistemas agrossilvipastoris, com o plantio de culturas agrícolas nos primeiros anos, e introdução de gado após o fechamento do dossel.

Nos últimos anos, tem-se cada vez mais incentivado a adoção de sistemas de produção agrícola e florestal sustentáveis, priorizando, entre eles, o uso de tecnologias limpas em qualquer setor. O uso de microrganismos como inoculantes, por exemplo, tem sido uma das alternativas para a redução do uso de insumos químicos.

Em sistemas agrícolas, o uso de inoculantes em escala comercial já é uma realidade. A inoculação de estirpes simbióticas capazes de fixar nitrogênio em leguminosas, dispensa completamente o uso de fertilizantes nitrogenados, como é o caso de rizóbios em soja. Já em gramíneas, a inoculação de bactérias diazotróficas associativas é usada na promoção de crescimento pela produção de substâncias que estimulam o desenvolvimento radicular como também pela fixação

biológica de nitrogênio que pode reduzir em média, 17% da aplicação de adubos nitrogenados (MOREIRA et al., 2010).

A 28ª RELARE (Reunião da Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola) que aconteceu em junho de 2016, passou a recomendar a coinoculação de rizóbios e *Azospirillum brasilense* para as culturas de soja e feijoeiro, visando um melhor desenvolvimento do sistema radicular e a antecipação da infecção da planta pelo rizóbio (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). Em gramíneas, estudos de coinoculação de rizóbios e bactérias associativas têm mostrado resultados positivos em plantas como milho (SANTOS et al., 2016), arroz (HAHN et al., 2016; SANTOS et al., 2019) e trigo (AFZAL; BANO, 2008).

A produção de mudas de acácia-negra no Brasil ainda é, na sua maioria, de origem seminal, pois estudos visando o melhoramento genético de acácia-negra tiveram início apenas na década de 80 (MORA et al., 2001; FOELKEL et al., 2008). As empresas acacicultoras e viveiros comerciais obtêm parte das sementes a partir de APS (área de produção de sementes) e PSM (pomar de sementes por muda) (ENGEL, 2017; MORA et al., 2001). Porém, a maior parte da área plantada, ainda é proveniente de sementes coletadas em formigueiros, diretamente nos plantios comerciais, sem qualquer aprimoramento genético, gerando plantios desuniformes e com diversos problemas fitossanitários (CHAN et al., 2015; FOELKEL, 2008).

Mais recentemente, a produção de mudas de acácia-negra de origem clonal vem sendo vista como uma alternativa para a obtenção de plantios mais homogêneos e produtivos, devido a um material genético de melhor qualidade (ENGEL, 2017). Dentre os métodos de propagação vegetativa, a propagação por estaquia e miniestaquia, são os mais utilizados na silvicultura. Esse é um dos grandes desafios da cultura, já que a taxa de enraizamento é de apenas 30%, podendo chegar a 50% quando usado AIB (ácido indol-butírico) sintético (SALLES, 2014, BEHLING, comunicação pessoal, 2016).

Diante disso, o uso da inoculação de rizobactérias promotoras de crescimento em viveiros florestais pode favorecer o desenvolvimento de mudas, através de múltiplos mecanismos, como produção de substâncias fitorreguladoras, disponibilização de nutrientes e supressão de patógenos, como também podem agir

positivamente e de forma sinérgica quando inoculadas em conjunto aos rizóbios simbiontes em leguminosas. Sendo assim, a inoculação desses organismos, podem reduzir a utilização de produtos químicos na fase de produção de mudas, ou até mesmo suprimir a utilização, no caso de fitorreguladores sintéticos, como o AIB.

O presente trabalho apresentou como hipótese que bactérias isoladas a partir do microbioma radicular de acácia-negra são capazes de melhorar o estabelecimento de mudas em viveiro por apresentarem diversos mecanismos de promoção se crescimento de plantas. O objetivo foi selecionar bactérias do microbioma radicular de acácia-negra (*Acacia mearnsii*) que apresentam capacidade como promotoras de crescimento vegetal, e avaliá-las quanto à capacidade de influenciar positivamente o desenvolvimento radicular de mudas, melhorando tanto o estabelecimento de mudas seminais, quanto clonais.



## CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1 *Acacia mearnsii*

A espécie *Acacia mearnsii* De Wild., ou acácia-negra, é nativa do sudeste da Austrália, especialmente na região costeira, em declives junto aos planaltos da região de Sidney, no Estado de Nova Gales do Sul, até o extremo sudeste do Estado da Austrália do Sul e em áreas de baixa e média altitude do Estado da Tasmânia (HIGA et al., 2009).

Em seu habitat natural, é uma árvore com altura entre 6 e 10 m, podendo atingir até 15 m. Tem um caule principal, geralmente reto e dominante. Em árvores adultas, a casca é geralmente preto-amarronzada, dura e fissurada. A folhagem adulta é de cor verde-escura, com brotos suavemente amarelos. As folhas são bipinadas, com 8 a 21 pares de pinas, cada um com 15 a 70 pares de folíolos que medem 1,5 a 4,0 mm de comprimento por 0,5 a 0,7 mm de largura (BOLAND, 1984).

A floração na Austrália ocorre entre outubro e dezembro, principalmente, em novembro. Os frutos são legumes mais ou menos retos, compridos entre as sementes, medindo entre 5 a 15 cm de comprimento por 4 a 8 mm de largura, e amadurecem, de 12 a 14 meses após a floração. Cada legume contém entre 1 e 14 sementes de cor negra, ovóide, de 3 a 5 mm de comprimento por 2 a 3,5 mm de largura, que se caracterizam por apresentar um arilo terminal curto, de cor creme (BOLAND, 1984).

A madeira apresenta alburno muito claro, cerne marrom-claro, com marcas avermelhadas, muito dura e resistente. A textura comumente apresenta grã reversa

ou entrelaçada, com durabilidade baixa a moderada. A densidade básica é de, aproximadamente, 800 kg/m<sup>3</sup> (BOLAND et al., 1984).

O gênero *Acacia*, se desenvolve bem sob clima árido e semiárido, é comum em regiões subúmidas, pouco frequente em regiões úmidas e raro em florestas tropicais (BOLAND et al., 1984). Cresce bem em solos moderadamente profundos, bem drenados e de textura média. Apresenta sistema radicular superficial, conferindo um bom desenvolvimento em solos rasos, mas torna-se muito suscetível a ventos fortes, ocorrendo o seu tombamento (MÜLLER, 2006).

Por se tratar de uma leguminosa, a acácia-negra é utilizada para restauração de áreas degradadas pelos benefícios ao solo (incorporando um alto teor de matéria orgânica no solo e fixando nitrogênio atmosférico), por apresentar baixo risco de incêndio (pelo rápido processo de decomposição de resíduos e não formação de manta), e ainda permitir a coexistência de várias espécies como gramíneas, devido à boa penetração de luz através das copas, o que favorece o estabelecimento da fauna silvestre, assim como a sobrevivência da biota e microbiota existente no solo (MÜLLER, 2006). Estima-se que a fixação de nitrogênio de acácia-negra fica em torno de 200 kg/ha/ano (FRANCO; DÖBEREINER, 1994). É uma pioneira de vida curta, cobre rapidamente o terreno, não demonstra ser uma invasora agressiva dos ambientes naturais no sul do Brasil, não rebrota de cepa ou raiz e não inibe a sucessão local. Devido a essas características, apresenta perfil ideal para recuperação de ambientes degradados (CARPANEZZI, 1998).

A acácia-negra é cultivada comercialmente no Brasil, somente no estado do Rio Grande do Sul. Os primeiros plantios comerciais foram realizados em 1928 no Município de Estrela/RS, com sementes provenientes da África do Sul, tendo como objetivo a utilização da casca *in natura* em curtumes (OLIVEIRA, 1968). A instalação de indústrias para o processamento de tanino a partir da década de quarenta, promoveu uma expansão da acacicultura na região da Encosta da Serra Geral até o Vale do Jacuí, início da Depressão Central (OLIVEIRA, 1968), chegando a atingir em 2008 aproximadamente 200 mil hectares de área plantada no estado (AGEFLOR, 2020). Mora (2002), numa revisão sobre produções obtidas em diversas plantações no Rio Grande do Sul, cita produções de madeira de 22,8 a 31,4 st/ha/ano e de casca, de 10,5 a 19,0 t/ha.

A acácia-negra é a principal fonte de casca para a indústria de taninos vegetais em nível mundial (MORA, 2002). Da sua casca são retirados extratos vegetais ricos em tanantes e fenóis, que origina taninos, utilizados no curtimento do couro; condicionadores de lama, para perfuração de poços de petróleo; adesivos, para painéis de madeira e resinas, a base fenólica. Atualmente, o principal uso para o tanino extraído da casca é como coagulante e floculante, para tratamento de água e esgoto (BELTRÁN-HEREDIA et al., 2010; SKORONSKI et al., 2014). Além de gerar um lodo biodegradável, não há a necessidade da correção posterior de pH (BELTRÁN-HEREDIA et al., 2010).

A madeira é usada na indústria de celulose, como madeira aglomerada, e lenha, na secagem de grãos, fumo, padarias e olarias, além do uso doméstico, em lareiras e fogões à lenha. É, também, matéria-prima para a produção de celulose kraft, com rendimentos, propriedades óticas e físico/mecânicas adequadas (HIGA et al., 2009; TONIETO; STEIN, 1997).

## **2 Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP)**

A rizosfera é a zona do solo que recobre a raiz, especificamente influenciada pelo sistema radicular (DOBBELAERE et al., 2003). Esta zona é rica em nutrientes, quando comparada com o solo em geral devido à acumulação de uma variedade de exsudatos liberados pelas plantas, tais como aminoácidos e açúcares, fornecendo uma rica fonte de energia e nutrientes para os microrganismos (GRAY; SMITH, 2005). Por esse motivo, o número de microrganismos que se encontram ao redor das raízes de plantas, é geralmente de 10 a 100 vezes mais elevado do que no solo não-rizosférico, e composto de uma grande variedade, sendo as bactérias que colonizam esse habitat chamadas de rizobactérias (SCHROTH; HANCOCK, 1982; WELLER; THOMASHOW, 1994).

Bactérias associadas a plantas podem ser classificadas em grupos benéficos, deletérios e neutros, com base em seus efeitos no crescimento das plantas (DOBBELAERE et al., 2003). Bactérias benéficas de vida livre do solo são geralmente referidas como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas

(RPCP) (KLOEPPER et al., 1989), do inglês “plant growth-promoting rhizobacteria” (PGPR). Independente dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal, RPCPs colonizam a rizosfera, o rizoplane (superfície radicular), ou até mesmo os tecidos radiculares (endofíticas) (GRAY; SMITH, 2005).

Sabe-se que apenas 1 a 2% das bactérias rizosféricas promovem o crescimento de plantas (ANTOUN; KLOEPPER, 2001). Desde modo, somente pode se dizer que uma bactéria é uma RPCP, após seu isolamento a partir do solo, rizosfera, ou da própria raiz e sua reintrodução pela inoculação de plantas, seguido de avaliação da sua capacidade de colonizar rizosfera e causar efeito positivo (KLOEPPER; SCHROTH, 1978).

As RPCP podem induzir o crescimento de plantas de maneira direta ou indireta. De forma direta, a promoção do crescimento das plantas pode se dar tanto pela liberação para a planta de compostos que são sintetizados pela bactéria, como os fitormônios, quanto por facilitar a absorção de certos nutrientes do solo pela planta. Indiretamente, se dá quando a RPCP diminui ou previne os efeitos deletérios de um ou mais organismos fitopatogênicos, tanto pela produção de substâncias antagonistas quanto pela indução de resistência sistêmica a patógenos (GLICK, 2012). As RPCP podem induzir o crescimento e desenvolvimento da planta, utilizando qualquer um ou mais de um destes mecanismos. Uma RPCP que é usada como agente de biocontrole, por exemplo, pode agir por meio de vários mecanismos, independentemente do seu papel na promoção de crescimento direta, como pela produção conhecida do fitormônio auxina (PATTEN; GLICK, 2002), diminuição dos níveis de etileno da planta (GLICK et al., 2007) ou da fixação de nitrogênio associada às raízes (DÖBEREINER, 1992).

As RPCP e suas interações com as plantas já são exploradas comercialmente e são uma grande promessa para a agricultura sustentável (PODILE; KISHORE, 2006). Já existem pesquisas que estudam essas associações, com inúmeras espécies vegetais. O uso de RPCP como inoculantes para biofertilização na agricultura é uma opção atraente para reduzir o uso de fertilizantes químicos (BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001). Além disso, apresentam grande adaptação a ambientes extremos, como em situações de estresse hídrico (ARZANESH et al., 2011; RAVANBAKHS et al., 2017), estresse salino (MAYAK et

al., 2004, SAFARI et al., 2018), altas temperaturas, ambiente áridos (MOTA et al., 2008) e ambientes contaminados (DELL'AMICO et al., 2008), o que indica que eles podem contribuir positivamente para a agricultura em áreas com baixo potencial agrícola.

## 2.1 Solubilização de fosfato

O fósforo (P) é um nutriente essencial para o metabolismo de plantas e apresenta baixa disponibilidade em muitos solos agrícolas. Hoje, muitos solos agrícolas têm um teor total de P elevado devido à aplicação de fertilizantes durante longos períodos. Por outro lado, a maior parte deste fósforo se encontra em forma mineral insolúvel, que é lentamente disponibilizada para as plantas (RICHARDSON; SIMPSON, 2011).

As formas insolúveis de P, tais como fosfato tricálcico ( $(Ca_3PO_4)_2$ ), o fosfato de alumínio ( $Al_3PO_4$ ), fosfato de ferro ( $Fe_3PO_4$ ), podem ser convertidos em P solúvel por organismos solubilizadores que habitam diferentes ecossistemas do solo (SHARMA et al., 2013; SONG et al., 2008). Entre as comunidades bacterianas do solo, estirpes ectorizosféricas como *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp. e simbioses como rizóbios têm sido descritos como solubilizadores de fosfato eficazes (IGUAL et al., 2001; SONG et al., 2008).

A capacidade das bactérias da rizosfera de solubilizar fosfatos insolúveis é atribuída a mecanismos primários como a excreção de íons  $H^+$ , a produção de ácidos orgânicos e a biossíntese de fosfatases ácidas (ARCAND; SCHNEIDER, 2006; RICHARDSON; SIMPSON, 2011). Dentre os ácidos orgânicos produzidos pode-se citar acetato, lactato, malato, oxalato, succinato, citrato, gluconato, os quais formam complexos com o ferro ou alumínio presentes nos fosfatos de ferro e alumínio, tornando assim, o fosfato presente no solo disponível para as plantas (GYANESHWAR et al., 2002). Estes microrganismos têm a capacidade de se desenvolver em meios com fosfato tricálcico ou materiais insolúveis semelhantes como a única fonte de fosfato e não só assimilam o elemento, mas também

solubilizam quantidades além das suas exigências nutricionais, tornando o excedente disponível para as plantas (CHEN et al., 2006).

Inúmeros estudos já demonstraram o efeito da inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato em plantas. Afzal e Bano (2008) inocularam uma estirpe de rizóbio, associada com uma estirpe bacteriana solubilizadora de fosfato, em cultivo de trigo em um solo arenoso deficiente em fósforo, e verificaram um aumento na absorção de fósforo, sendo 30 a 40% maior quando comparado ao tratamento que recebeu somente a aplicação de fertilizantes. Além disso, houve um aumento significativo no peso seco da raiz, na altura das plantas, no comprimento das espigas, no rendimento de grãos e no teor de açúcar e proteína foliar.

## 2.2 Produção de substâncias fitorreguladoras

A produção de fitormônios por rizobactérias promotoras de crescimento é considerada um dos mecanismos mais importantes na promoção de crescimento das plantas (SPAEPEN et al., 2007). Fitormônios são compostos orgânicos que, em concentrações extremamente baixas influenciam os processos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos em plantas, e a sua síntese é finamente regulada (FUENTES-RAMIREZ; CABALLERO-MELLADO, 2006). Em termos gerais, com base em suas estruturas químicas e seus efeitos sobre as plantas, essas substâncias reguladoras de crescimento têm sido divididas em cinco grandes grupos: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e um grupo chamado de inibidores, que inclui o ácido abscísico (ABA), compostos fenólicos e alcalóides (FERGUSON; LESSENGER, 2006).

A produção de auxinas apresenta um papel muito importante na interação planta/microrganismo, sendo o ácido indol-acético (AIA), o mais importante das auxinas. O AIA é o principal responsável pela divisão e expansão de células, diferenciação de tecidos de plantas e estímulo à rizogênese. A capacidade de sintetizar AIA tem sido detectada em muitas rizobactérias de vida livre, bactérias simbióticas, bem como em espécies bacterianas patogênicas (COSTACURTA; VANDERLEYDEN, 1995; TSAVKELOVA et al., 2006).

Atualmente, a capacidade de sintetizar auxinas é o mecanismo mais bem estudado em rizobactérias (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007; TSAVKELOVA et al., 2006). A grande maioria das rizobactérias sintetiza AIA a partir do precursor triptofano, devido à excreção de triptofano pela raiz no ambiente rizosférico, porém, o AIA pode também ser sintetizado através de vias independentes do triptofano, embora em quantidades inferiores (KRAVCHENKO et al., 2004; SPAEPEN et al., 2007). A síntese de AIA por microrganismos é realizada por uma dessas três vias: a primeira é a via ácido indol-3-pirúvico e aldeído indol-3-acético, que é o que ocorre na maioria das bactérias, como espécies saprófitas do gênero *Agrobacterium* e *Pseudomonas* e algumas estirpes pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, a segunda é a conversão do triptofano em aldeído indol-3-acético, que pode envolver uma via alternativa em que se forma triptamina, que ocorre em *Pseudomonas* e *Azospirillum*, e a terceira é através da biossíntese indol-3-acetamida, que é a rota realizada por bactérias fitopatogênicas (KHAN et al., 2014).

O AIA produzido por rizobactérias como os rizóbios pode induzir a formação de raízes e, conseqüentemente, um incremento em volume e peso seco e área da superficial de raízes quando inoculados em não-leguminosas (DAZZO; YANNI, 2006). A inoculação com bactérias produtoras de auxina podem também resultar no aumento da formação de raízes adventícias (RAMOS-SOLANO et al., 2010).

Estirpes produtoras de AIA são amplamente utilizadas em cultivos agrícolas, como promotoras de crescimento de plantas. Em um estudo com as estirpes *Azospirillum brasilense* Az39 e *Bradyrhizobium japonicum* E109, verificou-se que estas são capazes de excretar AIA em meio de cultura, a uma concentração suficiente para produzir as alterações morfológicas e fisiológicas em tecidos jovens de sementes de milho (*Zea mays*) e soja (*Glycine max*), sendo responsáveis pelo crescimento precoce das plântulas (CASSÁN et al., 2009).

Um consórcio utilizando duas estirpes, *Burkholderia* sp. MSSP e *Sinorhizobium meliloti* PP3 conhecidas como produtoras de AIA, quando inoculadas em guandu (*Cajanus cajan*) mostraram um aumento excepcional no crescimento de mudas (PANDEY; MAHESHWARI, 2007).

Assim como as auxinas, as citocininas influenciam na divisão celular e crescimento celular, como também afetam a dormência das sementes, floração, frutificação e senescência da planta (FERGUSON; LESSENGER, 2006). A produção de citocininas por rizobactérias promotoras de crescimento é, no entanto, menos expressiva em comparação com a produção de auxinas (BOIERO et al., 2007). Métodos utilizados para a detecção de citocinina ainda estão em estudo e, portanto, resultados sobre a síntese de citocinina por rizobactérias em geral, são escassos.

A giberelina é outro regulador de crescimento que afeta a germinação de sementes (MIRANSARI; SMITH, 2009), estimula o crescimento (GOU et al., 2011) e retarda o envelhecimento de plantas (FERGUSON; LESSENGER, 2006).

O etileno é responsável pela inibição do alongamento de raízes, senescência e abscisão de vários órgãos e a maturação de frutos. Rizobactérias que produzem a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase podem promover o crescimento de plantas, já que reduzem a produção de etileno através da síntese de seu precursor (ACC), sendo uma característica de interesse em bactérias utilizadas como promotoras de crescimento (GLICK et al., 2007).

### 2.3 Produção de ácido amino ciclopropano carboxílico desaminase (ACC desaminase)

O hormônio etileno, encontrado em todas as plantas superiores, é um metabólito essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas (KHALID et al., 2006). É produzido endogenamente na planta, sendo sua produção ativada por diferentes processos bióticos e abióticos e é importante na indução de múltiplas alterações fisiológicas (AHEMAD; KRIBET, 2014). Muitos aspectos do crescimento de tecidos vegetais, como raízes, caules, folhas, flores e frutos, bem como todos os estágios do desenvolvimento da planta são afetados pelo etileno (GLICK, 2014). Vários outros processos vegetais envolvem o etileno, incluindo a nodulação de rizóbios em leguminosas (KHALID et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2018), enraizamento de estacas (Li et al., 2005; MONTERO-CALASANZ et al., 2013), bem



como a interação planta-micorriza (GAMALERO et al., 2008; KHATABI; SCHÄFER, 2012).

Além disso, é conhecido como o “hormônio do stress”, pois sob condições como presença de metais, produtos químicos orgânicos e inorgânicos, temperaturas extremas, muita ou pouca água, alto índice de radiação ultravioleta, danos causados por inseto e nematóides, doenças (causadas por fungos, vírus e bactérias) e ferimentos mecânicos, o nível endógeno de etileno é significativamente aumentado, o que afeta negativamente o desenvolvimento geral da planta (GLICK, 2014; GUPTA; PANDEY, 2019).

Algumas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas apresentam a capacidade de produzir a enzima ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) desaminase (GLICK, 2014). A enzima ACC desaminase é responsável pela degradação do ACC, tendo como produtos amônia e  $\alpha$ -cetobutirato (GAMALERO; GLICK, 2015; RAGHUWANSHI; PRASAD, 2018). O ACC é precursor imediato do etileno, sendo assim, há uma modulação nos níveis de etileno na planta. Portanto, a RPCP que produz ACC-desaminase tem o potencial de conter a produção excessiva de etileno induzido por situações de stress e seu efeito adverso associado às plantas (GUPTA; PANDEY, 2019). Diversos trabalhos relatam o efeito da inoculação de rizobactérias produtoras de ACC desaminase em plantas, como uma maior resistência a patógenos (GHOSH et al., 2018), stress hídrico (RAVANBAKHSI et al., 2017), salinidade (POURBABAEE et al., 2016; SAFARI et al., 2018), também o incremento em raiz e parte aérea das plantas, bem como, maior absorção de nutrientes (SHAHAROONA et al., 2008). Em leguminosas, quando coinoculadas com rizóbios, são capazes de antecipar a nodulação (CEDEÑO-GARCÍA et al., 2018), modificar a arquitetura radicular, aumentar biomassa e altura de plantas e também o número de nódulos (SHAHZAD et al., 2010).

#### 2.4 Produção de ácido cianídrico (HCN)

Algumas rizobactérias são capazes de produzir HCN (sigla para “*hydrogen cyanide*”, em português, ácido cianídrico), que é um metabólito secundário volátil,

considerado tóxico ao ambiente de uma forma geral (REZZONICO et al., 2006). É formado a partir do seu precursor, a glicina (que é comumente encontrado em exsudatos radiculares), através da enzima HCN sintetase, que está associada à membrana plasmática das rizobactérias produtoras de HCN (BLUMER; HAAS, 2000). Sua toxidez se dá através da inibição do citocromo C oxidase, o componente final da cadeia respiratória aeróbica, além de outras metaloenzimas essenciais (KNOWLES, 1976; SOLOMONSON, 1981).

Devido ao seu efeito tóxico, desempenha um importante papel na supressão de patógenos de uma forma sinérgica com outros mecanismos, como a produção de antibióticos, sideróforos e enzimas degradadoras de parede celular (OLANREWAJU et al., 2017; RAMETTE et al., 2006; SIDDIQUI et al., 2006).

Estudos demonstram o efeito do HCN produzido por rizobactérias, no controle de doenças como o nó da raiz em tomateiro, causada pelo nematoide *Meloidogyne javanica* e também da podridão negra da raiz, em plantas de tabaco, causada pelo nemoatóide *Thielaviopsis basicota* (SIDDIQUI et al., 2006; VOISARD et al., 1989). Abd El-Rahman et al. (2019) avaliaram o efeito de rizobactérias produtoras de HCN sobre a ocorrência isolada e conjunta de *Agrobacterium tumefaciens* e *Meloidogyne incognita* em plantas de tomateiro e os resultados mostraram que houve controle tanto na ocorrência de apenas uma das enfermidades, quando na ocorrência concomitante delas. Também no controle de *Odontotermes obesus*, um cupim subterrâneo que é uma praga presente em diversas culturas agrícolas e florestais na Índia (DEVI et al., 2007; KUMAR et al., 2015).

Na supressão de fungos patogênicos, alguns trabalhos mostram que o uso de pseudomonas fluorescentes produtoras de HCN, apresentaram um papel de definitivo no controle das doenças (BLUMER; HAAS, 2000; LAVILLE et al., 1998; MICHELSEN; STOUGAARD, 2012). No entanto, alguns resultados se mostraram contraditórios. (NAGARAJKUMAR et al., 2004; PAL et al., 2000; REZZONICO et al., 2006). Porém, tais discrepâncias provavelmente sejam resultado de diferentes parâmetros experimentais utilizados (NANDI et al., 2017).

Há também diversos relatos que indicam que o HCN é também prejudicial ao desenvolvimento de plantas (SIDDIQUI et al., 2006). Bakker e Schippers (1987)

verificaram que o HCN produzido por rizobactérias causaram a inibição do metabolismo energético em células da raiz de plantas de batata, assim como foi observada a redução no crescimento radicular de alface (ALSTRÖM; BURNS, 1989). Em um trabalho com *Arabidopsis thaliana*, o HCN produzido por bactérias do gênero *Pseudomonas* inibiu o crescimento primário das raízes devido à supressão de um gene responsivo a auxina (RUDRAPPA et al., 2008). Porém, alguns trabalhos mostram que não há efeito negativo direto nas plantas hospedeiras, quando há inoculação da rizobactéria específica (simbiótica e/ou endofítica) da planta, podendo atuar diretamente no controle de plantas daninhas em culturas agrícolas (ZELLER et al., 2007).

## 2.5 Produção de sideróforos

Os sideróforos são compostos de baixo peso molecular que são produzidos e utilizados por bactérias e fungos como agentes quelantes de ferro (Fe). Estes compostos são produzidos por vários tipos de bactérias, em resposta à deficiência de ferro que ocorre normalmente em solos de pH neutro a alcalino, devido à baixa solubilidade do ferro em pH elevado (SHARMA; JOHRI, 2003). Muitos processos celulares são dependentes de ferro, tais como o transporte de elétrons, a redução de oxigênio durante a síntese do ATP, a fotossíntese e a síntese de aminoácidos (RATLEDGE; DOVER, 2000).

Uma série de fatores ambientais modulam a síntese de sideróforos, incluindo o pH, o teor e a forma de íons de ferro disponíveis, a presença de outros oligoelementos, e fontes adequadas de carbono, nitrogênio e fósforo (DUFFY; DÉFAGO, 1999). O crescimento bacteriano assim como a produção de sideróforos é estimulada na presença de sulfato de amônio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  e determinados aminoácidos, no entanto, uma maior produção de sideróforos é observada na presença de uréia (SAYYED et al., 2005).

A produção de sideróforos por rizobactérias promotoras de crescimento pode evitar a proliferação de microorganismos patogênicos na rizosfera, devido a capacidade de sequestrar o ferro na forma  $\text{Fe}^{3+}$ , tornando-o indisponível para esses microorganismos (SIDDIQUI et al., 2006).

### 3 Uso de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas em espécies florestais

Apesar dos estudos com RPCPs terem avançado muito nos últimos anos em sistemas agrícolas, as pesquisas voltadas para espécies florestais ainda precisam de estudos mais aprofundados (TEIXEIRA et al., 2007). Em espécies florestais, o objetivo não é o aumento na produção de madeira, já que o tempo de rotação é bastante longo, mas sim proporcionar a planta uma maior taxa de sobrevivência, conferindo maior robustez para a muda, melhor desenvolvimento do sistema radicular e a proteção contra patógenos (MAFIA et al., 2007).

Teixeira et al. (2007) utilizando isolados provenientes de mudas clonais e eucalipto, verificaram um aumento de até 110% no enraizamento de mudas e 250% no crescimento. A maioria desses isolados pertencia aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*. A partir desse estudo e outros conduzidos pelo mesmo grupo de pesquisa, uma parceria entre UFV e a Bio Soja Indústrias Químicas e Biológicas, desenvolveu duas formulações (sólida e líquida) para veicular isolados de rizobactérias benéficas para a produção de mudas clonais e eucalipto, denominado Rizolyptus®, composto por *Bacillus subtilis*, criado para viabilizar o emprego desse inoculante em larga escala (ZARPELON, 2007).

O Bacsol® também é um biofertilizante que já é utilizado comercialmente. Trata-se de um composto que contém uma gama de bactérias, além de outros microorganismos classificados como rizosféricos, decompositores, nitrogenadores e parasitas. Esses microorganismos entram em intensa multiplicação em contato com a umidade do solo. O produto possui propriedades de tornar disponíveis os nutrientes no solo, além de propiciar defesa contra nematóides, pragas e doenças no solo (HOPPE et al., 2004a). Entre os microrganismos presentes no composto, estão os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* (MONTEIRO et al., 2017).

Hoppe et al., (2004a), em um estudo com mudas de *Acacia mearnsii* em viveiro, onde se aplicou o produto Bacsol em sementes, obteve um incremento em

altura de quase 100% em relação ao tratamento sem aplicação do produto. Em estudo semelhante, em mudas de *Pinus eliotti*, o incremento foi superior a 40% (HOPPE et al., 2004b). Monteiro et al. (2017), testaram o produto no desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus benthamii*, e observaram um incremento em altura maior que 70% em relação ao tratamento controle, e em massa seca da parte aérea o incremento foi de quase 180%.

## **CAPÍTULO III – Estudo 1: Isolamento, caracterização e seleção de bactérias do microbioma radicular de *Acacia mearnsii* quanto aos mecanismos de promoção de crescimento de plantas**

### **1 INTRODUÇÃO**

O solo é um dos ambientes com maior riqueza e diversidade de microrganismos que existe, principalmente nas regiões próximas às raízes, o que se deve a exsudação de fotoassimilados que são prontamente utilizados no metabolismo microbiano (BAIS et al., 2006). Essa região é definida como rizosfera, que é a zona de solo que sofre influência das raízes (HARTMANN; ROTHBALLER; SCHMID, 2008; HILTNER, 1904). Devido à complexidade, a rizosfera não apresenta um tamanho mensurável, mas sim um gradiente químico, físico e biológico, que muda radialmente e longitudinalmente ao redor da raiz (MCNEAR, 2013). Nesse ambiente, as plantas têm a capacidade de moldar a comunidade microbiana associada às raízes através dos rizodepósitos (TIAN et al., 2020). Por esse motivo, é nessa região que se encontram a maioria dos organismos associativos, que são benéficos às plantas, como as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP).

As RPCP são bactérias habitantes do ambiente rizosférico, sejam elas endofíticas (habitam internamente o tecido das plantas nos espaços intercelulares), simbiotes (capazes de formar estruturas específicas, como os rizóbios) ou de vida livre, que são capazes de interagir de forma benéfica com a planta (KHAN, 2005; OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017). Através dessa interação, expressam

múltiplos mecanismos de promoção de crescimento, como aumento da disponibilidade de nutrientes (EMAMI et al., 2020; ETESAMI; EMAMI; ALIKHANI, 2017; SANTOS et al., 2020; SILVA et al., 2020), a regulação de substâncias fitorreguladoras (GLICK, 2014; HAYAT et al., 2010; PAÇO et al., 2020), o biocontrole de doenças e pragas pela produção de metabólitos e indução de resistência sistêmica (FERREIRA et al., 2020; OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017) e produção de exopolissacarídeos e outras substâncias (ASHRY et al., 2021; MORCILLO; MANZANERA, 2021; NASEEM; BANO, 2014).

Um dos pontos críticos para a utilização bem-sucedida de inoculantes microbianos, é a capacidade desses microrganismos de sobreviver, competir com a microbiota nativa e colonizar a rizosfera da planta (NIU et al., 2018). Por esse motivo, organismos tolerantes a condições ambientais extremas, como estresse hídrico, temperaturas altas ou baixas, salinidade, diferentes faixas de pH do solo e presença de metais pesados, apresentam vantagens sobre os outros (GETAHUN et al., 2020). Além de suportar ambientes extremos, a função das PGPR nesse contexto é de aumentar a tolerância ao estresse e por consequência, promover o crescimento de plantas através da expressão dos múltiplos mecanismos de promoção de crescimento, independente do estresse ao que a planta estiver submetida (CHANDRA et al., 2019a; RHO et al., 2018; RUBIN; VAN GROENIGEN; HUNGATE, 2017).

Embora a pesquisa mundial demonstre através de dados robustos que a utilização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas é uma estratégia eficaz em cultivos agrícolas, ainda há uma lacuna quando se fala do seu uso na silvicultura (MONTEIRO et al., 2019). Estudos em FBN, promoção de crescimento de plantas por bactérias e fungos micorrízicos, assim como o controle biológico de doenças e pragas em cultivos florestais ainda são pouco explorados, e seus benefícios são subestimados (MONTEIRO et al., 2019; WINAGRASKI et al., 2019). Diante disso, o presente estudo tem como hipótese central que bactérias do microbioma rizosférico apresentam mecanismos de promoção de crescimento vegetal e são capazes de expressar seu potencial em diferentes condições de estresse abiótico.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Isolamento dos microrganismos

Amostras de solo da região rizosférica de *Acacia mearnsii* foram coletadas em duas áreas de plantio da Empresa Tanac SA, localizadas nas cidades de Cristal e Jaguarão, na região sul do estado do Rio Grande do Sul (Apêndice 1). As áreas de estudo encontravam-se com plantio estabelecido há dois anos, e consistiam em testes clonais de *A. mearnsii*. Antes da instalação do experimento, a área de Jaguarão era composta de campo nativo. Já na área de Cristal, a área foi convertida de campo nativo, onde houve oito ciclos de plantio de *A. mearnsii* e no ano anterior a instalação do experimento, foi cultivado soja. As raízes foram coletadas com o solo aderido, em uma profundidade de até 20 cm. O solo da área de Jaguarão é classificado como Neossolo Regolítico Distrófico e o de Cristal, Litossolo Brunizém (WINAGRASKI, 2018).

Para o isolamento bacteriano, amostras de 10 g de solo rizosférico foram colocadas em frascos de Erlenmeyer com 90 mL de solução salina (NaCl, 0,85%) esterilizada e agitadas por 30 minutos. Após esse período, foram feitas diluições decimais seriadas até a diluição  $10^{10}$ , e então foram retiradas alíquotas de 100  $\mu$ L de cada diluição que foram espalhadas em placas de petri com diferentes meios de cultura com o auxílio de uma alça de Drigalski.

Foram utilizados cinco meios de cultura, visando o isolamento de bactérias de diversos gêneros. Os meios utilizados foram: meio King B (KING et al., 1954), para isolamento de bactérias do gênero *Pseudomonas*; meio NFb para isolamento de bactérias do gênero *Azospirillum*; meio JNFb, para isolamento de bactérias do gênero *Herbaspirillum* (DÖBEREINER et al., 1995); meio JMV (BALDANI; BALDANI; DÖBEREINER, 1996), para isolamento de bactérias do gênero *Burkholderia*.

Todas as placas foram incubadas a 28°C por sete dias, sendo observadas diariamente quanto às características de crescimento das colônias. Visando a viabilidade de execução do trabalho, todos os isolados foram submetidos a



crescimento em meio de cultura LM, sendo apenas os com crescimento persistente em LM, utilizados nas próximas etapas. Colônias com características diversas, quanto à cor, tamanho e tempo de crescimento foram purificadas por inoculações sucessivas em placas com meio LM. Após a obtenção de colônias homogêneas e com características persistentes, os isolados foram transferidos para tubos contendo meio LM inclinado, incubados por 4 a 7 dias a 28°C e armazenados sob refrigeração.

## **2.2 Quantificação da produção de auxinas equivalentes ao Ácido Indol-acético (AIA)**

Os isolados foram avaliados quanto à capacidade de produzir ácido indol-acético em meio de cultura sem e com adição de triptofano, conforme metodologia descrita por Asghar et al., 2002, adaptada (SILVA et al., 2020).

Para isso, cada um dos isolados foi inoculado em frascos de Erlenmeyer de 200 mL, contendo 80 mL de caldo LM com adição de 50 mg.L<sup>-1</sup> de triptofano. Os isolados foram incubados sob temperatura de 28°C e agitação de 120 rpm por 72 horas.

Após o período de incubação, 2 mL do caldo foram transferidos para tubos de micro centrífuga, do tipo eppendorf e centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos. Foi retirada uma alíquota de 1,5 mL do sobrenadante de cada um dos isolados, a qual foi adicionado 1 mL de solução de Salkowski (20 g.L<sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O e 421 mL.L<sup>-1</sup> de HClO<sub>4</sub> 35%) e então manteve-se protegida da luz por 30 minutos, tempo necessário para que ocorra a reação de oxidação.

Os isolados que apresentaram mudança na coloração do meio para rosa, são considerados produtores de AIA.

Os isolados bacterianos que apresentaram capacidade de produzir AIA foram então submetidos a uma avaliação quantitativa em meio de cultura, com ou sem adição de triptofano. Para isso, os isolados foram submetidos aos mesmos procedimentos já citados. Porém, após serem mantidos protegidos da

luminosidade, foi realizada a quantificação de AIA, utilizando-se espectrofotômetro Biospectro (modelo SP220), sob um comprimento de onda de 530 nm.

A concentração de AIA das amostras foi calculada comparando-se as leituras com uma curva padrão que foi calculada com concentrações conhecidas de AIA sintético (0,5, 3, 9, 13, 17 e 25  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey, 5%).

### **2.3 Produção de ácido cianídrico**

Para a avaliação quanto a produção de HCN (sigla para o termo “*hydrogen cyanide*” em inglês, ou ácido cianídrico), os isolados foram inoculados em meio King B suplementado com 0,4% (p/v) de glicina. Um disco de papel filtro Whatman, de formato circular, com as mesmas dimensões da tampa de uma placa de Petri foi saturado com solução de ácido pícrico alcalino ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 2% em ácido pícrico a 0,5%) e então colocado nas tampas das placas de Petri inoculadas com os isolados. O crescimento dos isolados foi monitorado por 72 horas, onde se observou a capacidade de produzir HCN. Por se tratar de um gás, a reação causa a mudança na coloração do papel filtro de amarela para marrom avermelhada, indicando que há a produção de HCN pelo isolado (MILLAR; HIGGINS, 1970).

### **2.4 Produção da enzima ACC Desaminase**

Para estimativa da produção de aminociclopropano carboxilato (ACC) desaminase foi utilizado o método descrito por Gupta e Pandey (2019), onde a capacidade de crescimento dos isolados, em presença de ACC como única fonte de nitrogênio foi verificada em placas.

Para isso, foi utilizado um meio mínimo, com adição de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) como única fonte de N (GLICK, 1995), com a seguinte composição: 4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_4$ , 6 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 70 mg de  $\text{ZnSO}_4$ , 1 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg de  $\text{CuSO}_4$ , 2 g de glicose, 10 mg de  $\text{MoO}_3$ , 2 g de ácido glucônico, 2 g de ácido

cítrico, 3 mM de ACC, 15 g de ágar e 1 L de água destilada. Foram feitas quatro repetições para cada isolado. As placas foram incubadas por 72 horas a 28°C e os isolados que cresceram, reinoculados em novas placas com o mesmo meio de cultura e incubadas novamente, sendo considerados produtores de ACC desaminase, todos os isolados que foram capazes de crescer no meio de cultura ao final do período.

## **2.5 Avaliação da capacidade dos isolados em tolerar diferentes temperaturas, faixas de pH, salinidade e déficit hídrico**

Os isolados que apresentaram características de interesse como promotores de crescimento de plantas foram testados quanto a capacidade de crescer em condições de estresse, como diferentes temperaturas, pH, níveis de salinidade e de déficit hídrico em meio de cultura.

### **2.5.1 Tolerância a diferentes temperaturas**

Para avaliar a capacidade de crescer em diferentes temperaturas, os isolados foram submetidos a crescimento em caldo LM para a avaliação quanto a capacidade de crescer na temperatura considerada controle de 28°C e a cada 4°C tanto para mais quanto para menos.

### **2.5.2 Tolerância a diferentes faixas de pH**

Para avaliar a tolerância a diferentes faixas de pH, foram submetidos a crescimento a cada 0,5, a partir do pH considerado controle (6,5), tanto para mais, quanto para menos. O caldo LM foi utilizado para crescimento dos isolados e para ajuste de pH à faixa desejada, foi utilizado NaOH e HCl, ambos 1M.

### **2.5.3 Tolerância à salinidade**

Para tolerância a salinidade, foi adicionado NaCl ao caldo LM em intervalos de 0,1M. O caldo sem adição de NaCl foi considerado o tratamento controle.

#### 2.5.4 Tolerância a déficit hídrico

Para a tolerância à déficit hídrico, foi adicionado ao caldo LM, concentrações conhecidas de PEG6000, para que obtivesse as condições de potencial hídrico de -0,15, -0,49, -0,73 e -1,2 MPa (ASHRY et al., 2021; KAUFMANN; MICHEL, 1973). O caldo sem adição de PEG6000 foi utilizado como tratamento controle.

#### **2.6 Efeito da inoculação sobre a germinação de acácia-negra (*Acacia mearnsii*) e capim-sudão (*Sorghum sudanense*) em diferentes temperaturas, faixas de pH, salinidade e déficit hídrico**

Para avaliação do efeito da inoculação dos isolados sob a germinação de acácia-negra e capim-sudão em condições de estresse, foram realizados testes de germinação em placas de petri.

O inóculo foi preparado em frascos de vidro, contendo 15 mL meio de cultura LM líquido, incubados por 72 horas em incubador orbital, a 28°C e 120 rpm.

As sementes de acácia-negra foram gentilmente cedidas pelo viveiro da empresa Tanac SA, sendo que já haviam passado pelo processo de quebra de dormência (imersão em água à 80°C, por uma hora). As sementes de capim-sudão foram doadas pelo IRGA (Instituto Riograndense do Arroz). Ambas foram desinfestadas (30 segundos em álcool 70%, 2 minutos em hipoclorito de sódio 2% e cinco lavagens sucessivas em água destilada estéril) e colocadas em placas de petri com papel filtro previamente esterilizadas. Foram realizadas três repetições com 20 sementes por repetição (considerando cada placa, uma das repetições). Cada placa recebeu 3 mL de água destilada esterilizada, e foi inoculado 1 mL do inóculo, com concentração média de  $8,9 \cdot 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Além disso, foi conduzido um tratamento controle com adição de 1 mL de meio de cultura LM esterilizado.

Para avaliação da germinação, foram utilizados como parâmetros o percentual de germinação, a velocidade de germinação acumulada (VGA) e o comprimento da radícula. A VGA foi calculada da seguinte maneira:

$$VGA = N_1/1 + N_2/2 + N_3/3 + \dots N_n/n$$

Onde  $N_1$ ,  $N_2$ ,  $N_3$  e  $N_n$  são os números acumulados de sementes germinadas ao longo dos dias 1, 2, 3 e n dias (CHIAPUSIO et al., 1997).

Todos os resultados foram submetidos à avaliação de homoscedasticidade e normalidade, pelos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Quando atendido os pressupostos, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de média de Tukey (5%) em uma análise bifatorial, onde o fator 1 é a inoculação (21N, 33N, 52K, 77J, 81L e controle) e o fator 2 o estresse abiótico (dois níveis de estresse e o controle, para cada um dos quatro tipos de estresse). Sendo o modelo estatístico descrito abaixo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + e_{(ij)k}$$

Onde:  $\mu$  = média geral do experimento; A = Inoculação ( $i = 1, 2, 3, 4, 5, 6$ ); B = Estresse abiótico ( $j = 1, 2, 3$ ); repetições ( $k = 1, 2, 3$ ) e, e = erro experimental.

## 2.7 Caracterização genotípica

Os isolados bacterianos que apresentaram características de interesse foram destinados à caracterização genotípica. Para isso, o DNA foi extraído utilizando-se o Kit Wizard® (Promega Corporation), conforme instruções do fabricante. Após extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop ThermoScientific modelo 2000) com a determinação da absorbância a 260 nm e 280 nm. A concentração do DNA foi ajustada no intervalo 0-50 ng/ $\mu$ L utilizando-se água ultrapura.

A região que codifica a porção 16S rRNA dos isolados 21N e 33N foi amplificada com o kit para PCR (sigla para “*Polymerase Chain Reaction*”, em português Reação da Cadeia Polimerase) GoTaq® Master Mix (Promega Corporation), usando-se os oligonucleotídeos 8F (AGAGTTTGATCCTTGGCTCAG) e 1492R (GCYTACCTTGTTACGACTT) (STROSCHEIN et al., 2011). Durante a reação, os ciclos empregados foram: um ciclo inicial a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos

que intercalam desnaturação a 94°C por 15 segundos, 30 segundos de anelamento a 55°C, e extensão a 68°C por 1 minuto e um ciclo de extensão final a 68°C por 8 minutos. Para os isolados 52K, 77J e 81L, foi amplificada a região *gyrB* (YAMAMOTO; HARAYAMA, 1995). Foram usados os iniciadores *gyrB1* e *gyrB2R*. O mix de PCR continha 2,0 µL de DNA genômico, 0,60 µL de cada iniciador (1 µM), 4,30 µL de água ultrapura estéril, 7,50 µL de GoTaq® Colorless Master Mix. O programa de amplificação consistiu em 94 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 59 °C por 45 segundos e 72 °C por 45 segundos, com extensão final de 72 °C por 7 minutos.

Os produtos da PCR para os genes *gyrB* e 16S foram purificados utilizando o ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System (Promega, Madison, EUA) e foram sequenciados pelo método de eletroforese por capilaridade, em sequenciador modelo AB-3500 (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram editadas no programa BioEdit 7.0.5.3 e as sequências de consenso foram analisadas por meio do software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 7) (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), construído com o algoritmo ClustalW e comparadas no banco de dados NCBI GenBank. A similaridade da sequência de nucleotídeos do isolado foi calculada utilizando-se a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 Isolamento de bactérias rizosféricas**

Foram obtidos 106 isolados bacterianos, sendo 54 isolados do solo proveniente do plantio localizada no município de Jaguarão e 52 isolados do solo de Cristal. Apenas 32 foram capazes de crescer em meio de cultivo LM após sucessivos reisolamentos, sendo estas selecionadas para a realização dos demais testes (Apêndice 1).

#### **3.2 Caracterização dos isolados quanto à produção de AIA, produção de ACC desaminase e produção de HCN**

Quando os isolados bacterianos foram avaliados qualitativamente quanto à capacidade de produzir AIA em meio de cultura com triptofano, 14 foram positivos para o teste (Tabela 1). Estes 14 e a estirpe SEMIA6163 foram então avaliados quanto à produção de AIA sem e com adição de triptofano.

Quando avaliados quanto à produção de AIA sem adição de triptofano, todos apresentaram uma baixa produção (Tabela 1). A SEMIA6163 apresentou a menor produção de AIA ( $0,41 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), e entre os isolados, os valores variaram entre  $0,66$  (isolado 79J) a  $1,32 \mu\text{g mL}^{-1}$  (isolado 53K).

Quando avaliados com adição de triptofano ao meio, houve um aumento na produção de AIA, que variou de  $23,3$  (isolado 78J) a  $167,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  (isolado 98L). A SEMIA6163 não foi tão responsiva quanto os isolados à adição de triptofano ao meio, tendo uma produção de  $1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 1).

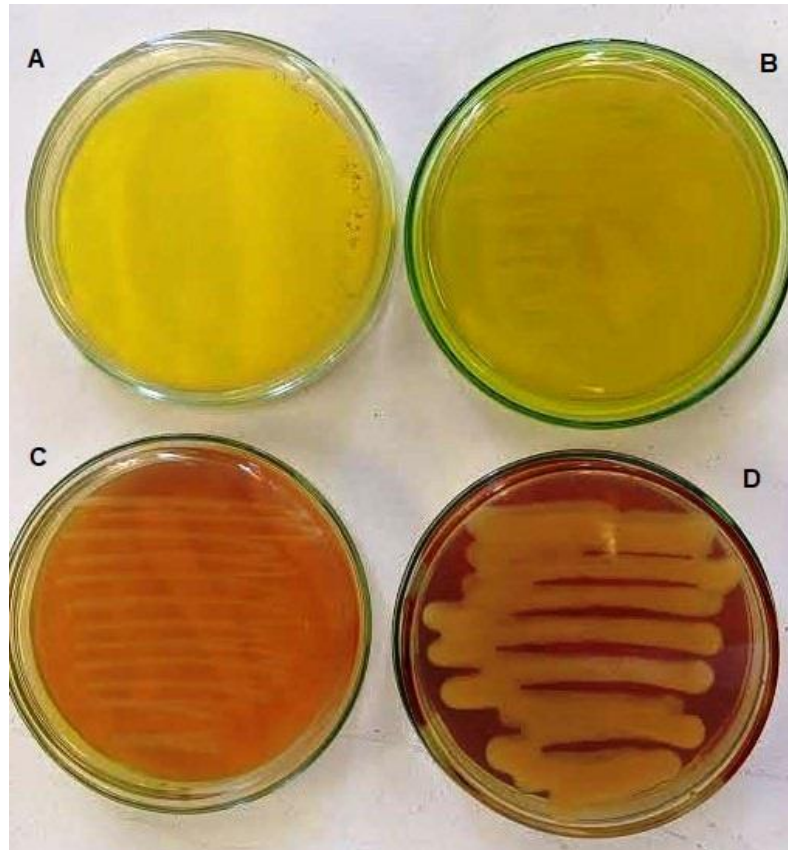
**Tabela 1** – Avaliação da produção de auxinas semelhantes ao AIA em meio de cultura sem adição de triptofano (AIA ST) e com adição de triptofano (AIA CT), e da produção de ACC desaminase e de HCN por bactérias isoladas do microbioma radicular de plantas de acácia-negra.

Isolado	AIA ST	AIA CT	ACC	HCN
	µg mL <sup>-1</sup>			
10N	0,84 ef <sup>1</sup>	91,46 de	+	+
21N	1,23 b	149,41 b	+	-
24N	1,07 c	62,53 g	-	-
33N	1,10 c	33,22 hi	+	-
52K	0,83 f	59,55 g	+	+
53K	1,32 a	67,76 g	-	-
77J	0,70 g	66,33 g	+	+
78J	0,73 g	23,38 i	-	+
79J	0,66 g	107,97 c	+	-
80N	0,84 ef	98,88 cd	+	+
86L	0,82 f	85,17 ef	-	-
90L	0,91 de	37,60 h	-	-
91L	0,88 ef	167,42 a	+	-
98L	0,96 d	77,89 f	-	-
SEMIA6163	0,41 h	1,16 j	-	-

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey, ao nível de probabilidade de erro de 1%.

Os 14 isolados e a SEMIA6163 foram testados quanto à produção de ACC desaminase, sendo que os isolados 10N, 21N, 33N, 52K, 77J, 79J, 80n e 91L foram capazes de crescer repetidamente em meio de cultura contendo ACC como única fonte de nitrogênio (Tabela 1). Quanto a produção de HCN em meio de cultura, apenas os isolados 10N, 52K, 77J, 78J, 80N apresentaram esta característica (Tabela 1, Figura 1).





**Figura 1** – Produção de HCN por bactérias isoladas do microbioma radicular de acácia-negra. A – Meio de cultura não inoculado. B – SEMIA 6163, não produtora de HCN. C – Isolado 80N, produtor de HCN. D – Isolado 52K, produtor de HCN.

### **3.3 Avaliação do crescimento de rizobactérias do microbioma radicular de acácia-negra em diferentes condições de estresse abiótico**

Os isolados 21N, 33N, 52K, 77J e 81L foram selecionados para serem testados nos demais testes de promoção de crescimento, devido suas características como potenciais promotores de crescimento de planta (Tabela 2). Foram selecionados dois isolados capazes de produzir AIA e ACC desaminase e que não produzem HCN (21N e 33N); dois isolados que produzem AIA, ACC desaminase e HCN (52K e 77J); e um que produz apenas HCN (81L).

**Tabela 2** – Isolados bacterianos provenientes do microbioma radicular de acácia-negra, selecionados para avaliação com promotores de crescimento de plantas.

Isolado	AIA	ACC	HCN
21N	+	+	-
33N	+	+	-
52K	+	+	+
77J	+	+	+
81L	-	-	+

Os isolados foram capazes de suportar diferentes faixas de estresse abiótico (Tabela 3). Quanto a salinidade, os níveis variaram de 0,6 a 1 M de NaCl em meio de cultura, sendo que o isolado 77J foi o mais tolerante, crescendo em meio de cultura com adição de 1M de NaCl (58,44 g L<sup>-1</sup> de meio de cultura). A temperatura suportada pelos isolados foi de 12 até 44°C, sendo que os isolados 52K, 77J e 81L cresceram em temperatura de 12°C e os isolados 21N, 33N e 81L, foram capazes de crescer em até 44°C. Em relação ao pH, nenhum isolado foi capaz de crescer abaixo do pH 5, mas demonstraram tolerar níveis mais altos de pH, como os isolados 33N, 52K e 77J, que cresceram em meio de cultura com pH 11. Em relação ao estresse hídrico, os isolados foram capazes de suportar de -0,73 a -1,2 MPa, sendo que o mais tolerante foi o isolado 33N, que suportou um potencial hídrico de -1,2 MPa.

**Tabela 3** – Nível de tolerância dos isolados a diferentes condições de estresse abiótico

Isolado	NaCl M	Temperatura °C	pH	Potencial hídrico MPa
21N	0,6	20 a 44	5 a 9	- 0,73
33N	0,6	20 a 44	5 a 11	- 1,2
52K	0,8	12 a 36	5 a 11	- 0,73
77J	1	12 a 36	5 a 11	- 0,73
81L	0,6	12 a 44	5 a 9	- 0,73

### **3.4 Avaliação da capacidade de germinação de sementes de acácia-negra e capim-sudão submetidas diferentes condições de temperatura, pH, salinidade e estresse hídrico e inoculadas com bactérias do microbioma radicular de acácia-negra**

#### **3.4.1 Germinação de acácia-negra**

Os resultados do efeito da inoculação dos isolados sobre a germinação de sementes de acácia-negra em condições de estresse abiótico estão apresentados nas tabelas 4 a 7. Nas diferentes condições de pH, não houve diferença nos tratamentos inoculados e nos diferentes pH, tanto no percentual de germinação com média 84%, quanto na VGA com valor médio de 23% (Tabela 4). No comprimento radicular houve interação entre o inoculo e o pH. Em pH 5,0, o tratamento inoculado com o isolado 81L apresentou maior comprimento de radícula quando comparado com o controle sem inoculação. No tratamento inoculado com 33N em pH 5,0, o comprimento radicular foi menor quando comparado aos demais valores de pH (6,5 e 9,0).

Não houve interação no efeito da inoculação e do potencial hídrico em nenhum dos parâmetros avaliados, mas foi possível observar efeito principal no fator potencial hídrico (diferenças entre as médias finais de potencial hídrico, independente da inoculação) (Tabela 5). Principalmente no menor potencial (-0,49 MPa), que diminuiu germinação, VGA e comprimento de radícula, independentemente do tratamento. Essa redução também foi observada no potencial hídrico de -0,15 Mpa na germinação e VGA.

Os níveis de salinidade (NaCl 0,1 e 0,2 M) afetaram negativamente o percentual de germinação e a VGA, independente da inoculação (Tabela 6). No comprimento de radícula, houve interação entre os fatores, onde observou-se que o controle e a inoculação com 21N, 52K e 81L diminuíram o crescimento radicular apenas com 0,2 M de NaCl. Já, os inoculados com os isolados 33N e 77J diminuíram o crescimento radicular a partir de 0,1 M de NaCl, sendo esse efeito mais expressivo com 0,2 M de NaCl. No ambiente com 0,1 M de NaCl, a inoculação com 77J levou a um menor comprimento de radícula em comparação ao controle.

**Tabela 4** – Efeito da inoculação dos isolados bacterianos estudados na germinação de sementes de acácia-negra em diferentes condições de pH

Tratamento	pH			Média
	5,0	6,5	9,0	
<b>Germinação</b>				
----- % -----				
21N	90	88	85	88
33N	87	90	87	88
52K	85	83	80	83
77J	83	85	77	82
81L	82	73	83	79
Controle	85	85	92	87
<b>Média</b>	<b>85</b>	<b>84</b>	<b>84</b>	<b>84</b>
<b>Velocidade de germinação acumulada</b>				
21N	28	25	22	25
33N	24	25	24	24
52K	21	21	21	21
77J	20	24	22	22
81L	21	21	26	23
Controle	25	25	25	25
<b>Média</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>23</b>	<b>23</b>
<b>Comprimento de raiz</b>				
----- mm -----				
21N	35 ab <sup>1</sup>	34 ab	35	35
33N	29 Bb	40 Aa	39 A	36
52K	29 b	28 b	33	30
77J	36 ab	40 a	34	37
81L	44 a	38 ab	37	40
Controle	30 b	31 ab	33	31
<b>Média</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>35</b>	<b>35</b>

<sup>1</sup> Análise bifatorial: Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma coluna (fator inoculação) e médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma linha (fator estresse), não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey, ao nível de probabilidade de erro de 5%. A ausência de letras indica que não houve diferença estatística.

**Tabela 5** – Efeito da inoculação dos isolados bacterianos estudados na germinação de sementes de acácia-negra em diferentes condições de potencial hídrico

Tratamento	MPa			Média
	0	-0,15	-0,49	
<b>Germinação</b>				
----- % -----				
21N	88	47	0	45
33N	90	42	5	46
52K	83	35	7	42
77J	85	40	0	42
81L	73	43	0	39
Controle	85	33	0	39
Média	84 A <sup>1</sup>	40 B	2 C	42
<b>Velocidade de germinação acumulada</b>				
21N	25	12	0	12
33N	25	10	1	12
52K	21	9	2	11
77J	24	9	0	11
81L	21	9	0	10
Controle	25	9	0	11
Média	24 A	10 B	1 C	11
<b>Comprimento de raiz</b>				
----- mm -----				
21N	34	35	0	23
33N	40	37	10	29
52K	28	36	12	25
77J	40	32	0	24
81L	38	34	0	24
Controle	31	35	0	22
Média	35 A	35 A	4 B	25

<sup>1</sup> Análise bifatorial: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma linha (fator estresse), não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey, ao nível de probabilidade de erro de 5%. A ausência de letras indica que não houve diferença estatística.

**Tabela 6** – Efeito da inoculação dos isolados bacterianos estudados na germinação de sementes de acácia-negra em diferentes condições de salinidade

Tratamento	M			Média
	0	0,1	0,2	
<b>Germinação</b>				
----- % -----				
21N	88	88	37	71 a <sup>1</sup>
33N	90	72	22	61 ab
52K	83	62	23	56 ab
77J	85	78	27	63 ab
81L	73	60	25	53 b
Controle	85	78	23	62 ab
Média	84 A	73 B	26 C	61
<b>Velocidade de germinação acumulada</b>				
21N	25	21	9	19 a
33N	25	16	6	16 ab
52K	21	15	5	14 b
77J	24	17	7	16 ab
81L	21	13	5	13 b
Controle	25	15	7	16 ab
Média	24 A	16 B	7 C	16
<b>Comprimento de raiz</b>				
----- mm -----				
21N	34 A	32 Aab	7 B	24
33N	40 A	28 Bab	5 C	25
52K	28 A	28 Aab	7 B	21
77J	40 A	21 Bb	8 C	23
81L	38 A	28 Aab	9 B	25
Controle	31 A	33 Aa	8 B	24
Média	35	28	7	24

<sup>1</sup> Análise bifatorial: Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma coluna (fator inoculação) e médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma linha (fator estresse), não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey, ao nível de probabilidade de erro de 5%. A ausência de letras indica que não houve diferença estatística.

O aumento da temperatura influenciou negativamente, todos os parâmetros de germinação, independentemente da inoculação (Tabela 7). O percentual de germinação só foi afetado quando a temperatura chegou à 40°C, diferente da VGA e do comprimento da radícula, que tiveram efeito negativo já à 35°C. Não houve diferença da inoculação no efeito principal, em nenhum dos parâmetros de germinação.

**Tabela 7** – Efeito da inoculação dos isolados bacterianos estudados na germinação de sementes de acácia-negra em diferentes condições de temperatura

Tratamento	°C			Média
	25	35	40	
<b>Germinação</b>				
----- % -----				
21N	88	77	5	57
33N	90	78	13	61
52K	83	80	10	58
77J	85	83	13	61
81L	73	77	7	52
Controle	85	77	17	59
Média	84 A <sup>1</sup>	79 A	11 B	58
<b>Velocidade de germinação acumulada</b>				
21N	25	14	1	13
33N	25	12	3	13
52K	21	16	1	13
77J	24	16	2	14
81L	21	14	1	12
Controle	25	12	2	13
Média	24 A	14 B	2 C	13
<b>Comprimento de raiz</b>				
----- mm -----				
21N	34	8	1	15
33N	40	6	2	16
52K	28	8	3	13
77J	40	7	2	17
81L	38	7	1	15
Controle	31	7	1	13
Média	35 A	7 B	2 C	15

<sup>1</sup> Análise bifatorial: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma linha (fator estresse), não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey, ao nível de probabilidade de erro de 5%. A ausência de letras indica que não houve diferença estatística.

### 3.4.2 Germinação de capim-sudão

Os efeitos da inoculação em diferentes níveis de pH na germinação de sementes de capim-sudão estão apresentados na tabela 8. Não houve diferença da inoculação em relação ao controle em nenhum dos parâmetros de germinação. Já os diferentes níveis de pH afetaram a germinação. Quando o pH foi alterado para 5,0 e 9,0, houve uma redução, tanto no percentual de germinação, quanto na VGA. Já o comprimento da radícula foi maior, tanto em pH 5,0, quanto em pH 9,0.

**Tabela 8** – Efeito da inoculação dos isolados bacterianos estudados na germinação de sementes de capim-sudão em diferentes condições de pH

Tratamento	pH			Média
	5,0	6,5	9,0	
<b>Germinação</b>				
----- % -----				
21N	47	60	45	51 a <sup>1</sup>
33N	28	55	38	41 ab
52K	38	38	20	32 b
77J	28	20	33	27 b
81L	28	43	38	37 ab
Controle	30	50	27	36 ab
Média	33 B	44 A	34 B	37
<b>Velocidade de germinação acumulada</b>				
21N	11	14	11	12
33N	7	12	9	9
52K	7	9	5	7
77J	7	5	7	6
81L	7	10	9	9
Controle	7	11	6	8
Média	7 B	10 A	8 AB	9
<b>Comprimento de raiz</b>				
----- mm -----				
21N	84	55	95	78
33N	107	50	85	81
52K	87	59	104	83
77J	68	44	97	70
81L	113	63	93	90
Controle	90	54	89	78
Média	91 A	54 B	94 A	80

<sup>1</sup> Análise bifatorial: Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma coluna (fator inoculação) e médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma linha (fator estresse), não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey, ao nível de probabilidade de erro de 5%. A ausência de letras indica que não houve diferença estatística.

Houve interação entre os fatores na avaliação da germinação sob inoculação em diferentes potenciais hídricos (no percentual de germinação e na VGA) (Tabela 9). O percentual de germinação foi reduzido em -0,15 Mpa e não houve germinação em -0,49 MPa no tratamento controle. Na inoculação com 21N, 33N e 52K, o percentual de germinação foi reduzido já em -0,15 MPa e manteve-se em -0,49



MPa. Quando inoculado com 77J e 81L, o percentual de germinação só foi reduzido em -0,49MPa. Apesar disso, o percentual de germinação do tratamento inoculado com 77J, foi menor quando comparado ao controle em 0 MPa. O tratamento controle e o inoculado com 81L causaram uma redução na VGA em -0,15 MPa, chegando a zero em -0,49 MPa. A VGA nos tratamentos inoculados com 21N, 33N e 52K foi reduzida em -0,15 MPa em relação a condição em estresse, o mesmo ocorreu em -0,49 MPa. Quanto ao efeito da inoculação em relação ao controle, o tratamento inoculado com 77J apresentou menor VGA em relação ao controle em 0 MPa. Já em -0,15 MPa, o tratamento inoculado com 21N causou uma redução na VGA em relação ao controle, enquanto o 81L causou um aumento na VGA. No comprimento da radícula, houve efeito principal nos níveis de potencial hídrico, sendo que quanto menor o potencial hídrico, menor o comprimento da radícula.

Sob diferentes níveis de salinidade (NaCl), houve interação entre fatores no percentual de germinação e na VGA (Tabela 10). No tratamento controle e na inoculação com 81L, houve uma redução do percentual de germinação em 0,2 M de NaCl. Já quando inoculados com 21N e 33N, houve uma redução no percentual de germinação com 0,1 M de NaCl. A inoculação com 77J reduziu o percentual de germinação em relação ao controle, tanto em 0,1 M, quanto em 0,2 M de NaCl. A VGA foi afetada pela salinidade independente do nível, sendo mais evidente no tratamento controle. A inoculação com 77J reduziu a VGA em relação ao tratamento controle em 0 e 0,1 M de NaCl. A salinidade reduziu o comprimento de radícula em 0,2 M de NaCl e a inoculação não apresentou efeito sob esse atributo.

**Tabela 9** – Efeito da inoculação dos isolados bacterianos estudados na germinação de sementes de capim-sudão em diferentes condições de potencial hídrico

Tratamento	MPa			Média
	0	-0,15	-0,49	
<b>Germinação</b>				
----- % -----				
21N	60 Aa <sup>1</sup>	8 Bb	10 B	26
33N	55 Aab	13 Bab	5 B	24
52K	38 Ab	10 Bb	3 B	17
77J	20 Ac	18 Aab	3 B	14
81L	43 Aab	30 Aa	0 B	24
Controle	50 Aab	25 Bab	0 C	25
Média	44	18	4	22
<b>Velocidade de germinação acumulada</b>				
21N	14 Aa	1 Bc	2 B	6
33N	12 Aab	3 Babc	1 B	5
52K	9 Ab	2 Bbc	1 B	4
77J	5 Ac	3 ABabc	1 B	3
81L	10 Ab	6 Ba	0 C	5
Controle	11 Aab	5 Bb	0 C	6
Média	10	3	1	5
<b>Comprimento de raiz</b>				
----- mm -----				
21N	55	14	5	25
33N	50	26	3	27
52K	59	21	2	27
77J	44	31	2	26
81L	63	29	0	31
Controle	54	25	0	26
Média	54 A	24 B	2 C	27

<sup>1</sup> Análise bifatorial: Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma coluna (fator inoculação) e médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma linha (fator estresse), não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey, ao nível de probabilidade de erro de 5%. A ausência de letras indica que não houve diferença estatística.

**Tabela 10** – Efeito da inoculação dos isolados bacterianos estudados na germinação de sementes de capim-sudão em diferentes condições de salinidade

Tratamento	M			Média
	0	0,1	0,2	
<b>Germinação</b>				
----- % -----				
21N	60 Aa <sup>1</sup>	23 Bab	7 B	30
33N	55 Aa	23 Bab	7 B	28
52K	38 Aab	23 ABab	5 B	22
77J	20 b	7 b	7	11
81L	43 Aa	28 Aab	8 B	27
Controle	50 Aa	40 Aa	5 B	32
Média	44	24	6	25
<b>Velocidade de germinação acumulada</b>				
21N	14 Aa	4 Bab	1 B	6
33N	12 Aab	4 Bab	1 B	6
52K	9 Ab	4 Bab	1 B	5
77J	5 Ac	1 Bb	1 B	2
81L	10 Aab	4 Bab	1 B	5
Controle	11 Aab	7 Ba	1 C	6
Média	10	4	1	5
<b>Comprimento de raiz</b>				
----- mm -----				
21N	55	38	10	34
33N	50	52	5	36
52K	59	59	9	42
77J	44	30	13	29
81L	63	63	15	47
Controle	54	48	5	36
Média	54 A	48 A	10 B	37

<sup>1</sup> Análise bifatorial: Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma coluna (fator inoculação) e médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma linha (fator estresse), não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey, ao nível de probabilidade de erro de 5%. A ausência de letras indica que não houve diferença estatística.

Houve interação entre os fatores em todos os atributos de germinação, nas diferentes temperaturas (Tabela 11). O tratamento controle e os inoculados com 33N e 81L tiveram o percentual de germinação reduzidos em 35°C, assim como em 40°C. A inoculação com 21N reduziu a germinação em 35°C e em 40°C. A inoculação com 52K manteve o percentual de germinação em 35°C, sendo reduzido em 40°C. A inoculação com 77J aumentou o percentual de germinação em 35°C.

Já em 25°C a inoculação com 77J reduziu o percentual de germinação em relação ao controle. A VGA do tratamento controle e do inoculado com 81L foi reduzida em 35°C, já os tratamentos inoculados com 21N e 52K foi reduzida apenas em 40°C. A VGA do tratamento inoculado com 77J foi aumentada em 35°C e reduzida novamente em 40°C. A inoculação com 77J em 25°C reduziu a VGA em relação ao tratamento controle. Aos 35°C o comprimento da radícula foi maior em todos os tratamentos quando comparado aos 25°C e quando submetidas à 40°C, houve uma redução no comprimento em relação às outras temperaturas. O tratamento inoculado com 81L teve maior comprimento de radícula em comparação com o tratamento controle em 35°C.

### **3.5 Caracterização genotípica**

As sequências do gene 16S dos isolados 21N e 33N apresentaram 100% de cobertura e 100% de identidade com sequências da mesma região da espécie *Bacillus megaterium* (números de acesso MT525296.1 e MT487648.1, respectivamente, depositadas no banco de dados de nucleotídeos - GenBank (NCBI)). As sequências do gene *gyrB* dos isolados 52K, 77K e 81L apresentaram similaridade com sequências da mesma região de várias espécies do gênero *Pseudomonas*.

**Tabela 11** – Efeito da inoculação dos isolados bacterianos estudados na germinação de sementes de capim-sudão em diferentes condições de temperatura

Tratamento	°C			Média
	25	35	40	
<b>Germinação</b>				
----- % -----				
21N	60 Aa <sup>1</sup>	37 Bab	15 C	37
33N	55 Aa	30 Bab	22 B	36
52K	38 Aab	32 Aab	10 B	27
77J	20 Bb	43 Aa	8 B	24
81L	43 Aab	17 Bb	5 B	22
Controle	50 Aa	22 Bab	18 B	30
Média	44	30	13	29
<b>Velocidade de germinação acumulada</b>				
21N	14 Aa	9 Aab	3 B	9
33N	12 Aa	8 ABab	4 B	8
52K	9 Aab	8 Aab	2 B	7
77J	5 Bb	10 Aa	2 B	6
81L	10 Aa	5 Bb	1B	5
Controle	11 Aa	6 Bab	4 B	7
Média	10	8	3	7
<b>Comprimento de raiz</b>				
----- mm -----				
21N	55 B	103 Ab	6 C	55
33N	50 B	85 Ab	11 C	49
52K	59 B	104 Ab	7 C	57
77J	44 B	116 Ab	8 C	56
81L	63 B	167 Aa	15 C	82
Controle	54 B	92 Ab	5 C	51
Média	54	111	9	58

<sup>1</sup> Análise bifatorial: Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma coluna (fator inoculação) e médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma linha (fator estresse), não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey, ao nível de probabilidade de erro de 5%. A ausência de letras indica que não houve diferença estatística.

## 4 DISCUSSÃO

Dos 32 isolados bacterianos estudados neste trabalho, 14 foram capazes de produzir AIA, sendo que a adição de triptofano aumentou a produção em todos os isolados. O AIA é um dos principais fitormônios responsáveis pelo enraizamento de plantas e alongamento radicular, emissão de raízes secundárias e pelos radiculares (GROBELAK et al., 2015). Tanto é produzido de forma endógena pela planta, quanto pode ser produzido de forma exógena por microrganismos presentes no solo, principalmente na zona radicular das plantas e também por microrganismos endofíticos.

A produção de AIA é feita por diversas rotas metabólicas, sendo a do triptofano, a mais comum em bactérias rizosféricas (HASSAN; BANO, 2015; SPAEPEN et al., 2007). A estirpe SEMIA 6163 produziu 0,4 e 1,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (sem e com adição de triptofano, respectivamente), que foram valores muito inferiores comparando-se com a produção obtida com os demais isolados, principalmente no meio com adição de triptofano. Valores similares também foram observados em estudo que quantificou a produção de AIA com adição de triptofano por rizóbios de acácia-negra (1,2 a 3,3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), os quais foram avaliados na germinação de sementes de alface (SCHLINDWEIN et al., 2008).

Os demais isolados produziram uma baixa quantidade de AIA sem adição de triptofano. Porém, quando adicionado triptofano, as quantidades de AIA aumentaram de 32 a 190 vezes em relação ao meio sem triptofano. Segundo Spaepen et al. (2007), a produção de AIA por vias independentes do triptofano são em menores quantidades do que na via dependente. Bal et al. (2013), em estudo avaliando a produção de AIA por bactérias isoladas da região rizosférica do arroz, também observaram um aumento considerável (na ordem de 100-200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) na produção de AIA quando adicionado triptofano ao meio de cultura, e quando inoculados em plantas de arroz, pode-se observar uma correlação positiva entre a produção de AIA e o comprimento radicular em condições controladas.

O AIA, assim como outros fitormônios, é capaz de estimular o crescimento de plantas em uma pequena faixa de concentração, que pode variar entre plantas,

sendo que a partir de uma certa concentração é potencialmente tóxico (BISWAS et al., 2000). A concentração de triptofano presente no solo da rizosfera é bem menor do que a adicionada a meios de cultura como do presente trabalho, pois é dependente da exsudação pelas raízes, o que faz com que a produção de AIA ocorra numa concentração bem menor do que se obtém *in vitro*, reduzindo o potencial efeito tóxico para a planta (KRAVCHENKO et al., 2004; OLANREWAJU et al., 2017).

O cultivo de acácia-negra, além de ser feito em monocultura, pode também ser conduzido em sistemas mistos, como em consórcio com culturas agrícolas ou em sistemas silvipastoris. Nesse contexto, o capim-sudão foi utilizado como modelo para avaliação da inoculação com isolados de acácia-negra, em condições de estresse. Os sistemas mistos podem ser uma alternativa viável para gerar renda extra (como a produção pecuária, por exemplo) dentro de um curto período, reduzindo os custos gerais de produção de produtos florestais (MONTEIRO et al., 2019). Além disso, são sistemas mais sustentáveis, visto que a produtividade é resultado da interação entre componentes florestais, agrícolas e pecuários na mesma área e ao mesmo tempo.

Considerando a utilização de sistemas silvipastoris, a implantação de pastagens adequadas ao clima e que sejam uma boa fonte nutricional para o gado é de grande importância. O capim-sudão vem ganhando espaço no cultivo de pastagens para alimentação animal, devido a facilidade de cultivo, rápido estabelecimento e crescimento, alto valor nutricional e alta oferta de forragem (LIMA et al., 2017). Porém, a exposição a altas temperaturas e baixa pluviosidade, características comuns no verão do sul do Brasil, podem afetar o seu potencial produtivo (SIMILI et al., 2011). Por esse motivo, o uso de estratégias como a utilização de inoculantes microbianos, que apresentam potencial para minimizar esses impactos, são uma boa alternativa. Dentre os isolados bacterianos obtidos da região rizosférica de acácia-negra, o isolado 81L se destacou em relação aos demais nas avaliações de germinação sob inoculação em condições de estresse, pois aumentou o comprimento de radícula de acácia-negra em pH 5 e em capim-sudão aumentou a VGA em estresse hídrico (-0,15 MPa) e a VGA e comprimento de radícula em 35°C. O isolado 81L apresentou capacidade de produzir apenas

HCN, mas não foi capaz de produzir AIA e ACC desaminase. Isso sugere, que os mecanismos utilizados pelo isolado para promover o crescimento de plantas e tolerar condições de estresse sejam outros.

O HCN é relatado tanto como supressor de patógenos, como também por afetar negativamente o desenvolvimento de plantas (SIDDIQUI et al., 2006). Por esse motivo, foram selecionados três isolados produtores de HCN (52K, 77J e 81L) e dois não produtores (21N e 33N) para avaliação da interação com plantas, para que se pudesse avaliar o potencial efeito tóxico. Os resultados obtidos mostram que os isolados podem não ter produzido HCN nas condições de cultivo, ou que se produzido pelos isolados bacterianos, o HCN não causou toxidez às plântulas de acácia-negra e de capim-sudão em cultivo *in vitro*, em especial o isolado 81L, que apresentou efeito benéfico à germinação, tanto de acácia-negra quanto de capim-sudão.

Além disso, não houve aumento nos parâmetros de germinação das sementes de acácia-negra nos tratamentos inoculados em relação ao controle sob estresse hídrico. Porém, em -0,49 MPa os tratamentos inoculados com 33N e 52K foram os tratamentos em que houve germinação (5 e 7%, respectivamente), diferente do que ocorreu no tratamento controle e inoculados com 21N, 77K e 81L. Um dos mecanismos que pode explicar tal efeito, é a produção de exopolissacarídeos (EPS), que pode ser mais expressiva nesses isolados. Os EPS são substâncias excretadas pelas células de algumas bactérias, formadas por longas cadeias de açúcar, como glicose, galactose e ramnose em várias porções (ETESAMI; MAHESHWARI, 2018). Esses EPS são produzidos principalmente em resposta à estresses fisiológicos, como seca, salinidade e altas temperaturas, e são fundamentais para a sobrevivência dessas bactérias nesses ambientes. Em condições de seca, os EPS são capazes de criar um microambiente hidratado ao redor da célula, reduzindo a desidratação e auxiliando na manutenção da atividade metabólica bacteriana (MORCILLO; MANZANERA, 2021). Isolados bacterianos do gênero *Bacillus*, produtores de EPS e resistentes à seca, foram testados na germinação de sementes de milho sensíveis a seca (ASHRY et al., 2021). Os autores observaram que o percentual de germinação, o comprimento total de



plântulas e o índice de vigor foram maiores quando houve inoculação combinada dos isolados.

Os resultados deste estudo mostraram que os isolados 21N e 33N, que foram identificados como pertencentes à espécie *Bacillus megaterium*, são produtores de AIA e ACC desaminase, porém não apresentaram efeito positivo no desenvolvimento inicial de plantas de acácia-negra e capim-sudão em condições normais e de estresse. Porém, outros mecanismos como a solubilização de nutrientes devem ser testados. Resultados obtidos em trabalho com inoculação de estirpes solubilizadoras de fosfatos, *B. megaterium* B119, testado em conjunto com *B. subtilis* B2084, no cultivo de milho em diferentes estados do Brasil foram positivos (PAIVA et al., 2020). Os autores observaram, que a utilização do inoculante aumentou a produtividade de grãos em 8,9%, em média. Quando avaliado o desempenho no cultivo de soja, o ganho médio foi de 4,3 sacas ha<sup>-1</sup> em relação à não adição do inoculante (OLIVEIRA et al., 2020). A partir desses estudos conduzidos pela Embrapa Sorgo e Milho, foi desenvolvido o primeiro inoculante para solubilização de fósforo do Brasil. Os resultados com os isolados bacterianos estudados mostram que existe grande potencial biotecnológico a ser explorado, incluindo a capacidade de solubilização de nutrientes e de controle biológico, características comumente encontradas em bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*.

## 5 CONCLUSÕES

Os isolados bacterianos obtidos do microbioma rizosférico de acácia-negra apresentam mecanismos desejáveis como promotores de crescimento de plantas, como produção de AIA, ACC desaminase e HCN. Além disso, demonstram ser tolerantes a diferentes condições de salinidade, de seca, temperaturas altas e ambientes ácidos. A análise genética dos isolados 21N e 33N mostra que pertencem à espécie *Bacillus megaterium* e os isolados 52K, 77J e 81L pertencem ao gênero *Pseudomonas* spp.. O isolado 77J, é deletério à germinação de acácia-negra em 0,1 M de salinidade, pois reduz o comprimento de radícula. Também é prejudicial ao desenvolvimento de capim-sudão em condições normais, reduzindo o percentual de germinação e a velocidade de germinação acumulada. Além disso, reduz o percentual de germinação e a velocidade de germinação acumulada na presença de 0,1 M de NaCl. O isolado bacteriano 81L, promove o desenvolvimento da radícula de acácia-negra em pH 5, da velocidade de germinação acumulada de capim-sudão em potencial hídrico de -0,15 MPa e também a velocidade de germinação e o comprimento da radícula em 35°C. O isolado bacteriano 81L apresenta interação positiva com acácia-negra e capim-sudão e pode ser uma boa alternativa como inoculante em sistemas silvipastoris como consórcio de acácia-negra e capim-sudão. O mesmo não produz AIA e nem ACC desaminase, demonstrando que os mecanismos utilizados como promotor de crescimento de plantas são outros.

## **CAPÍTULO IV – Estudo 2: Resposta de leguminosas à coincoculação de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e rizóbios: uma meta-análise**

### **1 INTRODUÇÃO**

As plantas leguminosas são mundialmente conhecidas pelo importante papel que desempenham. Tanto no ecossistema natural, no caso das nativas, como em cultivos agrícolas, as leguminosas auxiliam no aporte de nitrogênio ao solo, via resíduo de baixa relação C/N e exsudação de nitrogênio via nódulo (BAYER et al., 2000; CHINTALA et al., 2013). São amplamente utilizadas para alimentação humana e animal, fornecendo proteínas de alto valor biológico, carboidratos complexos, fibras, gorduras insaturadas, vitaminas e minerais, essenciais para uma dieta equilibrada (ÇAKIR et al., 2019). Por sua riqueza nutricional, facilidade de produção e baixo custo devido ao uso de inoculantes, as leguminosas são consideradas a segunda classe alimentar mais importante depois dos cereais (MAPHOSA; JIDEANI, 2017). A produção de alimentos de forma sustentável é cada vez mais importante, no contexto da segurança alimentar mundial. Pois devido ao cenário atual que inclui a pandemia global de Covid-19, conflitos armados em regiões pobres do globo e as mudanças climáticas, o *Global Hunger Index* (GHI) aponta para um aumento no número de países em situação severa de fome em relação aos últimos anos (VON GREBMER et al., 2021).

Diante disso, o uso da biotecnologia por meio do emprego de inoculantes microbianos que reduzem a necessidade de insumos químicos para a produção de

alimentos é uma estratégia que está em constante evolução, principalmente no cultivo de leguminosas (GARCIA et al., 2021; SANTOS; NOGUEIRA et al., 2019). No ciclo do nitrogênio, cerca de 60% é originário de processos biológicos, sendo que quase metade da demanda de N na agricultura mundial é fornecida via simbiose entre rizóbios e leguminosas, através da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Sabe-se que a FBN em leguminosas é o fenômeno simbiótico entre plantas e microrganismos mais bem estudado. A soja (*Glycine max*), é a leguminosa de maior importância econômica no mundo, pois é produzida com a utilização de inoculantes compostos por rizóbios simbiotes do gênero *Bradyrhizobium* (HUNGRIA; MENDES, 2015). A planta é o melhor exemplo desse sucesso, pois seus simbiotes fornecem o nitrogênio requerido para que a soja atinja altas produtividades, sem que haja a necessidade da adição de N na forma mineral (MORETTI et al., 2020). No Brasil, além de fornecer até 300kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio via FBN, esses rizóbios também permitem que o cultivo de soja forneça até 30kg ha<sup>-1</sup> de N ao solo, via resíduos vegetais (HUNGRIA; MENDES, 2015; MORETTI et al., 2020).

Além dos rizóbios, outros organismos habitantes do solo agem ativamente para o desenvolvimento de plantas, como as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP). Essas bactérias, assim como os rizóbios, interagem com as plantas em uma relação comensal, sendo benéficas às plantas através da disponibilização de nutrientes, da produção e regulação de substâncias fitorreguladoras e controle biológico de doenças e pragas. Estudos tem demonstrado que a inoculação com RPCP pode também reduzir os efeitos de estresses bióticos e abióticos em plantas, como seca (CHANDRA et al., 2019a, 2019b; RUBIN et al., 2017) salinidade (KUMAWAT et al., 2021), temperaturas extremas (FERNANDEZ et al., 2012a, 2012b), presença de metais pesados (FRANCO-FRANKLIN et al., 2021; JIAN et al., 2019) e ocorrência de doenças (FERREIRA et al., 2020). Por esse motivo, o uso de inoculantes a base de RPCP é uma abordagem amplamente aceita e utilizada no mundo inteiro em cultivos agrícolas (GUPTA; PANDEY, 2019), e estudos sobre o tema vem ganhando força nos últimos anos, o que torna a técnica de baixo custo e cada vez mais aplicável na agricultura.

O uso conjunto de rizóbios e RPCP no cultivo de leguminosas é estudado desde a década de 1990 (FREITAS et al., 1993; GUPTA et al., 1998; REQUENA et al., 1997). Ao longo desses anos, trabalhos vem demonstrando que os mecanismos presentes nas RPCP como a regulação de hormônios, são capazes de potencializar o efeito do rizóbio na planta hospedeira, havendo antecipação da nodulação (CEDEÑO-GARCÍA et al., 2018), aumento no número de nódulos, respondendo assim, em uma maior biomassa vegetal e produção de grãos (HUNGRIA et al., 2010; HUNGRIA et al., 2013). No Brasil, esses resultados levaram à adoção da prática da coinoculação em soja em mais de 25% da área cultivada com a planta (GARCIA et al., 2021; SANTOS et al., 2019).

Embora estudos avaliando espécies de plantas e bactérias de forma local e isolada demonstrem o efeito positivo da coinoculação em leguminosas, pouco se sabe sobre o assunto em uma escala global. Meta-análises recentes confirmam o efeito positivo da coinoculação em soja (BARBOSA et al., 2021; ZEFFA et al., 2020), onde é possível notar efeitos como um aumento no número e biomassa de nódulos, e de biomassa de raiz e parte aérea (ZEFFA et al., 2020) e quando avaliado especificamente a coinoculação com *Azospirillum brasilense*, há também um incremento em N, tanto nos grãos como na biomassa aérea e também o aumento da produtividade de grãos (BARBOSA et al., 2021). Visando compreender o sinergismo na coinoculação de rizóbios e PGPR em leguminosas de uma forma geral, o presente trabalho apresenta a hipótese de que a coinoculação de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) em conjunto com rizóbios, melhoram a nodulação e promovem o crescimento de plantas leguminosas, independente da espécie, tanto em condições adequadas de cultivo, quanto em ambientes estressantes.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

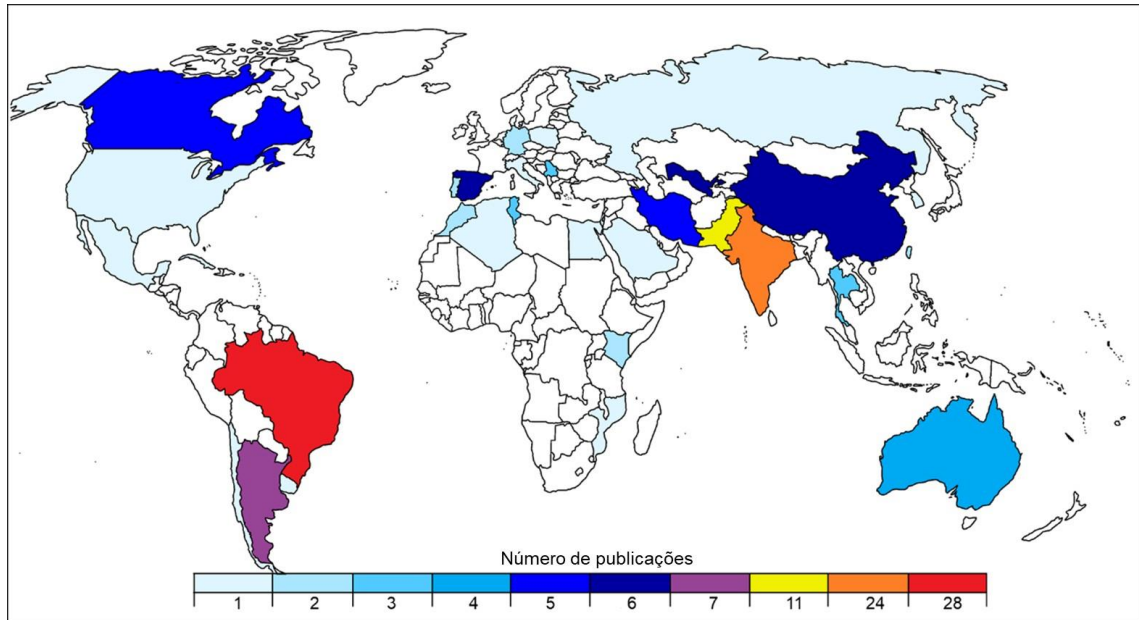
### 2.1 Pesquisa na literatura e compilação de dados

As bases de dados selecionadas para a busca foram o Google Scholar, a Web of Science e a Scopus. Após testes realizados, os termos de busca que encontraram os resultados mais robustos e precisos foram: “PGPR” ou “endophytic” ou “rhizobacteria” e “co-inoculation”, todos na língua inglesa. Os critérios de exclusão utilizados ao longo da coleta de dados foram: 1) publicação que não fosse na forma de artigo publicado em periódico científico; 2) estudo com plantas não leguminosas; 3) estudo sem inoculação simples com rizóbio; 4) estudo envolvendo fungos e micorrizas; 5) estudo que não contivesse pelo menos duas das variáveis avaliadas. Após uma exaustiva busca, foram selecionadas 122 publicações (Apêndice 2), distribuídas entre 32 países (Figura 2) (AAMIR et al., 2013; AFZAL et al., 2010; AHMAD et al., 2013; AHMAD et al., 2016; ALEMNEH et al., 2021; ARAUJO et al., 2021; ATIENO et al., 2012; BECHTAOUI et al., 2019; BENJELLOUN et al., 2021; BESSADOK et al., 2020; BETTIOL et al., 2020; BHATTACHARJYA; CHANDRA, 2013; CASSÁN et al., 2009; CEDEÑO-GARCÍA et al., 2018; CERZINI et al., 2016; CHIBEBA et al., 2020; CHINNASWAMY et al., 2018; SOUZA; FERREIRA, 2017; DUTTA et al., 2014; EGAMBERDIEVA et al., 2016, 2017a, 2017b; EGAMBERDIEVA et al., 2016; FAGOTTI et al., 2019; FERREIRA et al., 2020, 2018; FIGUEIREDO et al., 2008; FIGUEREDO et al., 2017; FILIPINI et al., 2021; FOX et al., 2011; FREITAS et al., 1993; GABRE et al., 2020; GALINDO et al., 2021; GARCIA et al., 2021; GUPTA et al., 1998; HAKIM et al., 2020; HUNGRIA et al., 2013, 2015; ILANGUMARAN et al., 2021; IQBAL et al., 2012; JABBOROVA et al., 2020, 2021, 2018; JESUS et al., 2018; JIAN et al., 2019; JU et al., 2019, 2020; KAUR et al., 2015; KHALIFA; ALMALKI, 2015; KHANNA; SHARMA, 2011; KORIR et al., 2017; KUMAWAT et al., 2019b, 2019a, 2021; KUZMICHEVA et al., 2017; LE et al., 2016; LEITE et al., 2022; MARINKOVIĆ et al., 2018; MASCIARELLI et al., 2017; LUNA, 2014; MATSE et al., 2020; MIRZA et al., 2007; MISHRA et al., 2010; MISHRA et al., 2009, 2014; MOREL et al., 2015; MORETTI et al., 2020; NAGPAL

et al., 2021; NASCIMENTO et al., 2019; NIMNOI et al., 2014; OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2013; OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2015; PAÇO et al., 2020; PAN et al., 2002; PASTOR-BUEIS et al., 2021; QURESHI et al., 2011; REQUENA et al., 1997; RONDINA et al., 2020; ROSIER et al., 2021; SAFRONOVA et al., 2012; SAIDI et al., 2021; SAINI et al., 2015; SALEM et al., 2012; SAMAVAT et al., 2012; SÁNCHEZ et al., 2014; SEYED SHARIFI, 2016; SHAHAROONA; ARSHAD; ZAHIR, 2006; SHAHZAD et al., 2014; SHEHATA et al., 2012; SIBPONKRUNG et al., 2020; SILVA et al., 2019; SINGH; SINGH et al., 2016; SOLANS et al., 2009; STAJKOVIC et al., 2009; STAJKOVIĆ et al., 2011; STAR et al., 2012; STEINER et al., 2020b, 2020a; STEINER et al., 2019; SULEWSKA et al., 2019; TAVARES et al., 2018; TONELLI et al., 2017; TOUKABRI et al., 2021; TU et al., 2021; VALVERDE et al., 2006; VARGAS-DÍAZ et al., 2019; VERMA et al., 2013; VERMA et al., 2010, 2012; VICARIO et al., 2016; VIEIRA et al., 2021; VIJAYABHARATHI et al., 2018; VO et al., 2021; WANI et al., 2007; YADAV; VERMA, 2014; YADEGARI et al., 2008; YADEGARI; RAHMANI, 2010; YASMEEN; BANO, 2014; ZHAO et al., 2011, 2013).

Foram extraídas informação gerais sobre a condução da pesquisa e valores de média (X), desvio padrão (SD) e número de repetições (n) usadas para compor os valores de X para atributos determinados nas plantas (massa seca da raiz, massa seca de nódulos, número de nódulos, massa seca da parte aérea, teor de N na parte aérea e produtividade de grãos). Em estudos que reportaram apenas o coeficiente de variação (CV%), utilizou-se a equação (1) para obtenção dos valores de SD:

$$SD = \frac{CV\%}{100} X \quad (1)$$



**Figura 2** – Número de publicações em cada país que apresentou estudo sobre co inoculação de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas e rizóbio em leguminosas.

Para estudos que não reportaram informações de variabilidade dos dados, calculou-se o CV% médio para os tratamentos controle e experimental utilizando-se SD dos dados e equação 2, depois aplicando-se na equação 1 os valores obtidos.

$$CV\% = \frac{SD}{X} 100 \quad (2)$$

Todos os dados foram extraídos e compilados em planilha Excel®. Quando os dados estavam disponíveis apenas em figuras foi utilizado o software Plot Digitizer (versão 2.6.6) para a extração de dados.

## 2.2 Variáveis moderadoras

As variáveis moderadoras foram: condição experimental (casa de vegetação ou campo); espécie de leguminosa; gênero da RPCP; gênero de rizóbio; presença ou não de stress; atributos de solo. Para os sub-grupos das variáveis moderadoras, foi realizada a análise apenas naqueles que apresentam  $n > 10$ .

Os experimentos foram conduzidos em condições de campo e casa de vegetação, portanto, essas duas condições experimentais foram utilizadas como



variáveis moderadoras. Considerando-se que essa é uma característica importante do experimento e que pode afetar os resultados, todas as análises das demais variáveis moderadoras foram realizadas separadamente para condições de campo e casa de vegetação.

Com relação às espécies de leguminosas, foram analisadas como subgrupos as espécies grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), soja (*Glycine max* (L.) Merr.), feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), feijão-mungo (*Vigna radiata* L.) e alfafa (*Medicago sativa* L.).

Foi possível analisar os seguintes gêneros de RPCP: *Azospirillum* spp.; *Bacillus* spp.; *Pseudomonas* spp.; *Serratia* spp.; *Enterobacter* spp. e *Streptomyces* spp. Enquanto para os gêneros de rizóbio foram analisados *Bradyrhizobium* spp., *Mesorhizobium* spp., *Rhizobium* spp. e *Sinorhizobium* spp.

Para avaliar condições de estresse foram utilizados apenas estudos realizados em casa de vegetação, pois poucos estudos foram avaliados em campo, repercutindo em baixo número de comparações ( $n < 10$ ). Assim, foram analisadas condições de estresse hídrico, salino, metais pesados e doenças.

O efeito do solo na eficiência da coinoculação foi avaliado por meio de atributos químicos do solo, sendo: acidez do solo –  $\text{pH} \leq 7$  e  $\text{pH} > 7$ ; teor de carbono orgânico –  $\text{C} \leq 1\%$  e  $\text{C} > 1\%$ ; nitrogênio total –  $\text{N} \leq 0,6\%$  e  $\text{N} > 0,6\%$ .

### 2.3 Meta-análise

A magnitude do efeito da coinoculação foi calculada usando o logaritmo natural da razão de resposta ( $\ln\text{RR}$ ; equação 3) como *effect size* (HEDGES et al., 1999):

$$\ln\text{RR} = \ln \frac{X_e}{X_c} \quad (3)$$

onde  $X_e$  e  $X_c$  são os valores de média para os tratamentos experimental e controle, respectivamente. A variância ( $v$ ) foi calculada como:

$$v = \frac{SD_e^2}{n_e X_e^2} + \frac{SD_c^2}{n_c X_c^2} \quad (4)$$

onde  $SD_e$ ,  $n_e$ ,  $SD_c$  e  $n_c$  representam o desvio padrão e o número de repetições para os tratamentos experimental (coinoculação) e controle (inoculação

apenas com rizóbio), respectivamente. A variância da razão de resposta foi utilizada para se obter os valores de razão de resposta e 95% do intervalo de confiança (IC). O efeito da coinoculação nas leguminosas foi considerado significativo quando os valores de 95% IC da razão de resposta não sobrepõem o zero. A razão de resposta média e os valores de IC foram calculados usando *random-effects method* com *restricted maximum likelihood estimation*. Visando facilitar a interpretação dos resultados, a razão de resposta e o IC dos tratamentos foram transformados (BARBOSA et al., 2021):

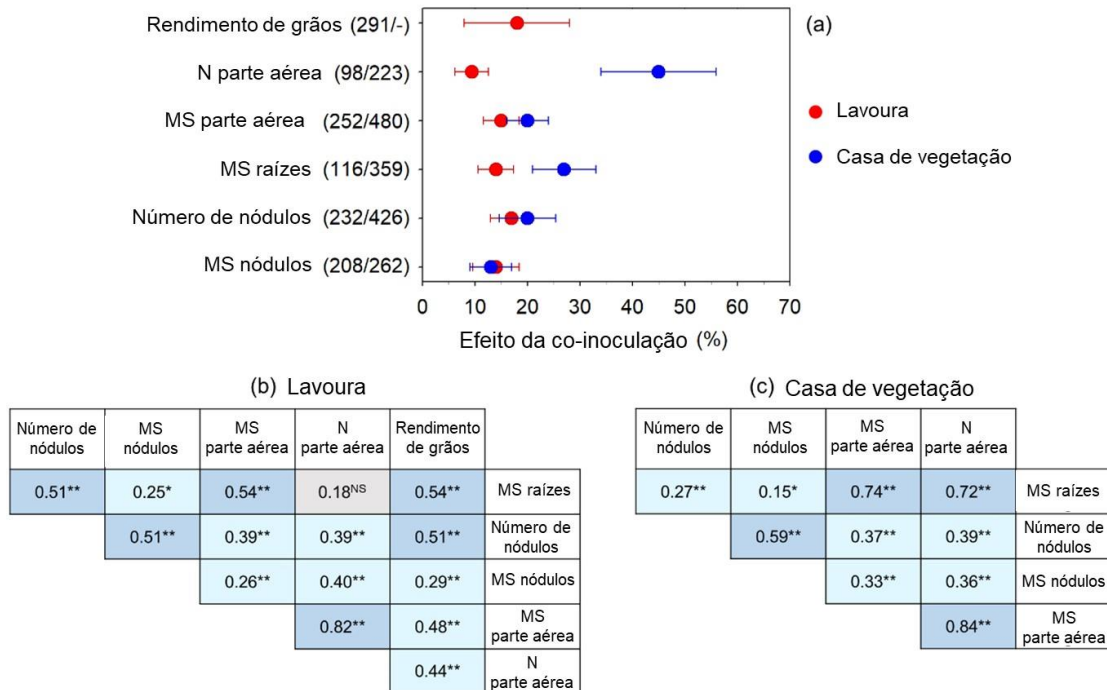
$$\%mudança = (e^{\ln RR} - 1) \times 100 \quad (5)$$

Os efeitos do viés de publicação e a robustez da meta-análise foram avaliados utilizando-se o teste *fail-safe N*. Para valores maiores que  $5n+10$  ( $n$  é número de observações na análise) o resultado da meta-análise foi considerado robusto (ROSENBERG, 2005). As análises foram realizadas com o software OpenMEE (WALLACE et al., 2017).

### 3 RESULTADOS

A análise geral do efeito da coinoculação em leguminosas mostrou que houve efeito positivo em relação à inoculação simples, tanto em casa de vegetação, como também em campo (Fig. 3a). Em casa de vegetação, houve um incremento de 9-17% na massa seca de nódulos, 15-25% no número de nódulos, 21-33% na massa seca de raiz, 16-24% na massa seca da parte aérea e 34-56% no N total da parte aérea. Em estudos de campo, houve um incremento de 10-18% na massa seca de nódulos, 13-24% no número de nódulos, 11-17% na massa seca de raiz, 12-19% na massa seca da parte aérea, 5-12% no N total da parte aérea e 8-28% na produtividade de grãos. A correlação de Pearson entre os valores de *effect size* foram significativas para todos os atributos de plantas cultivadas a campo (Fig. 3b), exceto quando comparado o N da parte aérea com a massa seca de raiz. Já em casa de vegetação, todos os atributos tiveram correlações positivas e significativas (Fig. 3c).

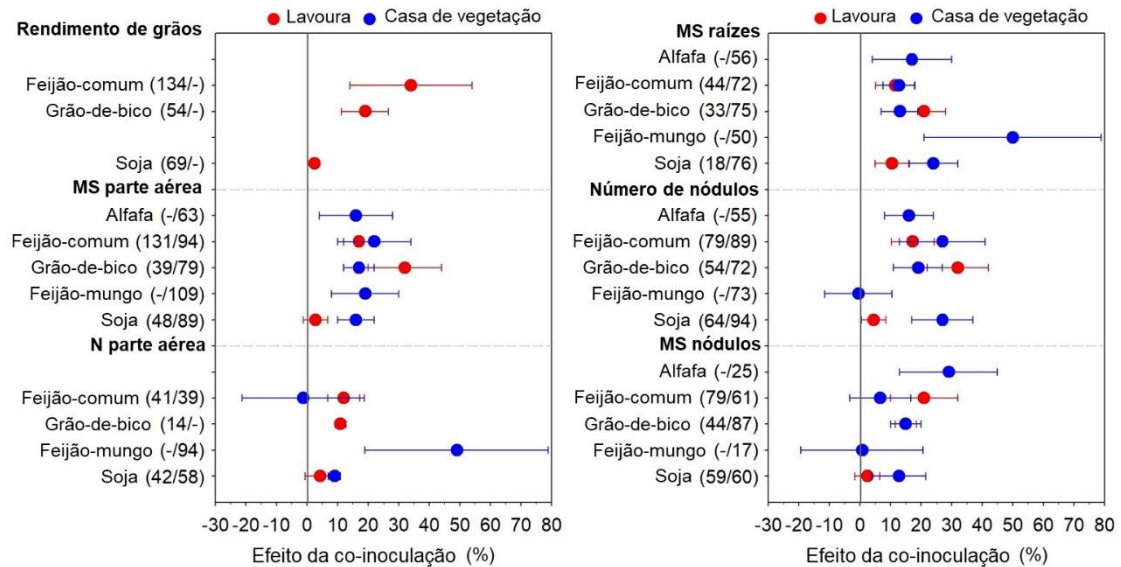
Quando avaliado o efeito da coinoculação nas diferentes leguminosas, verificou-se que todas tiveram efeito positivo (Fig. 4). A produtividade de grãos foi aumentada com a coinoculação em 14-54% em feijão, 11-26% em grão-de-bico e 0-4% em soja. Em todas as leguminosas, houve um incremento em massa seca quando avaliadas em casa de vegetação e em experimentos de campo, o efeito foi positivo em feijão-comum (11-21%) e grão-de-bico (19-44%).



**Figura 3** – Efeito geral da coinoculação com rizobactérias promotoras do crescimento de plantas e rizóbio sobre o rendimento de grãos, matéria seca de raiz e parte aérea, teor de N na parte aérea e nodulação (número e matéria seca de nódulos) de leguminosas (a) e coeficientes de correlação de Pearson entre os valores de *effect size* dos atributos avaliados nas plantas no campo (b) e em casa de vegetação (c). Para o efeito da coinoculação os valores são as médias  $\pm$  95% do intervalo de confiança, sendo que o número de comparações utilizadas na análise de cada atributo da planta é apresentado entre parênteses (campo/casa de vegetação). Para as correlações os símbolos \*, \*\* e ns indicam significância:  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e não significativo, respectivamente. MS = Matéria seca.

Em relação ao nitrogênio da parte aérea, observou-se aumento em feijão-mungo de 19-79% e em soja de 7-11% em plantas cultivadas em casa de vegetação e em feijão-comum em 6-16% e grão de bico em 9-12% na condição de campo. Na massa seca de raiz, todas as leguminosas responderam positivamente à coinoculação, tanto em casa de vegetação quanto a campo. O número de nódulos radiculares aumentou em plantas em casa de vegetação em alfafa (8-24%), feijão-comum (13-41%), grão-de-bico (11-27%) e soja (17-37%), e em campo, o NN aumentou em todas as plantas avaliadas. No atributo massa seca de nódulos, em casa de vegetação o efeito foi positivo em alfafa (13-45%), grão-de-bico (10-20%)

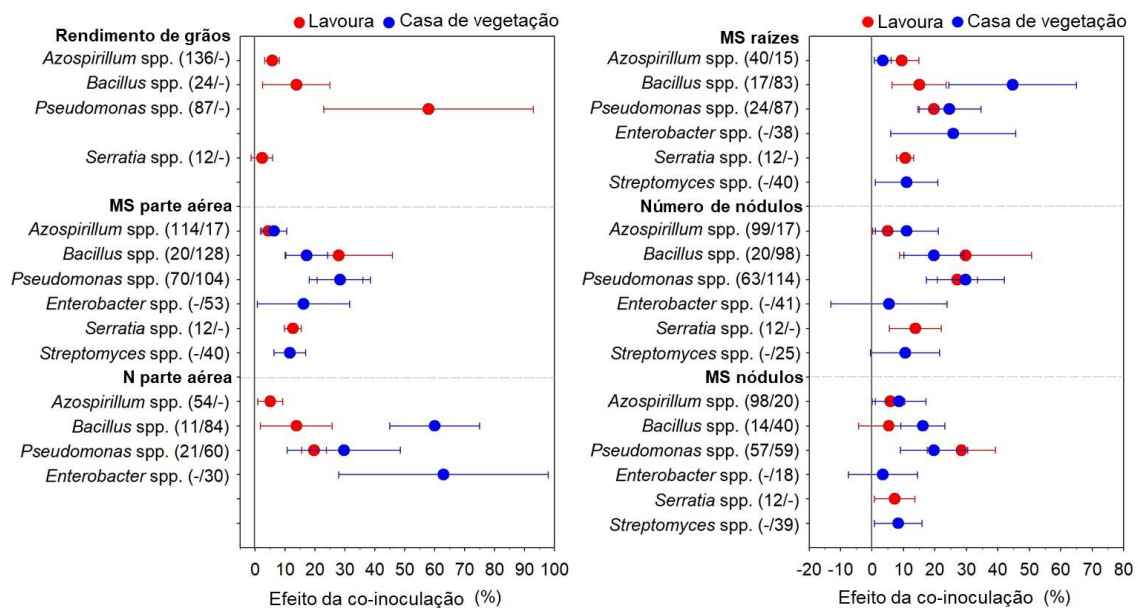
e soja (4-22%), já em experimento de campo houve um incremento em feijão-comum (10-32%) e grão-de-bico (11-18%).



**Figura 4** – Efeito da co-inoculação com rizobactérias promotoras do crescimento de plantas e rizóbio sobre rendimento de grãos, matéria seca de raiz e parte aérea, teor de N na parte aérea e nodulação (número e matéria seca de nódulos) de leguminosas. Para o efeito da co-inoculação os valores são as médias  $\pm$  95% do intervalo de confiança, sendo que o número de comparações utilizada na análise de cada atributo da planta é apresentado entre parênteses (campo/casa de vegetação). MS = Matéria seca.

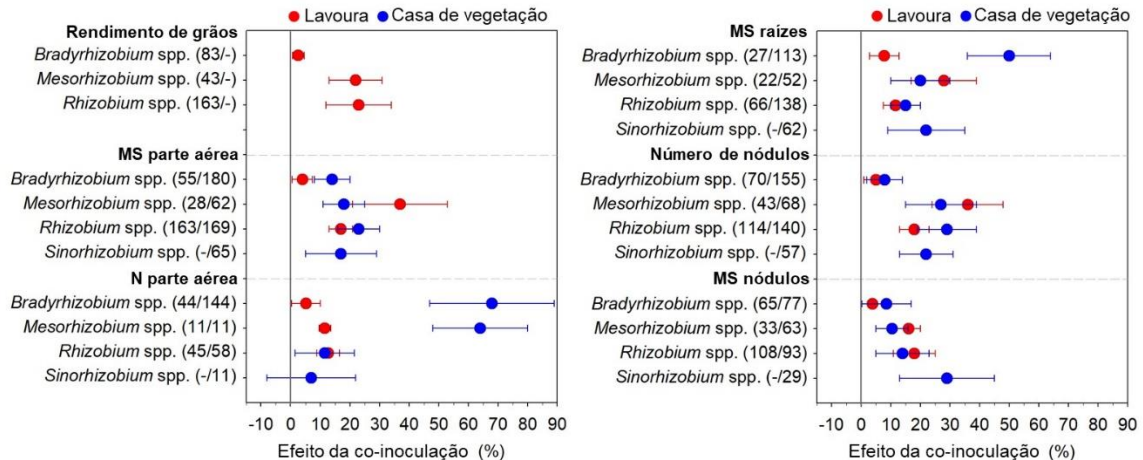
Quando avaliado o efeito das PGPR co-inoculadas, diazotróficos do gênero *Azospirillum* aumentaram a massa seca da parte aérea (2-10%), da raiz (0,5-6%) e o número de nódulos (1-21%) em casa de vegetação. Em campo estes microrganismos foram capazes de aumentar todos os atributos de planta (produtividade de grãos, massa seca de parte aérea, nitrogênio da parte aérea, massa seca de raiz, massa seca de nódulos, número de nódulos) (Fig. 5). Bactérias do gênero *Bacillus* inoculadas em plantas em casa de vegetação causaram efeito positivo na massa seca (10-24%), no teor de N da parte aérea (45-75%), massa seca da raiz (24-65%) e número (10-29%) e massa seca de nódulos (9-22%). Em campo, bactérias do gênero *Bacillus* aumentaram a produtividade de grãos (3-25%), massa seca (2-7%) e N da parte aérea (2-26%), massa seca de raiz (3-15%) e número de nódulos (8-50%). Leguminosas co-inoculadas com *Pseudomonas*

tiveram incremento em todos os atributos avaliados, tanto em casa de vegetação quanto a campo. A coinoculação com *Enterobacter* aumentou massa seca (1-31%) e o N (27-97%) da parte aérea e a massa seca da raiz (5-45%) em casa de vegetação. O gênero *Serratia* aumentou a massa seca da parte aérea (10-15%) e da raiz (7-13%) e o número (5-22%) e a massa seca de nódulos (1-13%) em experimentos de campo. A coinoculação com *Streptomyces* é capaz de aumentar a massa seca de raiz (0,5-21%) e parte aérea (6-17%) e a massa seca de nódulos (0,5-16%) quando comparada com a inoculação simples, em casa de vegetação.



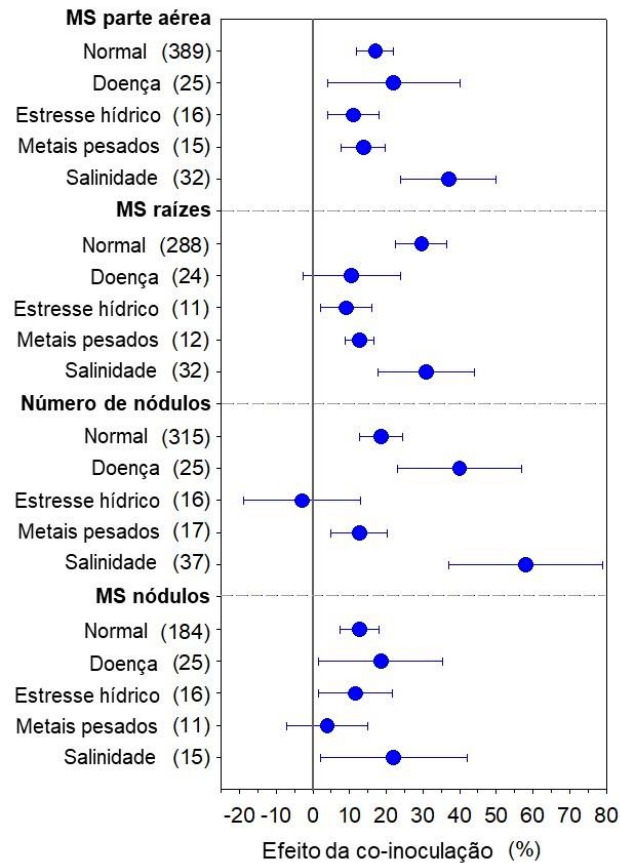
**Figura 5** – Efeito da coinoculação com rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) e rizóbios sobre o rendimento de grãos, matéria seca de raiz e parte aérea, teor de N na parte aérea e nodulação (número e matéria seca de nódulos) em função do tipo de RPCP. Para o efeito da coinoculação os valores são as médias  $\pm$  95% do intervalo de confiança, sendo que o número de comparações utilizadas na análise de cada atributo da planta é apresentado entre parênteses (campo/casa de vegetação). MS = Matéria seca.

A resposta das plantas aos rizóbios na coinoculação também foi avaliada (Fig. 6). Houve uma resposta positiva aos rizóbios na coinoculação em todos os atributos de planta, com exceção do N foliar de plantas coinoculadas com *Sinorhizobium*, que não diferiu na inoculação simples.



**Figura 6** – Efeito da coinoculação com rizobactérias promotoras do crescimento de plantas e rizóbio sobre o rendimento de grãos, matéria seca de raiz e parte aérea, teor de N na parte aérea e nodulação (número e matéria seca de nódulos) em função do tipo de rizóbio. Para o efeito da coinoculação os valores são as médias  $\pm$  95% do intervalo de confiança, sendo que o número de comparações utilizadas na análise de cada atributo da planta é apresentado entre parênteses (campo/casa de vegetação). MS = Matéria seca.

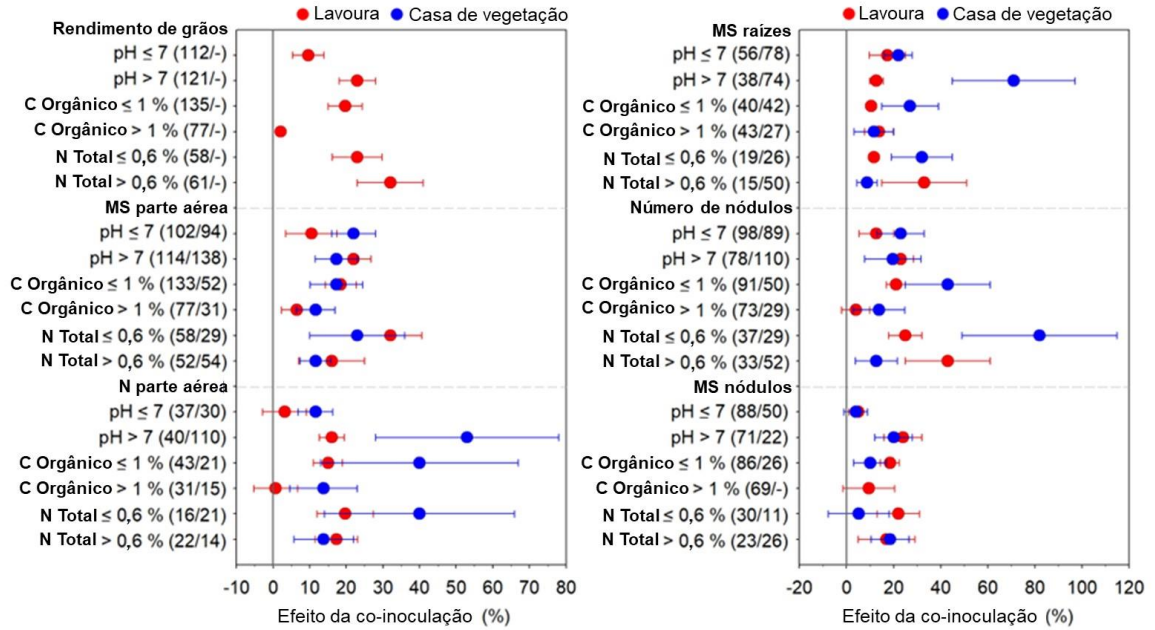
O efeito da coinoculação em condições de estresse demonstrou que a utilização em conjunto de rizóbios e PGPR apresenta um efeito positivo quando comparado com a inoculação simples com rizóbios em casa e vegetação (Fig. 7). Em condições normais (sem estresse), todos os atributos de planta foram afetados positivamente com a coinoculação. Nas avaliações em condições de plantas submetidas a patógenos, a coinoculação aumentou a massa seca da parte aérea (4-40%), o número (23-57%) e a massa seca de nódulos (2-35%). A coinoculação também aumentou a massa seca da parte aérea (3-19%) e de raiz (2-17%), e dos nódulos (1-29%) de plantas em condições de seca, e a massa seca da parte aérea (4-18%), da raiz (2-16%) e o número de nódulos (2-22%) de plantas cultivadas em presença de metais pesados. Quando as plantas são cultivadas com salinidade, a coinoculação aumenta todos os atributos, sendo que é a condição de estresse que apresenta a melhor resposta à coinoculação (aumento médio de 37% nos atributos de planta), em comparação com a inoculação simples.



**Figura 7** – Efeito da co-inoculação com rizobactérias promotoras do crescimento de plantas e rizóbio sobre matéria seca de raiz e parte aérea e nodulação (número e matéria seca de nódulos) em função do tipo de estresse para experimentos conduzidos em casa de vegetação. Para o efeito da co-inoculação os valores são as médias  $\pm$  95% do intervalo de confiança, sendo que o número de comparações utilizadas na análise de cada atributo da planta é apresentado entre parênteses. MS = Matéria seca.

No efeito da co-inoculação em função dos atributos químicos, a co-inoculação foi positiva para o crescimento de leguminosas independente da condição química do solo, seja em casa de vegetação ou em campo (Fig. 8). Em relação ao C orgânico do solo, o N da parte aérea teve incremento com a co-inoculação, quando o C orgânico foi  $\leq 1\%$ , diferente do que ocorre quando foi  $> 1\%$ . Também se observa incremento com a co-inoculação em massa seca de parte aérea e produtividade de grãos quando o C orgânico foi  $\leq 1\%$ .





**Figura 8** – Efeito da coinoculação com rizobactérias promotoras do crescimento de plantas e rizóbio sobre rendimento de grãos, matéria seca de raiz e parte aérea, teor de N na parte aérea e nodulação (número e matéria seca de nódulos) em função de atributos biogeoquímicos do solo. Para o efeito da coinoculação os valores são as médias  $\pm$  95% do intervalo de confiança, sendo que o número de comparações utilizada na análise de cada atributo da planta é apresentado entre parênteses. Círculo vermelho indica experimento de campo; círculo azul indica experimento em casa de vegetação. MS = Matéria seca.

## 4 DISCUSSÃO

A coinoculação de rizóbios e rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) em leguminosas mostrou-se uma estratégia capaz de aumentar todos os atributos de plantas, tanto em estudos de campo, como em casa de vegetação (Fig. 3a). Com relação à resposta das plantas ao efeito da inoculação com RPCP, observou-se incremento na nodulação (número e massa seca de nódulos), massa seca de raiz e parte aérea, teor de N na parte aérea, assim como no rendimento de grãos. Essa resposta foi observada com variações entre os experimentos a campo e em casa de vegetação provavelmente causadas por diversos fatores que os diferenciam como, por exemplo, a espécie da planta, o tipo de substrato/solo, tamanho do vaso, densidade de semeadura, histórico da área de cultivo.

As RPCP são bactérias do solo que interagem positivamente com a planta, podendo colonizar as raízes de forma rizosférica (incluindo o rizoplane), endofítica ou simbiótica (KHAN, 2005; OLANREWAJU et al., 2017). Através dos seus mecanismos, são capazes de disponibilizar nutrientes (via fixação biológica de N, solubilização de P, K e Zn, etc) (EMAMI et al., 2020; ETESAMI et al., 2017; SANTOS et al., 2020), de produzir substâncias fitorreguladoras (como auxinas, giberelinas, citocininas e ACC desaminase) (GLICK, 2014; MACHADO et al., 2016; SILVA et al., 2020) e de proteger a planta contra patógenos e doenças (via indução de resistência sistêmica e produção de metabólitos, como os sideróforos por exemplo) (FERREIRA et al., 2020; OLANREWAJU et al., 2017). Por esse motivo, são amplamente utilizadas ao redor do mundo como promotoras de crescimento em diferentes grupos de plantas. Além disso, tem sido demonstrado que também são capazes de aumentar a resistência da planta a situações adversas como estresse hídrico, salinidade, temperaturas extremas e presença de metais pesados no solo (FRANCO-FRANKLIN et al., 2021; RHO et al., 2018; RUBIN et al., 2017).

A correlação do entre os valores de *effect size* dos atributos de planta, foi positiva em todas as combinações, tanto em casa de vegetação como à campo (Fig. 3b, 3c). Em casa de vegetação, o N da parte aérea é fortemente correlacionado com a massa seca da parte aérea e da raiz, assim como a massa seca da parte aérea

com a massa seca de raiz e o número de nódulos com a massa seca de nódulos ( $r > 0,5$ ,  $p < 0,01$ ). Já no campo, o N da parte aérea tem correlação positiva com a massa seca da parte aérea ( $r = 0,82$ ,  $p < 0,01$ ), mas não se observou relação significativa com a massa seca da raiz ( $r = 0,18$ ,  $p = ns$ ).

#### **4.1 A coinoculação é eficiente em leguminosas, independente da espécie.**

Os dados mostram que todas as espécies são beneficiadas pela coinoculação em nível semelhante, já que de forma geral há uma sobreposição do IC, tanto em casa de vegetação como em campo (Fig. 4). Estudos anteriores realizados com soja, em forma de meta-análises já indicavam o efeito benéfico da coinoculação (BARBOSA et al., 2021; ZEFFA et al., 2020). Nosso estudo com dados obtidos com outras espécies de leguminosas demonstra que a coinoculação produziu melhor resposta quando comparadas com a soja. Por exemplo, o efeito na produtividade de grãos em grão-de-bico (aumento de 22%) e feijão comum (aumento de 38%) são mais pronunciados que em soja (aumento de 3%). Isso ocorre, porque a soja é a leguminosa de maior importância agrícola e econômica no mundo. Por esse motivo, os principais avanços em eficiência do uso de inoculantes rizobianos foram alcançados na cultura da soja. Isso levou a um alto nível de eficiência a partir do uso de inoculantes, onde a taxa de FBN pode chegar a 337 kg ha<sup>-1</sup> (SALVAGIOTTI et al., 2008), levando a cultura da soja a alcançar altas produtividades sem o uso de fertilizantes nitrogenados.

Uma meta-análise que avaliou o efeito da coinoculação de diversas PGPR em soja, verificou que em estudos de campo, a coinoculação não foi capaz de aumentar a massa seca de raiz e de nódulos, N da parte aérea e produtividade, por outro lado, aumentou o número de nódulos, massa seca da parte aérea (ZEFFA et al., 2020). Esses resultados concordam em parte com os nossos, pois verificamos que a soja responde bem a coinoculação quando avaliados produtividade de grãos, massa seca da raiz e número de nódulos, e que a massa seca de parte aérea e de nódulos e o N da parte aérea não diferem do tratamento com inoculação simples em ensaios de campo (Fig. 4).

A alfafa respondeu à coinoculação em todos os atributos de plantas em casa de vegetação (Fig. 4). Esse achado é importante, dada a relevância da leguminosa, cultivada em mais de 80 países, e que é uma forrageira de alta qualidade para alimentação animal (LE et al., 2016; RADOVIC et al., 2009).

A coinoculação a campo em feijão-comum, levou a um incremento tanto nos atributos de parte aérea, quanto de raiz, e isso refletiu em um aumento de produtividade de grãos de 38% em relação a inoculação simples (Fig. 4). Diferente da soja, para o feijão-comum a inoculação não é capaz de suprir totalmente a necessidade de N, sendo necessária a utilização de parte da adubação nitrogenada no momento da implantação da cultura (SANTOS et al., 2019). Porém, dependendo da quantidade, o efeito pode se tornar prejudicial, afetando a nodulação da planta e a consequente redução da produtividade (HUNGRIA et al., 2003). Dessa forma, nossos resultados mostram que a coinoculação é uma excelente opção para aumentar a produtividade de feijão-comum.

Assim como o feijão-comum, o grão-de-bico foi favorecido pela coinoculação. Todos os atributos de planta tiveram incremento em relação a inoculação simples (Fig. 4). O grão-de-bico é uma excelente fonte proteica, o que a leva a ser a terceira leguminosa mais produzida no mundo (OLIVEIRA et al., 2017; VO et al., 2021). Porém, estudos envolvendo a seleção de rizóbios mais eficientes na FBN ainda devem ser conduzidos, pois a taxa de fixação é de 70kg de N ha<sup>-1</sup>, o que não é suficiente para suprir a demanda da planta por N. Além disso, é cultivada principalmente e em regiões semiáridas, onde há uma grande propensão à estresse hídrico e condições climáticas extremas, o que afeta drasticamente a capacidade dos rizóbios em se estabelecer e fixar nitrogênio (BENJELLOUN et al., 2021; NASCIMENTO et al., 2012). Os resultados do presente trabalho demonstram a importância de mais estudos, pois a coinoculação é capaz de aumentar o N da arte aérea e a produtividade de grãos.

No cultivo de feijão-mungo em casa de vegetação, não houve diferença significativa no número e massa seca de nódulos, mesmo assim o N foliar e a massa seca da raiz tiveram um incremento de 49% e na massa seca de parte aérea, um incremento de 15% quando coinoculado com RPCP (Fig. 4). Esses resultados indicam um efeito direto na promoção de crescimento. Ou seja, a coinoculação não

interfere na simbiose entre rizóbio e planta, mas é capaz de favorecer o desenvolvimento radicular e conseqüentemente o desenvolvimento da parte aérea e aquisição de N pela planta.

#### **4.2 O efeito da inoculação de rizóbios e rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e o sinergismo entre eles.**

A coinoculação com as RPCP estudadas causaram em geral, efeito positivo no desenvolvimento de leguminosas (Fig. 3). *Azospirillum* e *Pseudomonas*, foram capazes de aumentar todos os atributos de planta em relação à inoculação simples com rizóbios, em ambas as condições experimentais. De maneira geral, estirpes de *Pseudomonas* seguidas de *Bacillus* foram as mais eficientes em promover o crescimento de plantas leguminosas. Para o sucesso de uma RPCP como promotora de crescimento, além dos mecanismos como produção de substâncias reguladoras de crescimento, disponibilização de nutrientes e controle biológico, ela deve ser capaz de sobreviver e se estabelecer no ambiente após a inoculação, onde irá competir por espaço e substrato com a microbiota autóctone (CHAUHAN et al., 2015). *Pseudomonas* e *Bacillus* são os gêneros microbianos mais bem estudados como promotores de crescimento de planta, juntamente com o gênero *Azospirillum*, que tem sido utilizado no cultivo de diversas espécies de gramíneas (ARZANESH et al., 2011; HAHN et al., 2013; HUNGRIA et al., 2010; SANTOS et al., 2019, 2020). Os nossos dados mostraram a partir do número de publicações, que também são os gêneros mais explorados em estudos de coinoculação em leguminosas, e confirmam o sucesso no sinergismo entre rizóbio e PGPR.

Bactérias do gênero *Serratia* não aumentam a produtividade de grãos de leguminosas, porém apresentam efeito positivo na produção de massa seca de parte aérea (aumento de 14%), assim como o gênero *Streptomyces* (aumento de 13%) (Fig. 5). A biomassa vegetal é o principal produto no cultivo de plantas forrageiras, principalmente para alimentação animal. Logo, o uso de métodos capazes de aumentar o seu rendimento de forma econômica e ecologicamente eficiente, como é o caso da utilização de inoculantes microbianos, são cada vez mais empregados na forragicultura, juntamente com o consórcio de plantas e a

diversificação via rotação (HUNGRIA et al., 2021). Pesquisas anteriores demonstram essas estratégias, além de aumentar o rendimento produtivo, são capazes de melhorar a qualidade da forragem (FINGER; BUCHMANN, 2015; HUNGRIA et al., 2021; SCHAUB et al., 2020).

Devido ao número de dados, a coinoculação com *Enterobacter* foi avaliada apenas em casa de vegetação. Os resultados mostraram que não houve efeito nos atributos relacionados à simbiose, mas a coinoculação com *Enterobacter* foi capaz de aumentar a biomassa da parte aérea e da raiz, assim como o N da parte aérea (Fig. 5). Benjelloun et al. (2021), demonstraram que o efeito a campo é ainda mais expressivo. Eles avaliaram a coinoculação de *Mesorhizobium ciceri* com *Bacillus* sp. e *Enterobacter aerogenes* em grão-de-bico em um experimento de campo e verificaram que a combinação de *M. ciceri* e *E. aerogenes* foi capaz de aumentar em mais de 270% a nodulação, 192% o peso seco da parte aérea e 242% o rendimento de grãos de grão-de-bico em relação a inoculação simples (BENJELLOUN et al., 2021).

Avaliando como o efeito rizóbios influenciam na coinoculação, obtivemos resultados positivos (Fig. 6). A coinoculação nos tratamentos inoculados com *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium* foi capaz de aumentar em 67% e 65% o N foliar em casa de vegetação, já em campo, esse efeito foi menos expressivo: 5% e 10%, respectivamente. É comum que haja essa diferença no tamanho do efeito, pois em casa de vegetação há menos interferência de fatores externos, como eventos climáticos adversos e a própria interação com a microbiota nativa (RUBIN et al., 2017), sendo uma estratégia importante para se avaliar como o rizóbio e a RPCP interagem entre si em estudos de coinoculação.

Em relação ao rendimento de grãos, a coinoculação com os gêneros *Mesorhizobium* e *Rhizobium* responderam melhor em comparação à coinoculação com o gênero *Bradyrhizobium* (Fig. 6). Isso é coerente com os demais dados do trabalho, pois o gênero *Bradyrhizobium* é principalmente utilizado no cultivo de soja, que foi a planta menos responsiva a coinoculação, comparando com as demais (Fig. 4).

### 4.3 Os fatores ambientais influenciando a coinoculação.

Devido ao valor de  $n$ , apenas os dados de cultivos em casa de vegetação foram avaliados para as condições de estresse (Fig. 7). Apesar disso, os dados demonstram que a coinoculação com RPCP é capaz de atenuar condições desfavoráveis para o cultivo de plantas (doenças, seca, presença de metais pesados e salinidade), pois há um incremento nos atributos de plantas em todas as condições. Em uma meta-análise, Rho et al. (2018) demonstraram que organismos endofíticos são capazes de atenuar efeitos estressantes, independente da planta e do tipo de estresse causado. Devido aos múltiplos mecanismos de promoção de crescimento de plantas expressados pelas RPCP, elas são capazes atenuar situações potencialmente estressantes para as plantas.

Em condições de doença, além de atenuar o efeito negativo de patógenos, a coinoculação é capaz de causar um incremento em massa seca de parte aérea e número e massa seca de nódulos (Fig. 7). A massa seca de raiz foi o único atributo de planta que não apresentou incremento em relação a inoculação simples sob doença. Isso é explicável, pois um dos mecanismos utilizados pelas PGPR para a supressão de organismos patogênicos é a produção de HCN. Esse gás, além de ser tóxico para os patógenos, também é relatado na literatura como potencialmente tóxico para o desenvolvimento radicular (NADEEM et al., 2014; RUDRAPPA et al., 2008; SIDDIQUI et al., 2006). Além disso, quando há a produção de auxinas pelas PGPR além da demanda requerida pela planta, seu efeito pode ser deletério, inibindo a divisão e alongação celular nas raízes (BISWAS et al., 2000; NADEEM et al., 2014).

Rubin et al. (2017), avaliaram o efeito de RPCP em condições de seca em diferentes grupos funcionais de plantas e o resultado foi positivo, incluindo em plantas leguminosas. No presente trabalho, em condições de seca, a massa seca da parte aérea, da raiz e de nódulos foi aumentada em relação ao tratamento não inoculado (Fig. 7). A utilização de RPCP em condições de seca favorece a produção de massa seca, pois há a produção de substâncias como os exo-polissacarídeos (EPS), que são responsáveis por aumentar a capacidade de retenção de água no solo na região rizosférica (NASEEM; BANO, 2014; TIMMUSK et al., 2014). Por esse

motivo, o desenvolvimento da planta é favorecido pelos múltiplos mecanismos de promoção de crescimento, mesmo que haja déficit hídrico (TITTABUTR et al., 2013; VURUKONDA et al., 2016).

A salinidade é a condição que apresenta a melhor resposta a coinoculação (Fig. 7). Provavelmente, a inoculação conjunta de rizóbios e PGPR, além de promover o crescimento de forma direta pelos mecanismos de promoção de crescimento, melhora a relação simbiótica entre rizóbio e leguminosa e a atividade enzimática na região rizosférica (KUMAWAT et al., 2021). Além disso, o principal mecanismo utilizado pelas PGPR na indução de resistência à salinidade é a redução da produção endógena de etileno pela planta. Isso ocorreria porque essas bactérias produzem ACC desaminase, que degrada o ACC à amônia e alfa-cetobutirato, interrompendo a produção de etileno (GLICK, 2014). Esse hormônio é conhecido como o “hormônio do estresse”, sendo responsável pela senescência da planta. O efeito positivo demonstrado no presente trabalho é uma importante evidência, já que a salinidade afeta mais de 100 milhões de hectares ao redor do mundo, o que equivale a 20% das terras cultiváveis (GUPTA; PANDEY, 2019), causados por altas temperaturas, falta de água, água de irrigação salina ou um mal manejo de irrigação (PLAUT et al., 2013).

Na coinoculação em presença de metais pesados, todos os atributos de planta tiveram incremento em relação à inoculação simples (Fig. 7), diferente do que foi relatado por Franco-Franklin et al. (2021), em uma meta-análise que avaliou o efeito de bactérias endofíticas em plantas expostas a metais pesados. Os autores sugerem que os benefícios podem ser específicos para alguns hospedeiros e também são dependentes do nível de estresse ao que a planta é submetida (FRANCO-FRANKLIN et al., 2021). Na presença de metais pesados há uma maior produção de nódulos pela planta, porém a massa seca desses nódulos permanece igual ao tratamento com inoculação simples. O etileno é um dos principais inibidores de nodulação em leguminosas (YUHASHI et al., 2000). Por esse motivo, a coinoculação favorece a produção de nódulos através da produção de ACC desaminase pelas PGPR, pois interrompe a produção excessiva de etileno que ocorre devido à exposição ao metal pesado (NASCIMENTO et al., 2016; SUBRAMANIAN et al., 2015).



Em relação aos atributos químicos de solo, de uma forma geral, há um efeito positivo da coinoculação, independente da condição à que as plantas são expostas (Fig. 8). O pH do solo é um fator determinante para estruturação da comunidade microbiana do solo, pois apesar da grande maioria dos organismos do solo apresentarem o pH ótimo entre 5,5 e 6,5, há uma seleção dos organismos tolerantes em função da faixa de pH em que se encontram (MSIMBIRA; SMITH, 2020). Além disso, à medida que se diferenciam as faixas de pH, são alterados muitos outros fatores bioquímicos do solo, que tornam praticamente impossível de se analisar o efeito do pH isoladamente (ROUSK et al., 2009). No presente estudo, a coinoculação foi benéfica independente da faixa de pH, mas na produtividade de grãos o efeito foi mais pronunciado em  $\text{pH} > 7$  (Fig. 8). O principal efeito da alcalinidade do solo para as plantas é a baixa disponibilidade da maioria dos micronutrientes, assim como o P, que é precipitado em forma de fosfatos de cálcio (RASHID; RYAN, 2004). A grande maioria dos solos alcalinos se encontram em regiões áridas do mundo, que ocorrem em decorrência do acúmulo de carbonatos e bicarbonatos, devido à insuficiência de precipitação para lixiviar esses sais. Sendo assim, a alcalinidade é um efeito secundário da seca (MSIMBIRA; SMITH, 2020). Nesse caso, nossos resultados mostram que a utilização da coinoculação pode ser uma alternativa para cultivo de plantas em regiões áridas, já que fornece além da resistência ao estresse hídrico, um melhor desempenho no crescimento relacionado também a alcalinidade que ocorre em decorrência da falta de água. Uma hipótese para a maior produtividade em  $\text{pH} > 7$ , é que essas bactérias resistentes à alcalinidade expressam sua capacidade como promotoras de crescimento de plantas e com isso, disponibilizam nutrientes via solubilização, como por exemplo P, Zn, e Fe, que são os nutrientes que tem a disponibilidade para as plantas afetada em solos alcalinos.

No geral, independente do modo de cultivo, as maiores respostas da planta foram observadas em solos com baixo teor de C orgânico (COS), principalmente número de nódulos e rendimento de grãos (Fig. 8). Diferente do relatado por Barbosa et al. (2021), na meta-análise sobre coinoculação em soja, que não encontrou diferença em produtividade de grãos em função do teor de carbono orgânico do solo. O COS é considerado um dos principais indicativos de qualidade

do solo. Pode afetar propriedades químicas, físicas e biológicas do solo e tem um importante papel nas funções de solos agrícolas, como ciclagem de nutrientes, formação de agregados, retenção de água e substrato para a manutenção da biodiversidade (BONGIORNO et al., 2019; BÜNEMANN et al., 2018). A interação planta-microrganismo pode impactar consideravelmente a dinâmica da MOS na rizosfera. Inclusive no “efeito priming” da rizosfera, que está relacionado com a atividade das raízes e também a ação dos microrganismos decompondo rizodépósitos e o carbono prontamente disponível da MOS (HAMER; MARSCHNER, 2005; HUO et al., 2017).

Em relação ao N total do solo, a coinoculação foi benéfica para os atributos de planta, tanto no campo quanto em casa de vegetação (Fig. 8). Em casa de vegetação, houve uma melhor resposta no número de nódulos e massa seca de raiz, quando o N total foi  $\leq 0,6\%$ , diferente do que ocorreu no campo. Uma hipótese para isso é de que a campo, os rizóbios inoculados nem sempre conseguem expressar seu potencial simbiótico devido à competição que ocorre com a microbiota nativa presente no solo, resultando em uma baixa eficiência na fixação de  $N_2$  (HAN et al., 2020; MENDOZA-SUÁREZ et al., 2021).

De uma forma geral, os resultados comprovam que a combinação de rizóbios e outras bactérias rizosféricas são altamente eficientes para a promoção de crescimento de plantas e redução da utilização de insumos químicos, que são ambiental e economicamente onerosos. Além disso, a coinoculação é uma estratégia eficiente para situações ambientalmente desfavoráveis, a qual oferece proteção para a planta, como também é capaz de oferecer um incremento produtivo em biomassa e grãos. Algumas lacunas do conhecimento sobre o assunto ainda precisam ser preenchidas, como os mecanismos bioquímicos e moleculares da interação tripla entre planta, rizóbio e PGPR, bem como avaliar interações com a microbiota autóctone, sejam elas positivas ou negativas.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados mostram que em termos gerais, a coinoculação é mais eficiente que a inoculação, sendo que o efeito em casa de vegetação é maior que em campo. Todas as leguminosas são beneficiadas pela prática da coinoculação, sendo a soja a leguminosa menos responsiva à prática. Em relação a rizobactéria utilizada na coinoculação, todos os gêneros bacterianos avaliados foram benéficos. A coinoculação é mais eficiente que a inoculação em condições de estresse como presença de doença, condições de seca, na presença de metais pesados e principalmente em condições de salinidade. Além disso, os resultados mostram que independente da condição biogeoquímica do solo ou substrato, a coinoculação é mais eficiente.

## **CAPÍTULO V – Estudo 3: Efeito da inoculação e coinoculação de bactérias produtoras de AIA e ACC desaminase no desenvolvimento de mudas *Acacia mearnsii***

### **1 INTRODUÇÃO**

A área de floresta plantada do estado do Rio Grande do Sul representa atualmente 11% da silvicultura do país, sendo responsável por 18% da área plantada do país de pinus (*Pinus* spp.), 9% de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) e 100% da área plantada de acácia-negra (*Acacia mearnsii*) (AGEFLOR, 2020). A acácia-negra é uma leguminosa originária da Austrália e foi introduzida no estado no ano de 1918 (HIGA et al., 2009). Desde então, é cultivada para três grandes finalidades: extração de tanino da casca e da madeira, produção de carvão e cavacos para celulose (HIGA et al., 2009; MORA, 2002). A área cultivada era de 75,9 mil hectares em 2020, mas já chegou a mais de 200 mil hectares no ano de 2008 (AGEFLOR, 2020).

A produção de mudas de acácia-negra no Brasil ainda é na sua maioria, feita a partir de sementes, pois estudos visando o melhoramento genético de acácia-negra tiveram início apenas na década de 1980 (FOELKEL, 2008; MORA et al., 2001). Atualmente, empresas e viveiros comerciais obtêm parte das sementes a partir de APS (área de produção de sementes) e PSM (pomar de sementes por muda) (ENGEL, 2017; MORA et al., 2001). Porém, boa parte da área plantada ainda é proveniente de sementes coletadas em formigueiros, diretamente nos plantios,

gerando desuniformidade e diversos problemas fitossanitários (CHAN et al., 2015; FOELKEL, 2008).

Mais recentemente, a produção de mudas de acácia-negra de origem clonal, vem sendo vista como uma alternativa para a obtenção de plantios mais homogêneos e produtivos, devido a um material genético de melhor qualidade (ENGEL, 2017). Dentre os métodos de propagação vegetativa, a propagação por estaquia e miniestaquia, são os mais utilizados na silvicultura. Um dos principais entraves para a que se estabeleça a utilização da propagação clonal em acácia-negra, é o baixo percentual de enraizamento, já que varia de 30 a 50% quando utilizada a auxina sintética AIB (ácido indol-butírico) (ENGEL, 2017; SALLES, 2014).

As auxinas são uma das principais classes de hormônios envolvidos na rizogênese de plantas, e por esse motivo, estão entre as mais bem estudadas na propagação assexuada, tanto as de origem endógena quanto as de origem exógena (COSTA et al., 2013). Outro hormônio com importante papel em propagação vegetativa, é o etileno, não só por estar ligado à biossíntese e transporte de auxina, mas também pelo efeito negativo que pode causar de forma direta (QIN et al., 2019). Isso acontece, pois o estresse causado devido ao corte do material a ser propagado, desencadeia a produção exacerbada de etileno endógeno, o que influencia negativamente, tanto na multiplicação quanto no alongamento de raízes (COSTA et al., 2013). Além disso, o etileno pode estimular uma superprodução de auxina, que em concentrações altas, também pode suprimir a rizogênese (BISWAS et al., 2000).

Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas são amplamente estudadas devido ao seu papel do desenvolvimento vegetal, tanto no crescimento radicular, quanto de parte aérea (biomassa, forragem, grãos, etc) (GROVER et al., 2021). Dentre os principais mecanismos ligados a promoção de crescimento de plantas por rizobactérias, a produção de hormônios é um dos mais importantes e a produção de AIA é um dos mais estudados. A inoculação com bactérias produtoras de AIA é capaz de estimular o crescimento radicular, modificar a arquitetura das raízes, aumentar a biomassa e conseqüentemente, aumentar a produtividade das culturas agrícolas (ARKHIPOVA et al., 2019; SANTOS et al., 2019, 2020). Em leguminosas, a coinoculação com bactérias produtoras de AIA aumenta a produção

de nódulos na planta e antecipa a nodulação, resultando em um maior rendimento de grãos (CAMERINI et al., 2008; GROVER et al., 2021; MISHRA et al., 2010).

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) são também conhecidas pela regulação da produção do etileno (hormônio produzido em excesso em condições de estresse), pela atividade da enzima ACC (amino-ciclopropano carboxílico) desaminase, que é capaz de degradar o seu precursor imediato (o ACC) (GAMALERO; GLICK, 2015). Além de auxiliar a planta a tolerar condições de estresse, bactérias produtoras de ACC desaminase também aumentam a produção de nódulos em algumas leguminosas, além de favorecer o alongamento radicular e absorção de nutrientes (CEDEÑO-GARCÍA et al., 2018; CONFORTE et al., 2010).

Muito se sabe sobre a importância da utilização de inoculantes a base de RPCP para o aumento da produtividade de culturas agrícolas ao redor do mundo, principalmente em países em desenvolvimento (GROVER et al., 2021). Porém, quando se fala em silvicultura, o conhecimento ainda é muito limitado e se encontra em fase exploratória (MONTEIRO et al., 2019). Diante disso, o presente estudo apresenta duas hipóteses. A primeira, que bactérias isoladas do microbioma radicular de acácia-negra que apresentam capacidade de produzir AIA e ACC desaminase, influenciam positivamente na morfogênese radicular de microestacas de acácia-negra. A segunda hipótese, que a inoculação e a coinoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas do sistema rizosférico em conjunto com rizóbios eficientes na fixação biológica de nitrogênio promovem o crescimento de mudas seminais de acácia-negra.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Interação de bactérias isoladas no microbioma rizosférico de acácia negra, com plântulas da mesma espécie

Sementes escarificadas fornecidas pela empresa Tanac SA foram desinfestadas (álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 2% por dois minutos e cinco lavagens sucessivas com água destilada estéril) e pré-germinadas em papel filtro em temperatura ambiente, com água esterilizada. Em seguida, as sementes germinadas e saudáveis foram colocadas em tubos de ensaio de 25 cm de comprimento e 2,4 cm de diâmetro, contendo meio de cultura de tecidos MS, (MURASHIGE; SKOOG, 1962) diluído a 75% da concentração de sais, com adição de 7,5 g de ágar (previamente esterilizado em autoclave).

Os isolados bacterianos selecionados utilizados foram: 21N, 33N, 52K, 77J e 81L, conforme descrito no capítulo 2. Em cada tubo, foi inoculado 1 mL de suspensão bacteriana contendo concentração conhecida de células, ajustada para  $1,4 \cdot 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> em média. Além dos tratamentos inoculados, foi conduzido um tratamento controle sem inoculação.

Os tubos foram dispostos em um lampadário com fotoperíodo de 12 horas, com lâmpadas de LED específicas para cultivo protegido em temperatura ambiente. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições. O crescimento das plantas foi acompanhado por um período de 45 dias. Após esse período, as plantas foram retiradas dos tubos e determinados os parâmetros morfológicos das plantas, como número de segmentos nodais, altura, comprimento da raiz principal, comprimento total de raízes e número de raízes secundárias.

#### 2.1.1 Avaliação da capacidade de colonização em plantas de *Acacia mearnsii*

Os isolados também foram avaliados quanto à capacidade de colonizar a rizosfera pela técnica de Rep-PCR, conforme Reyes-Castillo et al. (2019). Para isso,

fragmentos de raízes e parte aérea foram utilizados, após avaliação dos parâmetros morfológicos.

Para avaliar a capacidade de colonização endofítica dos isolados, os fragmentos de planta foram desinfestados superficialmente pela imersão em álcool 70% por 30 segundos, seguido de imersão em hipoclorito de sódio (2,0%) por 60 segundos e após, sete lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. Após, foram fracionados em pedaços menores, dispostos em placas de Petri contendo meio LM e incubados por 72 horas a 28°C. Já para avaliar a capacidade de colonização superficial, os fragmentos foram apenas lavados em água destilada esterilizada, fracionados e dispostos em placas de Petri contendo meio LM e incubados por 72 horas a 28°C.

As colônias bacterianas desenvolvidas a partir dos fragmentos foram reinoculadas em novas placas e sujeitas às mesmas condições de crescimento mencionadas acima. Cada tratamento foi conduzido em triplicata para análise molecular. O DNA foi extraído utilizando-se o Kit Wizard® (Promega Corporation), conforme instruções do fabricante. Também foram extraídos os DNAs dos isolados utilizados no experimento, a partir das culturas puras do banco de isolados, como tratamento controle.

Os DNAs genômicos das amostras foram caracterizados pela técnica de Rep-PCR que amplifica regiões conservadas e repetitivas do DNA cromossômico (VERSALOVIC et al., 1994). O primer utilizado nas reações foi o BOX A1R (5'-CTA CAA CGG GCT GAC GGC GAC G-3') e a amplificação foi realizada com o kit para PCR GoTaq® Master Mix (Promega Corporation), de acordo com as instruções do fabricante. Durante a reação, os ciclos empregados foram: um ciclo inicial a 95°C por 7 minutos, 40 ciclos que intercalam desnaturação a 94°C por 1 minuto, 1 minuto de anelamento a 53°C, e extensão a 65°C por 8 minutos e um ciclo de extensão final a 65°C por 16 minutos.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, em cuba horizontal com tampão TBE 0,5X. Como padrão de peso molecular foi utilizado o 1kb DNA Ladder (Promega Corporation). A visualização dos fragmentos foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta e documentada por imagem.



## **2.2 Avaliação do enraizamento de microestacas de acácia-negra, submetidas a inoculação de bactérias isoladas do microbioma rizosférico da mesma espécie**

Os isolados 21N, 33N e 52K, produtores de AIA e ACC desaminase foram avaliados quanto ao potencial de enraizamento de microestacas *in vitro*.

Sementes escarificadas fornecidas pela empresa Tanac SA, foram desinfestadas e germinadas em frascos estéreis contendo algodão embebido em solução mineral MS 50% (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Um mês após a germinação, os epicótilos foram cortados, contendo duas gemas cada, e transferidos para frascos, contendo 40 mL de meio de cultura MS diluído a 75% e adição de 7,5g de ágar, com pH ajustado para 5,8 (QUOIRIN et al., 2001). Cada frasco recebeu um explante.

A inoculação com os isolados foi realizada utilizando-se uma alíquota de 0,2 mL do inóculo por frasco, com concentração celular conhecida de  $2,1 \cdot 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. O inóculo constituiu-se de uma suspensão contendo o isolado e solução salina (NaCl 0,85%).

O experimento foi conduzido durante 60 dias. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, constituídos por 10 frascos cada. Além dos tratamentos inoculados, também foi conduzido um tratamento controle sem inoculação.

As avaliações foram realizadas após 60 dias, quando foram avaliados os percentuais de sobrevivência, enraizamento, brotamento e comprimento total de raízes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey, 5%) e teste t (5%), nas análises que constituíam dois tratamentos.

### 2.3 Avaliação da eficiência simbiótica de rizóbios de *Acacia mearnsii*

Foram avaliados quanto à eficiência simbiótica as estirpes recomendadas para a cultura (SEMIA 6163 e SEMIA 6150) além da SEMIA 6390 recomendada para *Acacia decurrens*, obtidas da coleção de estirpes SEMIA (Seção de Microbiologia Agrícola), da extinta Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), atual Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária (DDPA), da Secretaria Estadual da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural do estado do Rio Grande do Sul.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre/RS, no período de abril a julho de 2018, totalizando 90 dias. Foram utilizados vasos “Leonard” (VINCENT, 1970) contendo uma mistura composta por vermiculita e areia na proporção de 2:1, no compartimento superior e solução nutritiva específica para acácia, calculada com base na solução nutritiva com produtos comerciais utilizada no viveiro da empresa Tanac SA (Apêndice 3), sem adição de nitrogênio no compartimento inferior. Os vasos foram previamente esterilizados em autoclave durante duas horas a 120°C. Em cada vaso foram semeadas quatro sementes de acácia-negra, desinfestadas (conforme descrito no item 5.2.1) e pré-germinadas em papel filtro em estufa a 28° C. Posteriormente foi feito o desbaste, deixando apenas duas plantas por vaso.

A inoculação dos isolados foi realizada utilizando-se uma alíquota de 2 mL do inóculo por vaso, em uma concentração celular média de  $5.10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. O inóculo constitui-se de uma suspensão contendo o isolado e solução salina (NaCl a 0,85%).

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 15 repetições por tratamento. Além dos tratamentos inoculados, também foram conduzidos dois tratamentos controles sem inóculo: sendo um sem adição de nitrogênio e outro com adição de nitrogênio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) via solução nutritiva, com dosagem equivalente à recomendação para a cultura (equivalente a 40 kg ha<sup>-1</sup> de

N) (SBCS, 2016). A solução nutritiva foi renovada duas vezes por semana durante todo o experimento.

Ao final do experimento, foram avaliados o diâmetro do colo e comprimento da haste principal. A raiz foi separada da parte aérea e então, os nódulos radiculares foram destacados e contados. Após isso, as amostras foram acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa a 65°C com ventilação forçada durante cinco dias. Após a secagem, foram medidas a produção de matéria seca da parte aérea, massa seca dos nódulos e massa seca da raiz.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey, 5%). O isolado com melhor desempenho, foi selecionado para o estudo de coinoculação com as bactérias isoladas do microbioma rizosférico de acácia-negra.

#### **2.4 Efeito da inoculação e coinoculação de rizóbios e bactérias promotoras de crescimento em mudas de *Acacia mearnsii***

Foram conduzidos dois experimentos, um para avaliar o efeito da inoculação dos isolados na promoção de crescimento de mudas de acácia-negra e outro visando avaliar o efeito da coinoculação dos isolados em conjunto com a estirpe SEMIA 6163.

Ambos os experimentos foram conduzidos na casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre/RS. Foram utilizados vasos “Leonard” (VINCENT, 1970) contendo uma mistura composta por vermiculita e areia na proporção de 2:1, no compartimento superior e solução nutritiva para acácia, sem adição de nitrogênio no compartimento inferior. Os vasos com substrato foram previamente esterilizados em autoclave durante duas horas a 120°C. Em cada vaso foram semeadas quatro sementes de acácia-negra, desinfestadas e pré-germinadas em papel filtro em estufa a 28° C.

A inoculação dos isolados, foi realizada utilizando-se uma alíquota de 2 mL do inóculo de rizóbio e 1 mL do inóculo de rizobactéria por vaso, ambos em uma

concentração celular média de  $7,5 \cdot 10^9$  UFC. O inóculo foi composto por uma suspensão contendo o isolado e solução salina (NaCl 0,85%).

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições por tratamento no experimento de inoculação e 10 repetições por tratamento no experimento de coinoculação. Para o experimento de inoculação, todos receberam adição de nitrogênio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) via solução nutritiva duas vezes por semana, com dosagem equivalente à recomendação para a cultura (equivalente a  $40 \text{ kg ha}^{-1}$  de N) (CQFS, 2016) e foi conduzido um tratamento controle com N e sem inoculação. No experimento de coinoculação, não houve adubação nitrogenada e um tratamento sem inoculação e sem adição de N foi conduzido. A solução nutritiva da base do vaso Leonard foi renovada semanalmente durante todo o experimento.

Ao final do experimento, foram avaliados o diâmetro do colo, o comprimento da haste principal e o número de folhas. Na raiz, os nódulos radiculares foram destacados e contados. Após isso, as amostras foram acondicionadas em sacos de papel e secos em estufa a  $65^\circ\text{C}$ , com ventilação forçada durante cinco dias. Após a secagem, foram medidas a produção de matéria seca da parte aérea, massa seca dos nódulos e massa seca da raiz.

Os dados obtidos foram submetidos à avaliação de homoscedasticidade e normalidade, pelos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Quando atendido os pressupostos, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de média de Tukey (5%).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Interação de bactérias isoladas no microbioma rizosférico de acácia-negra, com plântulas da mesma espécie

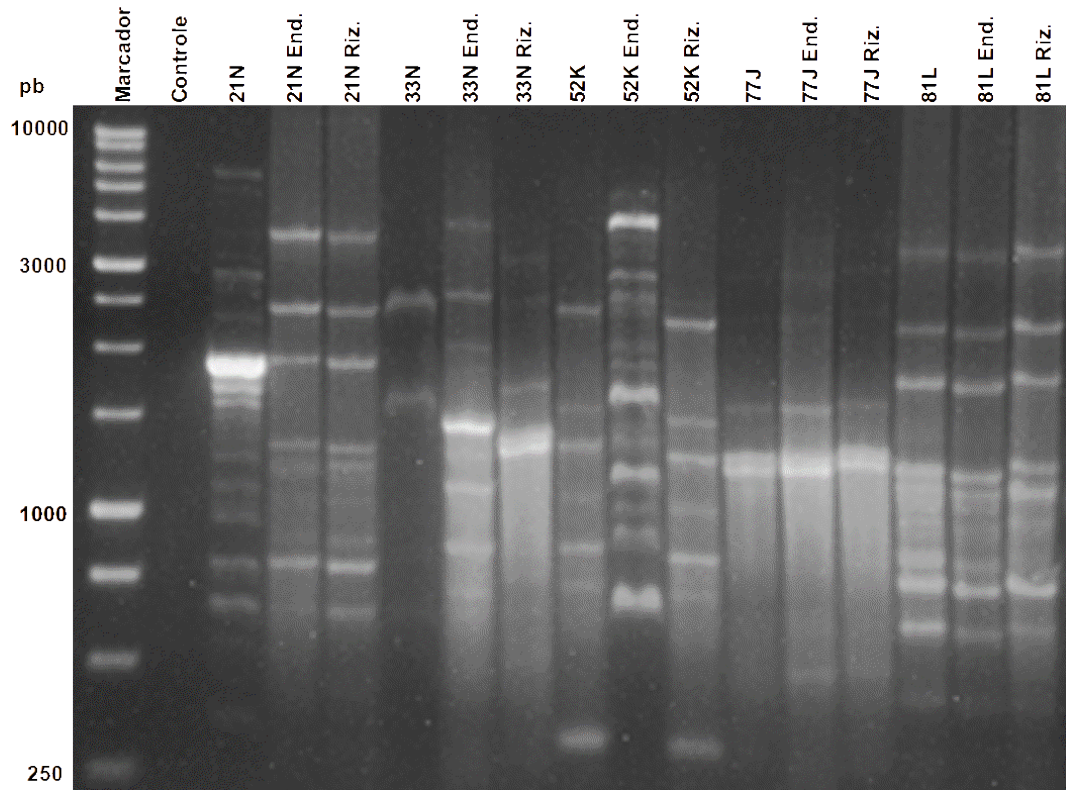
O resultado da inoculação das bactérias do microbioma rizosférico sob o crescimento de plântulas seminais de acácia-negra, são apresentados na tabela 12. Houve diferença significativa no número de segmentos nodais, sendo o tratamento inoculado com 77J, o com menor número de segmentos nodais e o tratamento inoculado com 21N, o com maior número. Nos demais parâmetros, não foram observadas diferenças.

**Tabela 12** – Atributos de plantas de acácia-negra cultivadas *in vitro*, inoculadas com bactérias isoladas do microbioma radicular de plantas da mesma espécie.

Isolado	NSN <sup>1</sup>	Altura	----- cm -----		
			CRP <sup>2</sup>	CTR <sup>3</sup>	NRS <sup>4</sup>
21N	5,1 <sup>5</sup>	5,8 <sup>6</sup>	10,4 ab <sup>7</sup>	33,0 ab	25,5 a
33N	4,9	5,5	11,3 ab	37,0 a	23,5 ab
52K	4,8	6,5	12,6 a	47,2 a	22,5 ab
77J	3,8	4,7	5,9 b	13,8 b	12,7 b
81L	4,0	5,4	6,0 b	26,6 ab	18,8 ab
Controle	4,7	6,2	10,4 ab	33,4 ab	20,0 ab
<i>P</i>	0,044	0,48	0,005	0,003	0,033
F ou H	11,200	4,497	4,924	5,400	3,136

<sup>1</sup> Número de segmentos nodais; <sup>2</sup> Comprimento da raiz principal; <sup>3</sup> Comprimento total de raízes; <sup>4</sup> Número de raízes secundárias; <sup>5,6</sup> Atributos avaliados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, por não atenderem os pressupostos da ANOVA, sendo que para NSN apresentou diferença significativa entre os tratamentos à 5% de probabilidade de erro e para Altura, não houve diferença significativa; <sup>7</sup> Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey, ao nível de probabilidade de erro de 5%.

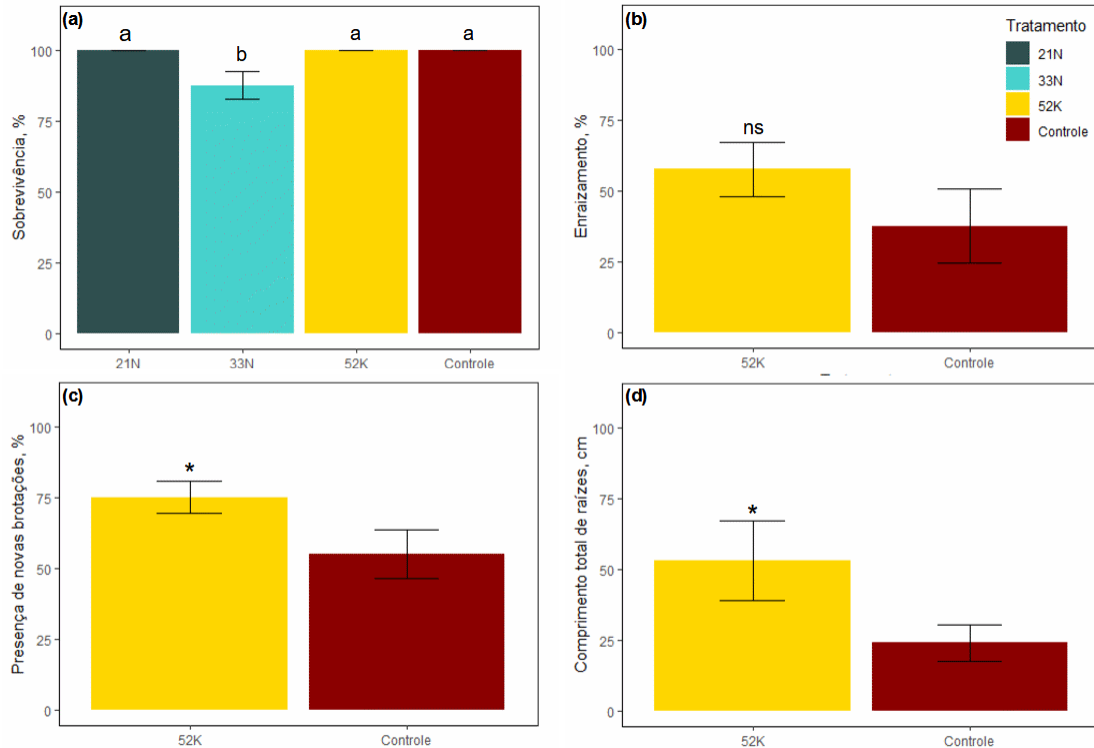
Quando avaliada a capacidade de interação das bactérias, observou-se que os isolados 21N e 33N não foram capazes de colonizar plântulas de acácia-negra, tanto no rizoplano quanto endofiticamente (Figura 9). O isolado 52K não apresentaram capacidade endofítica em plântulas de acácia-negra, mas foi capaz de habitar o rizoplano. Os isolados 77J e 81L apresentaram capacidade de colonizar as plântulas no rizoplano e endofiticamente.



**Figura 9** – Avaliação da capacidade endofítica e rizosférica de bactérias isoladas do microbioma rizosférico de acácia-negra, em plântulas de origem seminal cultivadas *in vitro*. pb: pares de base; End.: Endofítico; Riz.: Rizosférico.

### 3.2 Avaliação do enraizamento de microestacas de acácia-negra, submetidas a inoculação de bactérias isoladas do microbioma rizosférico da mesma espécie

Quando avaliada a capacidade de enraizamento de microestacas de acácia-negra, a inoculação com o isolado 33N foi deletéria à sobrevivência das microestacas (Figura 10a). A inoculação com os isolados 21N e 33N foi prejudicial aos demais parâmetros, pois não houve enraizamento (Figura 10b) e brotamento (Figura 10c). A inoculação com o isolado 52K apesar de promover o enraizamento, não apresentou diferença do controle (Figura 10b), mas tanto na presença de novas brotações (Figura 10c), quando no comprimento total de raízes (Figura 10d), a inoculação com 52K foi superior ao tratamento controle.



**Figura 10** – Efeito da inoculação de bactérias produtoras de AIA e ACC desaminase isoladas do microbioma rizosférico de acácia-negra no enraizamento de microestacas de acácia-negra. a: Sobrevivência (%), médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $F = 25$ ,  $p < 0,001$ ). b: Enraizamento (%), ns = não houve diferença significativa pelo teste t ( $p = 0,07$ ). c: Presença de novas brotações (%), \* = a diferença foi significativa pelo teste t ( $p = 0,03$ ). d: Comprimento total de raízes (cm), \* = a diferença foi significativa pelo teste t ( $p = 0,02$ ).

### 3.3 Avaliação da eficiência simbiótica de rizóbios de *Acacia mearnsii*

O tratamento N+ foi o mais eficiente, quando comparado com os demais tratamentos, em todos os atributos de planta (Tabela 13). O diâmetro do colo das mudas de acácia-negra inoculadas com as estirpes foi semelhante ao do tratamento controle N- e inferior ao do tratamento controle N+. Quando avaliada a altura das mudas, aquelas inoculadas com as estirpes SEMIA 6163 e a SEMIA 6150 foram superiores a SEMIA 6390 e ao controle N-, porém foram inferiores ao tratamento controle N+.

**Tabela 13** – Eficiência simbiótica de SEMIAs em plantas de acácia-negra, cultivadas em casa de vegetação por 90 dias

Tratamento	DC <sup>1</sup>	Altura	MSPA <sup>2</sup>	MSR <sup>3</sup>	MSN <sup>4**</sup>	NN <sup>5*</sup>
	Mm	Cm	----- mg -----			
N+	2,0 a <sup>6</sup>	11,3 a	621,9 a	240,0 a	-	-
SEMIA 6163	1,1 b	7,5 b	194,7 b	45,9 b	22,3	26
SEMIA 6150	1,1 b	7,5 b	109,8 bc	45,5 b	16,7	31
SEMIA 6390	1,0 b	5,5 c	39,0 c	42,6 b	0	0
N-	0,7 b	5,6 c	34,6 c	25,3 b	-	-
P	<0,000	<0,000	<0,000	<0,000	0,002	0,027
F	10,226	45,800	77,867	69,031		

<sup>1</sup> DC – Diâmetro do colo; <sup>2</sup> MSPA – massa seca da parte aérea; <sup>3</sup> MSR – massa seca da raiz;

<sup>4</sup> MSN – massa seca dos nódulos; <sup>5</sup> NN – Número de nódulos; <sup>6</sup> Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey, ao nível de probabilidade de erro de 1%; \*\*Diferença significativa a 1%, pelo teste T; \*Diferença significativa a 5%, pelo teste T.

A massa seca da parte aérea das mudas foi o que apresentou maior variabilidade entre os tratamentos. Sendo que o melhor tratamento foi o controle N+, seguido do tratamento inoculado com a SEMIA 6163, que foi igual ao tratamento inoculado com a SEMIA 6150, sendo que este último não diferiu do inoculado com a SEMIA 6390 e o tratamento controle N-. Na massa seca da raiz, o tratamento controle N+ foi o mais eficiente, sendo que os tratamentos SEMIA 6163, SEMIA 6150 e SEMIA 6390, não diferiram estatisticamente do tratamento controle N (Tabela 13).

Quanto aos nódulos, o tratamento inoculado com SEMIA 6163 teve maior massa seca que o inoculado com SEMIA 6150, mas quando avaliado o número de nódulos, o tratamento SEMIA 6150 foi superior ao inoculado com SEMIA 6163. O tratamento inoculado com a SEMIA 6390 não foi capaz de formar nódulos em raízes de mudas de acácia-negra, apenas pequenas protuberâncias que demonstravam a iniciação da nodulação, porém sem ter avançado desta etapa.

Devido ao desempenho, a SEMIA 6163 foi a estirpe selecionada para o teste de coinoculação em casa de vegetação, com as bactérias isoladas do microbioma rizosférico de acácia-negra.



### 3.4 Promoção de crescimento de mudas de acácia-negra pela inoculação de bactérias produtoras de AIA e ACC desaminase isoladas do microbioma rizosférico de plantas da mesma espécie

A altura foi o único atributo de planta em que a inoculação dos isolados bacterianos causou influência (Tabela 14). O tratamento inoculado com o isolado 52K apresentou maior altura de planta em relação ao controle. Os demais isolados não apresentaram efeito significativo nos atributos de planta, quando comparados ao controle.

**Tabela 14** – Efeito da inoculação de bactérias do microbioma rizosférico de acácia-negra no crescimento de mudas de acácia-negra, cultivadas em casa de vegetação por 120 dias

Tratamento	NSN <sup>1</sup>	Altura	DC <sup>2</sup>	MSPA <sup>3</sup>	MSR <sup>4</sup>
		Cm	Mm		G
21N	18	42,0 b <sup>5</sup>	3,5	3,423	1,239
33N	17	45,6 b	3,8	3,117	1,230
52K	18	49,8 a	3,9	3,298	1,437
Controle	17	42,1 b	3,5	3,119	1,264
<i>P</i>	0,195	0,0038	0,296	0,677	0,401
<i>F</i>	1,691	5,774	1,302	0,513	1,018

<sup>1</sup> NSN – número de seguimentos nodais; <sup>2</sup> DC – Diâmetro do colo; <sup>3</sup> MSPA – massa seca da parte aérea; <sup>4</sup> MSR – massa seca da raiz; <sup>5</sup> Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey, ao nível de probabilidade de erro de 1%;

### 3.5 Promoção de crescimento de mudas de acácia-negra pela coinoculação de bactérias produtoras de AIA e ACC desaminase isoladas do microbioma rizosférico da mesma espécie, em conjunto com a SEMIA6163

Na avaliação da coinoculação em casa de vegetação, apenas a coinoculação com o isolado 33N apresentou diferença no atributo massa seca da parte aérea, em relação ao tratamento controle (somente com a SEMIA 6163) (Tabela 15). Nos demais atributos não houve diferença significativa.

**Tabela 15** – Efeito da coinoculação de bactérias do microbioma rizosférico de acácia-negra e SEMIA 6163 no crescimento de mudas de acácia-negra, cultivadas em casa de vegetação por 120 dias

Tratamento	NSN <sup>1</sup>	Altura	DC <sup>2</sup>	MSPA <sup>3</sup>	MSR <sup>4</sup>	MSN <sup>5</sup>	NN <sup>6</sup>	MPN
		----- cm -----		----- g -----				mg nod <sup>-1</sup>
S6163 + 21N	14	33,5	3,0	1,963 b <sup>8</sup>	0,671	0,145	153	1,276
S6163 + 33N	15	34,4	3,0	2,161 a	0,761	0,183	149	1,356
S6163 + 52K	15	34,1	3,1	2,082 b	0,695	0,197	165	1,301
S6163	15	33,1	2,9	1,720 b	0,577	0,188	158	1,261
<i>p</i>	0,856	0,944	0,543	0,083	0,144	0,176	0,968	0,991
<i>F</i>	0,257	0,127	0,730	2,471	1,958	1,767	0,085	0,035

<sup>1</sup> NSN – número de seguimentos nodais; <sup>2</sup> DC – Diâmetro do colo; <sup>3</sup> MSPA – massa seca da parte aérea; <sup>4</sup> MSR – massa seca da raiz; <sup>5</sup> MSN – massa seca de nódulos; <sup>6</sup> NN – número de nódulos; <sup>7</sup> MPN – massa por nódulo; <sup>8</sup> Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey, ao nível de probabilidade de erro de 10%;

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Influência do nível de interação bacteriana na rizosfera e o seu efeito na micropropagação

Para classificar bactérias de solo rizosférico como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, além de apresentar características de interesse, como os mecanismos de promoção de crescimento de plantas, essas bactérias devem interagir e causar algum efeito positivo ao desenvolvimento das mesmas através da expressão desses mecanismos (KHAN et al., 2020). Ao avaliar a interação das bactérias isoladas do microbioma rizosférico de acácia-negra em plântulas da mesma espécie, houve uma grande variabilidade nos dados, não havendo diferença na maioria dos atributos (Tabela 12). O único atributo de planta que apresentou diferença estatística, foi o número de segmentos nodais, em que a inoculação com o isolado 21N apresentou o maior número de segmentos nodais e a inoculação com o isolado 77J, apresentou o menor número de segmentos nodais, sendo inferior ao tratamento controle, logo apresentando efeito deletério, assim como a inoculação com o isolado 81L.

Sabe-se que tanto as bactérias endofíticas quanto as rizosféricas podem interagir positivamente com o desenvolvimento de plantas, já que o microbioma rizosférico é modulado pelas plantas, que recrutam bactérias capazes de resistir a diferentes condições de estresse ambiental e que são capazes de causar algum efeito benéfico ao seu desenvolvimento (ABEDINZADEH et al., 2019). Diferente disso, os isolados 77J e 81L foram os que apresentaram capacidade de colonizar a planta tanto de forma endofítica quanto no rizoplano (Figura 9), porém não foram benéficos ao desenvolvimento das plântulas de acácia-negra (Tabela 12). O isolado 52K não foi capaz de colonizar a planta endofiticamente, mas apresentou capacidade de colonizar o rizoplano. Apesar de não haver diferença significativa em relação ao tratamento controle, a inoculação com o isolado 52K apresentou um incremento nos atributos de raiz como o aumento do comprimento da raiz principal

(incremento de 17%) e do comprimento total de raízes (incremento de 29%) (Tabela 12).

A capacidade de enraizamento de microestacas foi avaliada pela inoculação dos isolados 21N, 33N e 52K, que além de apresentarem as características desejáveis como promotores de crescimento e enraizamento (produção de AIA e ACC desaminase), não apresentaram efeito negativo em nenhum dos atributos de plantas, quando avaliada a interação com plântulas seminais (Tabela 12). Apesar disso, os isolados 21N e 33N foram prejudiciais ao desenvolvimento das microestacas de acácia-negra (Figura 10). A inoculação com 33N afetou negativamente a sobrevivência, sendo o único tratamento em que houve morte de microestacas (Figura 10a).

Não houve enraizamento nos tratamentos inoculados com os isolados 21N e 33N (Figura 10b). Muitos fatores podem ter influenciado nesse efeito negativo. Um deles, é que esses isolados apresentam maior produção de AIA que o isolado 52K (Tabela 1), o que pode ter causado um efeito inibitório ao enraizamento. Segundo Kerbauy (2019), a quantidade de auxina requerida para o enraizamento é variável de acordo com a fase organogênica. Na fase de indução, a concentração requerida de auxina é alta, pois ela age na sinalização da iniciação e divisão celular para a formação meristemática. Após a formação do primórdio radicular, a alta concentração de AIA se torna inibitória, sendo ela reduzida substancialmente pela enzima AIA-oxidase, trazendo a concentração de AIA endógeno, para a faixa necessária ao alongamento do primórdio radicular. Por esse motivo, o AIA exógeno bacteriano que continua a ser produzido, pode ter causado esse efeito inibitório ao enraizamento (YU et al., 2017). Além disso, as microestacas inoculadas com o isolado 21N, apesar de não terem enraizado, apresentaram a iniciação de primórdios radiculares (dados não mostrados), o que pode ter ocorrido devido ao estímulo inicial do AIA bacteriano. Outro fator determinante, é o fato do isolado 52K ter capacidade de colonizar o rizoplane de acácia-negra enquanto os isolados 21N e 33N, apesar de terem sido isolados do ambiente rizosférico, não apresentam essa interação direta (Figura 9). Pelo ambiente rizosférico ser altamente competitivo, organismos que apresentam algum nível de colonização, seja no interior do tecido

ou na superfície da planta, apresentam vantagens na relação microrganismo-planta (SANTOYO et al., 2016), o que foi confirmado no presente estudo.

A ausência de um meristema apical não limitou a formação de raízes adventícias em microestacas de eucalipto expostas à auxina exógena (FOGAÇA; FETT-NETO, 2005). O mesmo foi observado no presente trabalho, já que os tratamentos controle e inoculado com 52K apresentaram enraizamento das microestacas e a presença de novas brotações. O tratamento inoculado com 52K foi superior ao controle em relação à presença de novas brotações (Figura 10-c) e ao comprimento total de raízes (Figura 10-d). Um dos principais hormônios envolvidos na formação de novas brotações é a citocinina, sendo necessária uma alta relação citocinina:auxina para que ocorra tanto o enraizamento quanto a iniciação de novas brotações (GEORGE et al., 2008). Logo, uma hipótese para o bom desempenho do isolado 52K na formação de novas brotações e no comprimento de raízes é que além de produzir auxinas, o mesmo também apresenta a capacidade de produzir citocininas, como já foi relatado em diversos gêneros bacterianos (GARCIA SALAMONE et al., 2006). Esse resultado é uma importante descoberta, já que é a primeira vez que a utilização de bactérias é testada à nível de micropropagação em espécies florestais. Anteriormente, Muniz et al. (2013) obtiveram resultados promissores com a inoculação de rizóbios simbiossintetizantes de *Adesmia latifolia* sob o enraizamento de porta-enxertos de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) micropropagados, onde a inoculação com cepa EEL16010B teve efeito significativo sobre a taxa de enraizamento, comprimento e número de raízes e biomassa fresca. Ikeda et al. (2019), avaliaram o efeito da inoculação de um produto comercial à base de *Azospirillum brasilense* (Ab-v5 e Ab-v6) sobre o enraizamento de miniestacas de *Acacia mearnsii*, e observaram que os tratamentos inoculados (com 100% e 50% da dose recomendada) não apresentaram diferença em relação ao tratamento controle. Os autores atribuíram esse resultado ao tempo de exposição ao inóculo, já que as miniestacas tiveram os cortes imersos ao inoculante por 15 minutos. Mais estudos que avaliem o efeito da inoculação em miniestacas e estacas em substrato, são passos importantes para elucidação de como essa interação ocorreria em ambiente não axênico.

## 4.2 Efeito da inoculação e coinoculação na produção de mudas de acácia-negra

A última etapa desse estudo, visou avaliar o efeito da inoculação e coinoculação dessas rizobactérias no desenvolvimento inicial de mudas seminais de acácia-negra em casa de vegetação. Para isso, realizou-se a seleção da estirpe recomendada mais eficiente para o estudo de coinoculação. Nesse experimento de eficiência simbiótica, nenhum dos tratamentos inoculados foi tão eficiente quanto o tratamento controle com 100% da dose de nitrogênio. As plantas inoculadas com SEMIA 6163 e SEMIA 6150 se mostraram superiores em altura e a SEMIA 6163 na massa seca da parte aérea, em relação ao tratamento controle sem adição de nitrogênio, sendo esta última selecionada para o experimento de coinoculação. Resultados semelhantes foram encontrados por Vargas et al. (2007), em experimento visando avaliação da inoculação de rizóbios em mudas de *Acacia mearnsii*, onde nenhum dos tratamentos inoculados foi tão eficiente quanto o tratamento controle N+, nem mesmo uma das estirpes recomendadas (inclusive a SEMIA 6163).

Assim como no experimento que avaliou a capacidade de promover o enraizamento de microestacas, no experimento de inoculação em casa de vegetação, o isolado 52K foi capaz de causar efeito positivo ao desenvolvimento das mudas seminais de acácia-negra, levando a um incremento em altura em relação ao controle (Tabela 14). Monteiro et al. (2017), avaliaram a inoculação de um produto comercial composto por diversas RPCP (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Nitrobacter*, *Nitrossomonas* e *Streptomyces*) para a produção de mudas de *Eucalyptus benthamii* e verificaram que o tempo em viveiro foi reduzido de 150 para 90 dias (tempo para que a muda atinja 20 cm, altura ideal de plantio da espécie a campo). Mudas que apresentam crescimento em altura mais rápido, além de apresentarem a vantagem de reduzir o tempo no viveiro, são menos afetadas por situações de estresse na fase inicial da implantação à campo (MONTEIRO et al., 2017). Um estudo que avaliou a influência de *Azospirillum lipoferum* no crescimento de *Myracrodruon urundeuva* (que é uma arbórea nativa do Cerrado e Caatinga

brasileiros) sob estresse hídrico, mostrou que a inoculação aumentou o comprimento de raízes em 30%, o peso seco de raízes em 50% e de parte aérea em 34%, conferindo às plantas uma maior tolerância à seca (OLIVEIRA et al., 2018).

Em culturas agrícolas, a coinoculação já é uma prática usual. No Brasil, há a recomendação para a cultura da soja, com as estirpes Ab-v5 e Ab-v6, pertencentes à espécie *Azospirillum brasilense* (GARCIA et al., 2021; SANTOS et al., 2021) e em outras culturas, apresenta resultados promissores em estudos de campo (SOUZA; FERREIRA, 2017; FILIPINI et al., 2021; GABRE et al., 2020; LEITE et al., 2022; ROUSK et al., 2009; STEINER et al., 2020b; STEINER et al., 2019). Neste sentido, a coinoculação com bactérias isoladas do microbioma rizosférico de acácia-negra em conjunto com a estirpe com melhor desempenho no experimento de inoculação foi avaliada e os resultados se mostraram diferentes do experimento de inoculação simples (Tabela 15). A coinoculação com o isolado 52K (que apresentou bons resultados no experimento de enraizamento de microestacas e no experimento de mudas sob inoculação simples) não diferiu do controle em nenhum dos atributos de planta enquanto a coinoculação com 33N, isolado produtor de AIA e ACC desaminase, aumentou a massa seca da parte aérea. Resultados semelhantes foram encontrados por Elkoca (2010), que observaram que a inoculação combinada de forma dupla ou tripla de *Rhizobium*, *B. subtilis* e *B. megaterium*, não foram significativas na produção de feijão, quando comparadas com a inoculação simples. Essa variabilidade de respostas que ocorre entre inoculação e coinoculação, ressaltam a necessidade de estudos que visem a seleção baseada em combinações que apresentem um sinergismo entre rizóbio e RPCP (KORIR et al., 2017).

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que a ação das bactérias isoladas do microbioma rizoférico de acácia-negra como promotoras de crescimento vegetal, podem ser ou não capazes de colonizar o tecido da planta, tanto interna como externamente. Na microestaquia e na inoculação simples em mudas seminais em casa de vegetação, o isolado que apresenta capacidade de colonização do rizoplano, é o que causa incremento ao desenvolvimento das plantas (isolado 52K). No entanto, quando coinoculado, não expressa o mesmo potencial, sendo o isolado 33N o isolado que apresenta sinergia na inoculação composta.



## CAPÍTULO VI - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da bioprospecção de bactérias isoladas do microbioma rizosférico, foram obtidos dois isolados da espécie *Bacillus megaterium* (21N e 33N) e três pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (51K, 77J, 81L). Esses isolados mostraram-se capazes de produzir AIA (21N, 33N, 52K e 77J), ACC desaminase (21N, 33N, 52K e 77J) e HCN (52K, 77J e 81L). Por esse motivo, foram selecionados para avaliação do efeito, a partir da sua inoculação em plantas. Ao avaliar o efeito sob a germinação em condições de estresse, o isolado 81L se mostrou eficiente em aumentar parâmetros de germinação de acácia-negra e também de capim-sudão.

Apesar de serem isolados do microbioma rizosférico de acácia-negra, os isolados 21N e 33N não foram capazes de colonizar plântulas da mesma espécie. Enquanto o isolado 52K apresentou capacidade de colonização do rizoplane e os isolados 77J e 81L mostraram-se capazes de colonizar as plântulas tanto interna, quanto externamente. Quando avaliada a inoculação em microestacas de acácia-negra, foi obtido um importante resultado, quando verificou-se que a inoculação com 52K foi capaz de aumentar o percentual de microestacas com novas brotações e também o comprimento total de raízes. Quando inoculado em plantas de origem seminal em casa de vegetação, assim como no enraizamento, isolado 52K foi capaz de causar um incremento em altura em relação ao tratamento controle. Estudos em casa de vegetação, que visem avaliar o efeito da inoculação em miniestacas e estacas, são passos importantes para avaliar o efeito da inoculação desse isolado *in vivo*.

O estudo de meta-análise, mostrou que a coinoculação é benéfica em leguminosas, independente da espécie. Podendo ser uma valiosa estratégia em

cultivos agrícolas, já que é uma ferramenta biotecnológica útil para a redução da utilização de insumos químicos, inclusive em condições ambientalmente estressantes. Quando avaliada a coinoculação em conjunto com a estirpe SEMIA 6163, o isolado 33N aumentou a massa seca da parte aérea em relação à inoculação simples com a SEMIA 6163. Esses dados mostram a importância de se avaliar o sinergismo entre as bactérias em estudos de coinoculação, já que os efeitos positivos evidenciados em estudos de inoculação, podem ser anulados.

## REFERÊNCIAS

- AAMIR, M. *et al.* Co-inoculation with rhizobium and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for inducing salinity tolerance in mung bean under field condition of semi-arid climate. **Asian Journal of Agriculture and Biology**, Islamabad, v. 1, n. 1, p. 17–22, 2013.
- ABD EL-RAHMAN, A. F. *et al.* Influence of hydrogen cyanide-producing rhizobacteria in controlling the crown gall and root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, Cairo, v. 29, n. 41, p. 1–11, 2019.
- ABEDINZADEH, M.; ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A. Characterization of rhizosphere and endophytic bacteria from roots of maize (*Zea mays* L.) plant irrigated with wastewater with biotechnological potential in agriculture. **Biotechnology Reports**, Amsterdam, v. 21, [art.] e00305, 2019.
- AFZAL, A.; BANO, A. *Rhizobium* and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (*Triticum aestivum*). **International Journal of Agriculture and Biology**, Faisalabad, v. 10, p. 85–88, 2008.
- AFZAL, A.; BANO, A.; FATIMA, M. Higher soybean yield by inoculation with N-fixing and P-solubilizing bacteria. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 30, n. 2, p. 487–495, 2010.
- AGEFLOR - ASSOCIAÇÃO GAÚCHA DE EMPRESAS FLORESTAIS. **O setor de base florestal no Rio Grande do Sul 2020: ano base 2019**. Porto Alegre: Associação Gaúcha de Empresas Florestais, 2020. 84 p.
- AHEMAD, M.; KRIBET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University. Science**, Riyadh, v. 26, p. 1–20, 2014.
- AHMAD, E.; KHAN, M. S.; ZAIDI, A. ACC deaminase producing *Pseudomonas putida* strain PSE3 and *Rhizobium leguminosarum* strain RP2 in synergism improves growth, nodulation and yield of pea grown in alluvial soils. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 61, n. 2, p. 93–104, 2013.
- AHMAD, F. *et al.* Characterization of *Paenibacillus durus* (pnf16) a new isolate and its synergistic interaction with other isolated rhizobacteria in promoting growth and yield of chickpea. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, Nitra, v. 5, n. 4, p. 345–350, 2016.
- ALEMNEH, A. A. *et al.* Large-scale screening of rhizobacteria to enhance the chickpea-*Mesorhizobium symbiosis* using a plant-based strategy. **Rhizosphere**, Amsterdam, v. 18, [art.] 100361, 2021.

- ALSTRÖM, S.; BURNS, R. G. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 7, p. 232–238, 1989.
- ANTOUN, H.; KLOEPPER, J. W. Plant growth promoting rhizobacteria. *In*: BRENNER, S.; MILLER, J. H. (ed.). **Encyclopedia of genetics**. New York: Academic, 2001. p. 1477–1480.
- ARAUJO, F. F. *et al.* *Bacillus subtilis* changes the root architecture of soybean grown on nutrient-poor substrate. **Rhizosphere**, Amsterdam, v. 18, p. 16–19, 2021.
- ARCAND, M. M.; SCHNEIDER, K. I. M. D. Plant- and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, São Paulo, v. 78, n. 4, p. 791–807, 2006.
- ARKHIPOVA, T. N. *et al.* Effect of seed bacterization with plant growth-promoting bacteria on wheat productivity and phosphorus mobility in the rhizosphere. **Plant, Soil and Environment**, Prague, v. 65, n. 6, p. 313–319, 2019.
- ARZANESH, M. H. *et al.* Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. under drought stress. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 27, p. 197–205, 2011.
- ASGHAR, H. N. *et al.* Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 35, p. 231–237, 2002.
- ASHRY, N. M. *et al.* Utilization of drought-tolerant bacterial strains isolated from harsh soils as a plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): utilization of drought-tolerant bacterial strains. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riyadh, v. 29, n. 3, p. 1760-1769, Mar. 2022.
- ATIENO, M. *et al.* Efficiency of different formulations of *Bradyrhizobium japonicum* and effect of co-inoculation of *Bacillus subtilis* with two different strains of *Bradyrhizobium japonicum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 28, n. 7, p. 2541–2550, 2012.
- BAIS, H. P. *et al.* The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 233–266, 2006.
- BAKKER, A. W.; SCHIPPERS, B. O. B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* plant growth-stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 19, n. 4, p. 451–457, 1987.

BAL, H. B. *et al.* ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 53, p. 972–984, 2013.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. **Meios de cultura específicos para o isolamento de bactérias endofíticas que fixam N<sub>2</sub> atmosférico**. Brasília, DF: Embrapa, 1996. 4 p. (Comunicado Técnico. CNPAB, 12).

BARBOSA, J. Z. *et al.* Meta-analysis reveals benefits of co-inoculation of soybean with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* spp. in Brazil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 163, [art.] 103913, 2021.

BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; MARTIN-NETO, L. Efeito de sistemas de preparo e de cultura na dinâmica da matéria orgânica e na mitigação das emissões de CO<sub>2</sub>. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 24, p. 599–607, 2000.

BECHTAOUI, N. *et al.* Characterization of plant growth promoting rhizobacteria and their benefits on growth and phosphate nutrition of faba bean and wheat. **Biology Open**, Cambridge, v. 8, n. 7, p. 1–8, 2019.

BELTRÁN-HEREDIA, J.; SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; GÓMEZ-MUÑOZ, M. C. New coagulant agents from tannin extracts: preliminary optimisation studies. **Chemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 162, n. 3, p. 1019–1025, 2010.

BENJELLOUN, I. *et al.* Co-inoculation of *Mesorhizobium ciceri* with either *Bacillus* sp. or *Enterobacter aerogenes* on chickpea improves growth and productivity in phosphate-deficient soils in dry areas of a mediterranean region. **Plants**, Basel, v. 10, n. 3, [art.] 571, 2021.

BESSADOK, K. *et al.* The ACC-deaminase producing bacterium *Variovorax* sp. ct7.15 as a tool for improving *Calicotome villosa* nodulation and growth in arid regions of Tunisia. **Microorganisms**, Basel, v. 8, n. 4, [art.] 541, 2020.

BETTIOL, J. V. T. *et al.* Sustainable production of common beans: inoculation, co-inoculation and mineral fertilization in early-cycle cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, Athens, v. 44, n. 1, p. 16–28, 2020.

BHATTACHARJYA, S.; CHANDRA, R. Effect of inoculation methods of *Mesorhizobium ciceri* and PGPR in Chickpea (*Cicer areietinum* L.) on symbiotic traits, yields, nutrient uptake and soil properties. **Legume Research - An International Journal**, New Delhi, v. 36, n. 4, p. 331–337, 2013.

BISWAS, J. C. *et al.* Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v. 92, n. 5, p. 880–886, 2000.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 343–350, 2001.

BLUMER, M. C.; HAAS, D. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 173, p. 170–177, 2000.

BOIERO, L. *et al.* Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 74, n. 4, p. 874–880, 2007.

BOLAND, D. J. *et al.* **Forest trees of Australia**. Melbourne: CSIRO, 1984.

BONGIORNO, G. *et al.* Sensitivity of labile carbon fractions to tillage and organic matter management and their potential as comprehensive soil quality indicators across pedoclimatic conditions in Europe. **Ecological Indicators**, New York, v. 99, p. 38–50, 2019.

BÜNEMANN, E. K. *et al.* Soil quality – A critical review. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 120, p. 105–125, 2018.

ÇAKIR, Ö. *et al.* Nutritional and health benefits of legumes and their distinctive genomic properties. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 39, n. 1, p. 1–12, 2019.

CAMERINI, S. *et al.* Introduction of a novel pathway for IAA biosynthesis to rhizobia alters vetch root nodule development. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 190, n. 1, p. 67–77, 2008.

CARPANEZZI, A. A. Espécies para recuperação ambiental. *In*: GALVÃO, A. P. M. (ed.). **Espécies não tradicionais para plantios com finalidades produtivas e ambientais**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 1998. p. 43–53.

CASSÁN, F. *et al.* *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 45, p. 28–35, 2009.

CEDEÑO-GARCÍA, G. A. *et al.* Plant growth promoting rhizobacteria with ACC deaminase activity isolated from Mediterranean dryland areas in Chile: effects on early nodulation in alfalfa. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, v. 78, p. 360–369, 2018.

CEREZINI, P. *et al.* Strategies to promote early nodulation in soybean under drought. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 196, p. 160–167, 2016.

CHAN, J. M. *et al.* *Acacia mearnsii* industry overview: current status, key research

and development issues. **Southern Forests**, Grahamstown, v. 77, n. 1, p. 19–30, 2015.

CHANDRA, D. *et al.* Field performance of bacterial inoculants to alleviate water stress effects in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 441, n. 1/2, p. 261–281, 2019a.

CHANDRA, D. *et al.* Evaluation of ACC deaminase producing rhizobacteria to alleviate water stress impacts in wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 65, n. 5, p. 387–403, 2019b.

CHAUHAN, H. *et al.* Novel plant growth promoting rhizobacteria-Prospects and potential. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 95, p. 38–53, 2015.

CHEN, Y. P. *et al.* Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 34, p. 33–41, 2006.

CHIAPUSIO, G. *et al.* Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process? **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 23, n. 11, p. 2445–2453, 1997.

CHIBEBA, A. M. *et al.* Towards sustainable yield improvement: field inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and co-inoculation with *Azospirillum* in Mozambique. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 202, n. 9, p. 2579–2590, 2020.

CHINNASWAMY, A. *et al.* A nodule endophytic *Bacillus megaterium* strain isolated from *Medicago polymorpha* enhances growth, promotes nodulation by *Ensifer medicae* and alleviates salt stress in alfalfa plants. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v. 172, n. 3, p. 295–308, 2018.

CHINTALA, R. *et al.* Optimization of Oxygen Parameters for Determination of Carbon and Nitrogen in Biochar Materials. **Analytical Letters**, Philadelphia, v. 46, p. 532–538, 2013.

CONFORTE, V. P. *et al.* Engineered ACC deaminase-expressing free-living cells of *Mesorhizobium loti* show increased nodulation efficiency and competitiveness on *Lotus* spp. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 56, n. 4, p. 331–338, 2010.

COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, London, v. 21, p. 1–18, 1995.

COSTA, C. T. *et al.* When stress and development go hand in hand: Main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, [art.] 133, [p. 1–19], 2013.

MELO, A. P. *et al.* Mixed rhizobia and *Herbaspirillum seropedicae* inoculations with humic acid-like substances improve water-stress recovery in common beans. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, Heidelberg, v. 4, [art.] 6, [p. 1–9], 2017.

DAZZO, F. B.; YANNI, Y. G. The natural rhizobium-cereal crop association as an example of plant-bacteria interaction. *In*: UPHOFF, N. *et al.* (ed.). **Biological approaches to sustainable soil systems**. Boca Raton: CRC Taylor & Francis, 2006. p. 109–127.

DELL'AMICO, E.; CAVALCA, L.; ANDREONI, V. Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 40, p. 74–84, 2008.

DEVI, K. K. *et al.* Hydrogen cyanide-producing rhizobacteria kill subterranean termite *Odontotermes obesus* (Rambur) by cyanide poisoning under *in vitro* conditions. **Current Microbiology**, New York, v. 54, p. 74–78, 2007.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Microbiology**, London, v. 22, n. 2, p. 107–149, 2003.

DÖBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 13, p. 1–13, 1992.

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

DUFFY, B. K.; DÉFAGO, G. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 65, n. 6, p. 2429–2438, 1999.

DUTTA, S. *et al.* Two rhizobacterial strains, individually and in interactions with *Rhizobium* sp., enhance fusarial wilt control, growth, and yield in pigeon pea. **Journal of Microbiology**, Heidelberg, v. 52, n. 9, p. 778–784, 2014.

EGAMBERDIEVA, D. *et al.* A synergistic interaction between salt-tolerant *Pseudomonas* and *Mesorhizobium* strains improves growth and symbiotic performance of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.) under salt stress. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 100, n. 6, p. 2829–2841, 2016.

EGAMBERDIEVA, D. *et al.* Endophytic bacteria improve plant growth, symbiotic performance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and induce suppression of root rot caused by *Fusarium solani* under salt stress. **Frontiers in Microbiology**,



Lausanne, v. 8, [art.] 1887, [p. 1–13], 2017a.

EGAMBERDIEVA, D. *et al.* Coordination between *Bradyrhizobium* and *Pseudomonas* alleviates salt stress in soybean through altering root system architecture. **Journal of Plant Interactions**, Abingdon, v. 12, n. 1, p. 100–107, 2017b.

EGAMBERDIEVA, D.; JABBOROVA, D.; BERG, G. Synergistic interactions between *Bradyrhizobium japonicum* and the endophyte *Stenotrophomonas rhizophila* and their effects on growth, and nodulation of soybean under salt stress. **Plant and Soil**, The Hague, v. 405, n. 1/2, p. 35–45, 2016.

ELKOCA, E.; TURAN, M.; DONMEZ, M. F. Effects of single, dual and triple inoculations with *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* on nodulation, nutrient uptake, yield and yield parameters of common bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. 'Elkoca-05'). **Journal of Plant Nutrition**, Athens, v. 33, n. 14, p. 2104–2119, 2010.

EMAMI, S. *et al.* Consortium of endophyte and rhizosphere phosphate solubilizing bacteria improves phosphorous use efficiency in wheat cultivars in phosphorus deficient soils. **Rhizosphere**, Amsterdam, v. 14, [art.] 100196, 2020.

ENGEL, M. L. **Resgate e propagação vegetativa por estaquia e miniestaquia de *Acacia mearnsii* De Wildeman (acácia negra)**. 2017. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Forestal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

ETESAMI, H.; EMAMI, S.; ALIKHANI, H. A. Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects - a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Chillán, v. 17, n. 4, p. 897–911, 2017.

ETESAMI, H.; MAHESHWARI, D. K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 156, p. 225–246, 2018.

FAGOTTI, D. S. L. *et al.* Quorum sensing communication: *Bradyrhizobium-Azospirillum* interaction via N-acyl-homoserine lactones in the promotion of soybean symbiosis. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 59, n. 1, p. 38–53, 2019.

FERGUSON, L.; LESSENGER, J. E. Plant growth regulators. *In*: LESSENGER, J. E. (ed.). **Agricultural medicine**. New York: Springer, 2006. p. 156–166.

FERNANDEZ, O. *et al.* *Burkholderia phytofirmans* PsJN acclimates grapevine to cold by modulating carbohydrate metabolism. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 25, n. 4, p. 496–504, 2012a.

FERNANDEZ, O. *et al.* Trehalose metabolism is activated upon chilling in grapevine and might participate in *Burkholderia phytofirmans* induced chilling tolerance. **Planta**, Berlin, v. 236, n. 2, p. 355–369, 2012b.

FERREIRA, L. D. V. M. *et al.* Co-inoculation of selected nodule endophytic rhizobacterial strains with *Rhizobium tropici* promotes plant growth and controls damping off in common bean. **Pedosphere**, Beijing, v. 30, n. 1, p. 98–108, 2020.

FERREIRA, L. DE V. M. *et al.* Growth promotion of common bean and genetic diversity of bacteria from Amazon pastureland. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 75, n. 6, p. 461–469, 2018.

FIGUEIREDO, M. V. B. *et al.* Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 40, n. 1, p. 182–188, 2008.

FIGUEREDO, M. S. *et al.* Induced systemic resistance and symbiotic performance of peanut plants challenged with fungal pathogens and co-inoculated with the biocontrol agent *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. **Microbiological Research**, Jena, v. 197, p. 65–73, 2017.

FILIPINI, L. D. *et al.* Application of *Azospirillum* on seeds and leaves, associated with *Rhizobium* inoculation, increases growth and yield of common bean. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 203, n. 3, p. 1033–1038, 2021.

FINGER, R.; BUCHMANN, N. An ecological economic assessment of risk-reducing effects of species diversity in managed grasslands. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 110, p. 89–97, 2015.

FOELKEL, C. **The *Eucalyptus* and the Leguminosae. Part 01: *Acacia mearnsii*.** [S. l.: s. n.], 2008.

FOGAÇA, C. M.; FETT-NETO, A. G. Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of *Eucalyptus* species differing in recalcitrance. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 45, n. 1, p. 1–10, 2005.

FOX, S. L.; O'HARA, G. W.; BRÄU, L. Enhanced nodulation and symbiotic effectiveness of *Medicago truncatula* when co-inoculated with *Pseudomonas fluorescens* WSM3457 and *Ensifer (Sinorhizobium) medicae* WSM419. **Plant and Soil**, The Hague, v. 348, n. 1/2, p. 245–254, 2011.

FRANCO-FRANKLIN, V.; MORENO-RIASCOS, S.; GHNEIM-HERRERA, T. Are endophytic bacteria an option for increasing heavy metal tolerance of plants? A meta-analysis of the effect size. **Frontiers in Environmental Science**, Lausanne, v. 8, [art.] 603668, [p. 1–11], 2021.

- FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 20, n. 1, p. 68–74, 1994.
- FREITAS, J. R.; GUPTA, V. V. S. R.; GERMIDA, J. J. Influence of *Pseudomonas syringae* R25 and *P. putida* R105 on the growth and N<sub>2</sub> fixation (acetylene reduction activity) of pea (*Pisum sativum* L.) and field bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 16, n. 3, p. 215–220, 1993.
- FUENTES-RAMIREZ, L. E.; CABALLERO-MELLADO, J. Bacterial biofertilizers. *In*: SIDDIQUI, Z. A. (ed.). **PGPR: biocontrol and biofertilization**. Amsterdam: Springer, 2006. p. 143–172.
- GABRE, V. V. *et al.* Multiple effect of different plant growth promoting microorganisms on beans (*Phaseolus vulgaris* L.) crop. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 63, p. 1–11, 2020.
- GALINDO, F. S. *et al.* Nitrogen recovery from fertilizer and use efficiency response to *Bradyrhizobium* sp. and *Azospirillum brasilense* combined with N rates in cowpea-wheat crop sequence. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 157, n. 5, [art.] 103764, 2021.
- GAMALERO, E. *et al.* Synergistic interactions between the ACC deaminase-producing bacterium *Pseudomonas putida* UW4 and the AM fungus *Gigaspora rosea* positively affect cucumber plant growth. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 64, n. 3, p. 459–467, 2008.
- GAMALERO, E.; GLICK, B. R. Bacterial modulation of plant ethylene levels. **Plant Physiology**, Rockville, v. 169, p. 13–22, 2015.
- GARCIA DE SALAMONE, I. E.; HYNES, R. K.; NELSON, L. M. Role of cytokinins in plant growth promotion by rhizosphere bacteria. *In*: SIDDIQUI, Z. Z. (ed.). **PGPR: biocontrol and biofertilization**. Amsterdam: Springer, 2006. cap. 6, p. 173–195.
- GARCIA, M. V. C.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Combining microorganisms in inoculants is agronomically important but industrially challenging: case study of a composite inoculant containing *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* for the soybean crop. **AMB Express**, Heidelberg, v. 11, n. 1, [art.] 71, 2021.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008.
- GETAHUN, A. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria isolated from degraded habitat enhance drought tolerance of Acacia (*Acacia abyssinica* Hochst. Ex benth.) seedlings. **International Journal of Microbiolog**, Nasr City, v. 2020, [art.] 8897998, 2020.

GHOSH, P. K.; DE, T. K.; MAITI, T. K. Role of ACC deaminase as a stress ameliorating enzyme of plant growth-promoting rhizobacteria useful in stress agriculture: a review. *In*: MEENA, V. S. (ed.). **Role of rhizospheric microbes in soil**. Almora: Springer, 2018. v. 1, p. 57–106.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p. 109–117, 1995.

GLICK, B. R. *et al.* Critical reviews in plant sciences promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 26, p. 227–242, 2007.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, Cairo, v. 2012, [art.] 963401, [p. 1–16], 2012.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, Jena, v. 169, n. 1, p. 30–39, 2014.

GOU, J. *et al.* Tissue-specific expression of *Populus* C 19 GA 2-oxidases differentially regulate above- and below-ground biomass growth through control of bioactive GA concentrations. **New Phytologist**, Oxford, v. 192, p. 626–639, 2011.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 37, p. 395–412, 2005.

GROBELAK, A.; NAPORA, A.; KACPRZAK, M. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 84, p. 22–28, 2015.

GROVER, M. *et al.* PGPR mediated alterations in root traits: way toward sustainable crop production. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, Lausanne, v. 4, [art.] 618230, [p. 1–28], 2021.

GUPTA, A. *et al.* Effect of plant growth promoting rhizobacteria on competitive ability of introduced *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) for nodulation. **Microbiological Research**, Jena, v. 153, n. 2, p. 113–117, 1998.

GUPTA, S.; PANDEY, S. ACC deaminase producing bacteria with multifarious plant growth promoting traits alleviates salinity stress in french bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, [art.] 1506, [p. 1–17], 2019.

GYANESHWAR, P. *et al.* Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 245, p. 83–93, 2002.

HAHN, L. *et al.* Growth promotion of maize hybrids inoculated with rhizobia and diazotrophic associative bacteria. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 19, n. 1/2, p. 46–56, 2013.

HAHN, L. *et al.* Rhizobial inoculation, alone or coinoculated with *azospirillum brasilense*, promotes growth of wetland rice. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 40, [art.] e0160006, [p. 1–15], 2016.

HAKIM, S. *et al.* Illumina sequencing of 16S rRNA tag shows disparity in rhizobial and non-rhizobial diversity associated with root nodules of mung bean (*Vigna radiata* L.) growing in different habitats in Pakistan. **Microbiological Research**, Jena, v. 231, [art.] 126356, 2020.

HAMER, U.; MARSCHNER, B. Priming effects in different soil types induced by fructose, alanine, oxalic acid and catechol additions. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 37, n. 3, p. 445–454, 2005.

HAN, Q. *et al.* Variation in rhizosphere microbial communities and its association with the symbiotic efficiency of rhizobia in soybean. **ISME Journal**, London, v. 14, n. 8, p. 1915–1928, 2020.

HARTMANN, A.; ROTHBALLER, M.; SCHMID, M. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. **Plant and Soil**, The Hague, v. 312, n. 1/2, p. 7–14, 2008.

HASSAN, T. U.; BANO, A. The stimulatory effects of L-tryptophan and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on soil health and physiology of wheat. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Chillán, v. 15, n. 1, p. 190–201, 2015.

HAYAT, R. *et al.* Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, Berlin, v. 60, n. 4, p. 579–598, 2010.

HEDGES, L. V.; GUREVITCH, J.; CURTIS, P. S. The meta-analysis of response ratios in experimental ecology. **Ecology**, Washington, DC, v. 80, n. 4, p. 1150–1156, 1999.

HIGA, R. C. V *et al.* Acácia-negra. In: MONTEIRO, J. E. B. A. (ed.). **Agrometeorologia dos cultivos: o fator meteorológico da produção agrícola**. Brasília, DF: INMET, 2009. p. 313–319.

HILTNER, L. Ueber neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiete der bodenbakteriologie und unter besonderer berucksichtigung der grundung und brache. **Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft**, [Frankfurt], v. 98, p. 59–78, 1904.

HOPPE, J. M. *et al.* Aplicação de diferentes doses de Bacsol® e Orgasol® em sementes de acácia-negra (*Acacia mearnsii* D. Willd.) e seu desenvolvimento no

viveiro. *In*: UFSM. **Relatório técnico “Uso do Bacsol® em diferentes pesquisas”**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2004a. cap. 2, p. 43–56.

HOPPE, J. M. *et al.* Utilização de Bacsol e Orgasol na produção de mudas de *Pinus elliottii*. *In*: UFSM. **Relatório técnico “Uso do Bacsol® em diferentes pesquisas”**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2004b. p. 96–102.

HUNGRIA, M. *et al.* Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 331, n. 1, p. 413–425, 2010.

HUNGRIA, M. *et al.* Correction to: Seed and leaf-spray inoculation of PGPR in brachiarias (*Urochloa* spp.) as an economic and environmental opportunity to improve plant growth, forage yield and nutrient status **Plant and Soil**, The Hague, v. 466, n. 1/2, [art.] 675, 2021.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 39, n. 2, p. 88–93, 2003.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? *In*: BRUIJN, F. J. (ed.). **Biological nitrogen fixation**. Hoboken: John Wiley, 2015. v. 2–2, cap. 99. p. 1009–1024.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 49, n. 7, p. 791–801, 2013.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Alternative methods of soybean inoculation to overcome adverse conditions at sowing. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 10, n. 23, p. 2329–2338, 2015.

HUO, C.; LUO, Y.; CHENG, W. Rhizosphere priming effect: a meta-analysis. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 111, p. 78–84, 2017.

IGUAL, J. *et al.* Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. **Agronomie**, Paris, v. 21, p. 561–568, 2001.

IKEDA, A. C. *et al.* Effect of IBA and rhizobacterium in rooting of Black wattle minicuttings. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 15, n. 6, p. 47–54, 2019.

ILANGUMARAN, G.; SCHWINGHAMER, T. D.; SMITH, D. L. Rhizobacteria from root nodules of an indigenous legume enhance salinity stress tolerance in

soybean. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, Lausanne, v. 4, [art.] 617978, 2021.

IQBAL, M. A. *et al.* Uso integrado de *Rhizobium leguminosarum*, rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal y compost enriquecido para mejorar el crecimiento, nodulación y rendimiento de lenteja (*Lens culinaris* medik.). la mantención de una alta población bacteriana. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, v. 72, n. 1, p. 104–110, 2012.

JABBOROVA, D. *et al.* Co-inoculation of rhizobacteria and biochar application improves growth and nutrients in soybean and enriches soil nutrients and enzymes. **Agronomy**, Basel, v. 10, n. 8, [art.] 1142, 2020.

JABBOROVA, D. *et al.* Co-inoculation of rhizobacteria promotes growth, yield, and nutrient contents in soybean and improves soil enzymes and nutrients under drought conditions. **Scientific Reports**, London, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2021.

JABBOROVA, D. P. *et al.* Effect of co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Pseudomonas putida* on root morph-architecture traits, nodulation and growth of soybean in response to phosphorus supply under hydroponic conditions. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, Sofia, v. 24, n. 6, p. 1004–1011, 2018.

JESUS, E. C. *et al.* Co-inoculation of *Bradyrhizobium* stimulates the symbiosis efficiency of *Rhizobium* with common bean. **Plant and Soil**, The Hague, v. 425, n. 1/2, p. 201–215, 2018.

JIAN, L. *et al.* Promotion of growth and metal accumulation of alfalfa by coinoculation with *Sinorhizobium* and *Agrobacterium* under copper and zinc stress. **PeerJ**, Corte Madera, v. 2019, n. 5, p. 1–20, 2019.

JU, W. *et al.* Impact of co-inoculation with plant-growth-promoting rhizobacteria and rhizobium on the biochemical responses of alfalfa-soil system in copper contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 167, n. 9, p. 218–226, 2019.

JU, W. *et al.* Rhizobacteria inoculation benefits nutrient availability for phytostabilization in copper contaminated soil: drivers from bacterial community structures in rhizosphere. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 150, n. 11, [art.] 103450, 2020.

KAUFMANN, M.; MICHEL, B. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 51, p. 914–916, 1973.

KAUR, N.; SHARMA, P.; SHARMA, S. Co-inoculation of *Mesorhizobium* sp. and plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas* sp. as bio-enhancer and bio-fertilizer in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Legume Research**, New Delhi, v. 38, n.

3, p. 367–374, 2015.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019. v. 1

KHALID, A. *et al.* Effect of substrate-dependent microbial ethylene production on plant growth. **Microbiology**, Moskva, v. 75, n. 2, p. 231–236, 2006.

KHALID, A. *et al.* Role of ethylene and bacterial acc- deaminase in nodulation of legumes. *In*: ZAIDI, A.; KHAN, M. S.; MUSARRAT, J. (ed.). **Microbes for legume improvement**. 2nd ed. Cham: Springer, 2017. p. 95–118.

KHALIFA, A. Y. Z.; ALMALKI, M. A. Isolation and characterization of an endophytic bacterium, *Bacillus megaterium* BMN1, associated with root-nodules of *Medicago sativa* L. growing in Al-Ahsaa region, Saudi Arabia. **Annals of Microbiology**, Moskva, v. 65, n. 2, p. 1017–1026, 2015.

KHAN, A. G. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Stuttgart, v. 18, n. 4, p. 355–364, 2005.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; AHMAD, E. Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. *In*: KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. (ed.). **Phosphate solubilizing microorganisms: principles and application of microphos technology**. Cham: Springer, 2014. p. 31–62.

KHAN, N. *et al.* Inoculation with a microbe isolated from the negev desert enhances corn growth. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 11, n. 6, [art.] 1149, [p. 1–12], 2020.

KHANNA, V.; SHARMA, P. Potential for enhancing lentil (*Lens culinaris*) productivity by co-inoculation with PSB, plant growth-promoting rhizobacteria and *Rhizobium*. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, Karnal, v. 81, n. 10, p. 932–934, 2011.

KHATABI, B.; SCHÄFER, P. Ethylene in mutualistic symbioses. **Plant Signaling and Behavior**, Austin, v. 7, p. 1634–1638, 2012.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANGEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v. 44, n. 2, p. 301–307, 1954.

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



- KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. **Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 4., 1978, Angers. **Proceedings of the** [...]. Angers: Station de Pathologie Végétale et de Phytobactériologie, INRA, 1978.
- KNOWLES, C. J. Microorganisms and cyanide. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 40, n. 3, p. 652–680, 1976.
- KORIR, H. *et al.* Co-inoculation effect of rhizobia and plant growth promoting rhizobacteria on common bean growth in a low phosphorus soil. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, n. 2, [art.] 141, [p. 1–10], 2017.
- KRAVCHENKO, L. V *et al.* The effect of tryptophan present in plant root exudates on the phytostimulating activity of rhizobacteria. **Microbiology**, New York, v. 73, n. 2, p. 195–198, 2004.
- KUMAR, A. *et al.* Does a plant growth promoting rhizobacteria enhance agricultural sustainability? **Journal of Pure and Applied Microbiology**, Bhopal, v. 9, n. 1, p. 715–724, 2015.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.
- KUMAWAT, K. C. *et al.* Co-existence of *Leclercia adecarboxylata* (LSE-1) and *Bradyrhizobium* sp. (LSBR-3) in nodule niche for multifaceted effects and profitability in soybean production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 35, n. 11, p. 1–17, 2019a.
- KUMAWAT, K. C. *et al.* Synergism of *Pseudomonas aeruginosa* (LSE-2) nodule endophyte with *Bradyrhizobium* sp. (LSBR-3) for improving plant growth, nutrient acquisition and soil health in soybean. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 35, n. 3, [art.] 47, 2019b.
- KUMAWAT, K. C. *et al.* Dual microbial inoculation, a game changer? – Bacterial biostimulants with multifunctional growth promoting traits to mitigate salinity stress in spring mungbean. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 11, [art.] 600576, 2021.
- KUZMICHEVA, Y. V. *et al.* Variety specific relationships between effects of rhizobacteria on root exudation, growth and nutrient uptake of soybean. **Plant and Soil**, The Hague, v. 419, n. 1/2, p. 83–96, 2017.
- LAVILLE, J. *et al.* Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 180, n. 12, p. 3187–3196, 1998.

LE, X. H. *et al.* Isolation and characterisation of endophytic actinobacteria and their effect on the early growth and nodulation of lucerne (*Medicago sativa* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 405, n. 1/2, p. 13–24, 2016.

LEITE, R. DE A. *et al.* Co-inoculation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* promotes growth and yield of common beans. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 172, n. 11, [art.] 104356, 2022.

LI, Q.; SALEH-LAKHA, S.; GLICK, B. R. The effect of native and ACC deaminase-containing *Azospirillum brasilense* Cd1843 on the rooting of carnation cuttings. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 51, p. 511–514, 2005.

LIMA, M. H. M. E. *et al.* Características nutricionais de feno de híbridos de sorgo (*Sorghum sudanense* x *Sorghum bicolor*). **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, Maringá, v. 39, n. 3, p. 229–234, 2017.

MACHADO, R. G. *et al.* Rhizobia symbionts of legume forages native to South Brazil as promoters of cultivated grass growing. **International Journal of Agriculture and Biology**, Faisalabad, v. 18, n. 5, p. 1011–1016, 2016.

MAFIA, R. G. *et al.* Effect of rhizobacteria on rooting and growth of *Eucalyptus* clones under different conditions of clonal propagation. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 5, p. 813–821, 2007.

MAPHOSA, Y.; JIDEANI, V. A. The role of legumes in human nutrition. *In*: HUEDA, M. C. (ed.). **Functional Food - Improve Health through Adequate Food**. London: Intechopen, 2017. p. 103-121.

MARINKOVIĆ, J. *et al.* Effects of soybean co-inoculation with plant growth promoting rhizobacteria in field trial. **Romanian Biotechnological Letters**, Bucharest, v. 23, n. 2, p. 13401-13408, 2018.

MASCIARELLI, O.; LLANES, A.; LUNA, V. A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. **Microbiological Research**, Jena, v. 169, n. 7/8, p. 609–615, 2014.

MATSE, D. T. *et al.* Effects of coinoculation of *Rhizobium* with plant growth promoting rhizobacteria on the nitrogen fixation and nutrient uptake of *Trifolium repens* in low phosphorus soil. **Journal of Plant Nutrition**, Athens, v. 43, n. 5, p. 739–752, 2020.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, p. 565–572, 2004.

MCNEAR, D. H. Jr. The Rhizosphere - Roots, soil and everything in between.

**Nature Education Knowledge**, Rotterdam, v. 4, n. 3, [art.] 1, 2013.

MENDOZA-SUÁREZ, M. *et al.* Competition, nodule occupancy, and persistence of inoculant strains: key factors in the *Rhizobium*-legume symbioses. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 12, n. 8, [art.] 690567, 2021.

MICHELSEN, C. F.; STOUGAARD, P. Hydrogen cyanide synthesis and antifungal activity of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* In5 from Greenland is highly dependent on growth medium. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 58, p. 381–390, 2012.

MILLAR, R. L.; HIGGINS, V. J. Association of cyanide with infection of birdfoot trefoil by *Stemphylium loti*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, p. 104–110, 1970.

MIRANSARI, M.; SMITH, D. Rhizobial lipo-chitooligosaccharides and gibberellins enhance barley (*Hordeum vulgare* L.) seed germination. **Biotechnology**, Faisalabad, v. 8, n. 2, p. 270–275, 2009.

MIRZA, B. S. *et al.* Coinoculation of chickpea with *Rhizobium* isolates from roots and nodules and phytohormone-producing *Enterobacter* strains. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v. 47, n. 8, p. 1008–1015, 2007.

MISHRA, A.; PRASAD, K.; RAI, G. Effect of bio-fertilizer inoculations on growth and yield of dwarf field pea (*Pisum sativum* L.) in conjunction with different doses of chemical fertilizers. **Journal of Agronomy**, Faisalabad, v. 9, n. 4, p. 163–168, 2010.

MISHRA, P. K. *et al.* Coinoculation of *Bacillus thuringiensis*-KR1 with *Rhizobium leguminosarum* enhances plant growth and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 25, n. 5, p. 753–761, 2009.

MISHRA, P. K. *et al.* Synergistic effect of inoculating plant growth-promoting *Pseudomonas* spp. and *Rhizobium leguminosarum*-FB1 on growth and nutrient uptake of rajmash (*Phaseolus vulgaris* L.). **Archives of Agronomy and Soil Science**, Berlin, v. 60, n. 6, p. 799–815, 2014.

MISHRA, R. K. *et al.* Influence of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on the productivity of *Pelargonium graveolens* L. Herit. **Recent Research in Science and Technology**, [Al Ain], v. 2, n. 5, p. 53–57, 2010.

MONTEIRO, P. H. R. *et al.* Responses of *Eucalyptus benthamii* seedlings to the application of the organic fertilizer Bacsol. **Revista Bosque**, Valdivia, v. 38, p. 507–513, 2017.

MONTEIRO, P. H. R. *et al.* Rhizobial inoculation in black wattle plantation (*Acacia*

*mearnsii* De Wild.) in production systems of southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 50, n. 4, p. 989–998, 2019.

MONTERO-CALASANZ, M. C. *et al.* Alternative rooting induction of semi-hardwood olive cuttings by several auxin-producing bacteria for organic agriculture systems. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 11, n. 1, p. 146–154, 2013.

MORA, A. L. *et al.* Melhoramento genético para a produção de tanino no Brasil. *In*: WORKSHOP SOBRE MELHORAMENTO GENÉTICO DE ESPÉCIES FLORESTAIS E PALMÁCEAS. **Anais [...]**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2001.

MORA, A. L. **Aumento da produção de sementes geneticamente melhoradas de *Acacia mearnsii* De Wild. (Acácia negra) no Rio Grande do Sul.** 2002. 161 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

MORCILLO, R. J. L.; MANZANERA, M. The effects of plant-associated bacterial exopolysaccharides on plant abiotic stress tolerance. **Metabolites**, Basel, v. 11, n. 6, [art.] 337, 2021.

MOREIRA, F. M. D. S. *et al.* Diazotrophic associative bacteria: diversity, ecology and potential applications. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 1, n. 2, p. 74–99, 2010.

MOREL, M. A. *et al.* The pattern of secreted molecules during the co-inoculation of alfalfa plants with *Sinorhizobium meliloti* and *Delftia* sp. strain JD2: an interaction that improves plant yield. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 28, n. 2, p. 134–142, 2015.

MORETTI, L. G. *et al.* Effects of growth-promoting bacteria on soybean root activity, plant development, and yield. **Agronomy Journal**, Madison, v. 112, n. 1, p. 418–428, 2020.

MOTA, F. F.; GOMES, E. A.; SELDIN, L. Auxin production and detection of the gene coding for the auxin efflux carrier (AEC) protein in *Paenibacillus polymyxa*. **The Journal of Microbiology**, Heidelberg, v. 46, n. 3, p. 257–264, 2008.

MSIMBIRA, L. A.; SMITH, D. L. The roles of plant growth promoting microbes in enhancing plant tolerance to acidity and alkalinity stresses. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, Lausanne, v. 4, [art.] 106, [p. 1–14], 2020.

MÜLLER, I. **Avaliação da produtividade da *Acacia mearnsii* De Wild. (Acácia negra) em função de diferentes espaçamentos.** 2006. 133 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

- MUNIZ, A. W. *et al.* Rooting and acclimatization of micropropagated Marubakaido apple rootstock using *Adesmia latifolia* rhizobia. **SpringerPlus**, [Switzerland], v. 2, n. 1, p. 1–6, 2013.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 15, p. 473–497, 1962.
- NADEEM, S. M. *et al.* The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. **Biotechnology Advances**, New York, v. 32, n. 2, p. 429–448, 2014.
- NAGARAJKUMAR, M.; BHASKARAN, R.; VELAZHAHAN, R. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. **Microbiological Research**, Jena, v. 159, p. 73–81, 2004.
- NAGPAL, S. *et al.* Chickpea (*Cicer arietinum* L.) as model legume for decoding the co-existence of *Pseudomonas fluorescens* and *Mesorhizobium* sp. as bio-fertilizer under diverse agro-climatic zones. **Microbiological Research**, Jena, v. 247, n. 2, [art.] 126720, 2021.
- NANDI, M. *et al.* Hydrogen cyanide, which contributes to *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23 biocontrol, is upregulated in the presence of glycine. **Biological Control**, Orlando, v. 108, p. 47–54, 2017.
- NASCIMENTO, F. X. *et al.* *Mesorhizobium ciceri* LMS-1 expressing an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase increases its nodulation abilities and chickpea plant resistance to soil constraints. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 55, n. 1, p. 15–21, 2012.
- NASCIMENTO, F. X. *et al.* The role of rhizobial acc deaminase in the nodulation process of leguminous plants. **International Journal of Agronomy**, London, v. 1, [art.] ID 1369472, 2016.
- NASCIMENTO, F. X. *et al.* The modulation of leguminous plant ethylene levels by symbiotic rhizobia played a role in the evolution of the nodulation process. **Heliyon**, London, v. 4, [art.] e01068, [p. 1–18], 2018.
- NASCIMENTO, F. X. *et al.* ACC deaminase plays a major role in *Pseudomonas fluorescens* YsS6 ability to promote the nodulation of Alpha- and Betaproteobacteria rhizobial strains. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 201, n. 6, p. 817–822, 2019.
- NASEEM, H.; BANO, A. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize. **Journal of Plant Interactions**,

Abingdon, v. 9, n. 1, p. 689–701, 2014.

NIMNOI, P.; PONGSILP, N.; LUMYONG, S. Co-inoculation of soybean (*Glycine max*) with actinomycetes and *Bradyrhizobium japonicum* enhances plant growth, nitrogenase activity and plant nutrition. **Journal of Plant Nutrition**, Athens, v. 37, n. 3, p. 432–446, 2014.

NIU, X. *et al.* Drought-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria associated with foxtail millet in a semi-arid and their potential in alleviating drought stress. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, [art.] 2580, [p. 1–11], 2018.

OLANREWAJU, O. S.; GLICK, B.; BABALOLA, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 33, n. 11, p. 1–16, 2017.

OLIVEIRA, C. A. *et al.* **Viabilidade técnica e econômica do Biomaphos® (*Bacillus subtilis* CNPMS B2084 e *Bacillus megaterium* CNPMS B119) nas culturas de milho e soja.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2020. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 210).

OLIVEIRA, D. M. *et al.* Inoculation of plant-growth-promoting rhizobacteria in *Myracrodruon urundeuva* Allemão supports in tolerance to drought stress. **Journal of Plant Interactions**, Abingdon, v. 13, n. 1, p. 91–99, 2018.

OLIVEIRA-LONGATTI, S. M.; MARRA, L. M.; MOREIRA, F. M. S. Evaluation of plant growth-promoting traits of *Burkholderia* and *Rhizobium* strains isolated from Amazon soils for their co-inoculation in common bean. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 7, n. 11, p. 948–959, 2013.

OLIVEIRA-LONGATTI, S. M. *et al.* *Burkholderia fungorum* promotes common bean growth in a dystrophic oxisol. **Annals of Microbiology**, Berlin, v. 65, n. 4, p. 1825–1832, 2015.

OLIVEIRA, H. A. **Acácia-negra e tanino no Rio Grande do Sul.** Canoas: La Salle, 1968.

OLIVEIRA, R. S. *et al.* Increased protein content of chickpea (*Cicer arietinum* L.) inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen-fixing bacteria under water deficit conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 97, n. 13, p. 4379–4385, 2017.

PAÇO, A. *et al.* Exogenous acc deaminase is key to improving the performance of pasture Legume-Rhizobial symbioses in the presence of a high manganese concentration. **Plants**, Basel, v. 9, n. 12, [art.] 1630, [p. 1–23], 2020.

PAIVA, C. A. O. *et al.* **Recomendação agrônômica de cepas de *Bacillus subtilis* (CNPMS B2084) e *Bacillus megaterium* (CNPMS B119) na cultura do**

**milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2020. 19 p. (Circular Técnica, 260).

PAL, K. K. *et al.* Antifungal characteristics of a fluorescent *Pseudomonas* strain involved in the biological control of *Rhizoctonia solani*. **Microbiological Research**, Jena, v. 155, n. 3, p. 233–242, 2000.

PAN, B.; VESSEY, J. K.; SMITH, D. L. Response of field-grown soybean to co-inoculation with the plant growth promoting rhizobacteria *Serratia proteamaculans* or *Serratia liquefaciens*, and *Bradyrhizobium japonicum* pre-incubated with genistein. **European Journal of Agronomy**, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 143–153, 2002.

PANDEY, P.; MAHESHWARI, D. K. Two-species microbial consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*. **Current Science**, v. 92, n. 8, p. 1137–1142, 2007.

PASTOR-BUEIS, R. *et al.* Yield response of common bean to co-inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas* endophytes and microscopic evidence of different colonised spaces inside the nodule. **European Journal of Agronomy**, Amsterdam, v. 122, [art.] 126187, 2021.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 68, n. 8, p. 3795–3801, 2002.

PLAUT, J. A. *et al.* Reduced transpiration response to precipitation pulses precedes mortality in a piñon-juniper woodland subject to prolonged drought. **New Phytologist**, Oxford, v. 200, n. 2, p. 375–387, 2013.

PODILE, A. R.; KISHORE, G. K. Plant growth-promoting rhizobacteria. *In*: GNANAMANICKAM, S. S. (ed.). **Plant-associated bacteria**. Cham: Springer, 2006. p. 195–230.

POURBABAEE, A. A. *et al.* Promotion of wheat growth under salt stress by halotolerant bacteria containing ACC deaminase. **Journal of Agricultural Science and Technology**, Libertyville, v. 18, p. 855–864, 2016.

QIN, H.; HE, L.; HUANG, R. The coordination of ethylene and other hormones in primary root development. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 10, [art.] 874, 2019.

QUOIRIN, M. *et al.* Multiplication of juvenile black wattle by microcuttings. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 66, p. 199–205, 2001.

QURESHI, M. A. *et al.* Co-inoculation of phosphate solubilizing bacteria and rhizobia for improving growth and yield of mungbean (*Vigna radiata* L.). **Journal of Animal and Plant Sciences**, Lahore, v. 21, n. 3, p. 491–497, 2011.

RADOVIC, J.; SOKOLOVIC, D.; MARKOVIC, J. Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. **Biotechnology in Animal Husbandry**, Beograd-Zemun, v. 25, n. 5/6, p. 465–475, 2009.

RAGHUWANSHI, R.; PRASAD, J. K. Perspectives of Rhizobacteria with ACC deaminase activity in plant growth under abiotic stress. *In*: GIRI, B.; PRASAD, R.; VARMA, A. (ed.). **Root biology**. Cham: Springer, 2018. p. 303–321.

RAMETTE, A.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; DÉFAGO, G. Genetic diversity and biocontrol potential of fluorescent pseudomonads producing phloroglucinols and hydrogen cyanide from Swiss soils naturally suppressive or conducive to *Thielaviopsis basicola*-mediated black root rot of tobacco. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 55, p. 369–381, 2006.

RAMOS-SOLANO, B. *et al.* Siderophore and chitinase producing isolates from the rhizosphere of *Nicotiana glauca* Graham enhance growth and induce systemic resistance in *Solanum lycopersicum* L. **Plant Soil**, The Hague, v. 334, p. 189–197, 2010.

RASHID, A.; RYAN, J. Micronutrient constraints to crop production in soils with mediterranean-type characteristics: a review. **Journal of Plant Nutrition**, Athens, v. 27, n. 6, p. 959–975, 2004.

RATLEDGE, C.; DOVER, L. G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 54, p. 881–941, 2000.

RAVANBAKHSI, M. *et al.* ACC deaminase-producing rhizosphere bacteria modulate plant responses to flooding. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 105, p. 979–986, 2017.

REQUENA, N. *et al.* Interactions between plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in mediterranean semi-arid ecosystems. **New Phytologist**, Oxford, v. 136, n. 4, p. 667–677, 1997.

REYES-CASTILLO, A. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria able to improve NPK availability: selection, identification and effects on tomato growth. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, v. 79, p. 473–485, 2019.

REZZONICO, F. *et al.* Is the ability of biocontrol fluorescent pseudomonads to produce the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection? **New Phytologist**, Oxford, v. 173, p. 861–872, 2006.

RHO, H. *et al.* Do endophytes promote growth of host plants under stress? A meta-analysis on plant stress mitigation by endophytes. **Microbial Ecology**, New York, v. 75, n. 2, p. 407–418, 2018.



RICHARDSON, A. E.; SIMPSON, R. J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. **Plant Physiology**, Rockville, v. 156, p. 989–996, 2011.

RONDINA, A. B. L. *et al.* Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* or treated with *A. brasilense* exudates. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 56, n. 4, p. 537–549, 2020.

ROSENBERG, M. S. The file-drawer problem revisited: a general weighted method for calculating fail-safe numbers in meta-analysis. **Evolution**, Lancaster, v. 59, n. 2, p. 464–468, 2005.

ROSIER, A.; BEAUREGARD, P. B.; BAIS, H. P. Quorum quenching activity of the PGPR *Bacillus subtilis* UD1022 alters nodulation efficiency of *Sinorhizobium meliloti* on *Medicago truncatula*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 11, [art.] 596299, 2021.

ROUSK, J.; BROOKES, P. C.; BÅÅTH, E. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 75, n. 6, p. 1589–1596, 2009.

RUBIN, R. L.; VAN GROENIGEN, K. J.; HUNGATE, B. A. Plant growth promoting rhizobacteria are more effective under drought: a meta-analysis. **Plant and Soil**, The Hague, v. 416, n. 1/2, p. 309–323, 2017.

RUDRAPPA, T. *et al.* Cyanogenic pseudomonads influence multitrophic interactions in the Rhizosphere. **Plos One**, San Francisco, v. 3, n. 4, [art.] e2073, [p. 1–11], 2008.

SAFARI, D. *et al.* Evaluation of ACC deaminase producing *Pseudomonas fluorescens* strains for their effects on seed germination and early growth of wheat under salt stress. **Australian Journal of Crop Science**, Brisbane, v. 12, n. 3, p. 413–421, 2018.

SAFRONOVA, V. I. *et al.* Relationships between pasture legumes, rhizobacteria and nodule bacteria in heavy metal polluted mine waste of SW Sardinia. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 58, n. 1/3, p. 149–159, 2012.

SAIDI, S. *et al.* Improvement of medicago sativa crops productivity by the co-inoculation of *Sinorhizobium meliloti*–actinobacteria under salt stress. **Current Microbiology**, New York, v. 78, n. 4, p. 1344–1357, 2021.

SAINI, R. *et al.* Isolation, characterization, and evaluation of bacterial root and nodule endophytes from chickpea cultivated in Northern India. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 55, n. 1, p. 74–81, 2015.

- SALEM, S. *et al.* Inoculation of *Phaseolus vulgaris*, *Medicago laciniata* and *Medicago polymorpha* with *Agrobacterium* sp. strain 10C2 may enhance nodulation and shoot dry weight but does not affect host range specificity. **Annals of Microbiology**, Berlin, v. 62, n. 4, p. 1811–1817, 2012.
- SALLES, E. A. P. B. **Micropropagação de *Acacia mearnsii* De Wild.** 2014. 118 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- SALVAGIOTTI, F. *et al.* Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: a review. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 1–13, 2008.
- SAMAVAT, S.; MAFAKHERI, S.; SHAKOURI, M. J. Promoting common bean growth and nitrogen fixation by the co-inoculation of *Rhizobium* and *Pseudomonas fluorescens* isolates. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, Sofia, v. 18, n. 3, p. 387–395, 2012.
- SÁNCHEZ, A. C. *et al.* Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 62, p. 105–112, 2014.
- SANTOS, F. L. *et al.* **Nitrogênio absorvido em milho (*Zea mays* L.) inoculado com rizobactérias.** In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO, 11., 2016, Frederico Westphalen. **Anais [...]**. Viçosa, MG: SBCS: Núcleo Regional Sul, 2016.
- SANTOS, F. L. *et al.* Inoculation and co-inoculation of growth promoting rhizobacteria in irrigated rice plants. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 14, n. 3, p. 1–5, 2019.
- SANTOS, F. L. *et al.* Reduction in nitrogen fertilization in *Triticum* sp. inoculated and co-inoculated. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 15, n. 2, [art.] e7273, 2020.
- SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**, Heidelberg, v. 9, n. 1, [art.] 205, 2019.
- SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains ab-v5 and ab-v6 on the Brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 45, p. 1–31, 2021.
- SANTOYO, G. *et al.* Plant growth-promoting bacterial endophytes.

**Microbiological Research**, Jena, v. 183, p. 92–99, 2016.

SAYYED, R. Z. *et al.* Production of microbial iron chelators (siderophores) by fluorescent Pseudomonads. **Indian Journal of Biotechnology**, New Delhi, v. 4, p. 484–490, 2005.

SBCS - SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. Comissão de Química e Fertilidade do Solo. **Manual de calagem e adubação**: para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2016.

SCHAUB, S. *et al.* Plant diversity effects on forage quality, yield and revenues of semi-natural grasslands. **Nature Communications**, London, v. 11, [art.] 768, 2020.

SCHLINDWEIN, G. *et al.* Influence of rhizobial inoculation on seedling vigor and germination of lettuce. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 658–664, 2008.

SCHROTH, M. N.; HANCOCK, J. G. Disease-Suppressive Soil and Root-Colonizing Bacteria. **Science**, Washington, DC, v. 216, n. 6, p. 1376–1381, 1982.

SEYED SHARIFI, R. Biotrašos ir cinkas didina sojų derlių, gumbelių formavimąsi ir nesočiųjų riebiųjų rūgščių kiekį. **Zemdirbyste**, Kėdainių, v. 103, n. 3, p. 251–258, 2016.

SHAHAROONA, B. *et al.* Fertilizer-dependent efficiency of Pseudomonads for improving growth, yield and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 79, p. 147–155, 2008.

SHAHAROONA, B.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 155–159, 2006.

SHAHZAD, S. M. *et al.* Improving nodulation, growth and yield of *Cicer arietinum* L. through bacterial ACC-deaminase induced changes in root architecture. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 46, n. 5, p. 342–347, 2010.

SHAHZAD, S. M. *et al.* Co-inoculation integrated with P-enriched compost improved nodulation and growth of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) under irrigated and rainfed farming systems. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 50, n. 1, p. 1–12, 2014.

SHARMA, A.; JOHRI, B. N. Growth promoting influence of siderophore-producing Pseudomonas strains GRP3A and PRS 9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. **Microbiological Research**, Jena, v. 158, p. 243–248, 2003.

SHARMA, S. B. *et al.* Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springer Plus**, [Switzerland], v. 2, p. 1–14, 2013.

SHEHATA, H. S.; HAMED, E. R.; ELEIWA, M. E. Potential for improving healthy and productivity of soybean by plant growth promoting rhizobacteria. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, Faisalabad, v. 6, n. 4, p. 98–107, 2012.

SIBPONKRUNG, S. *et al.* Co-inoculation of *Bacillus velezensis* strain s141 and *Bradyrhizobium* strains promotes nodule growth and nitrogen fixation. **Microorganisms**, Basel, v. 8, n. 5, [art.] 678, 2020.

SIDDIQUI, I. A. *et al.* Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 22, p. 641–650, 2006.

SILVA, E. R. *et al.* Can co-inoculation of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* alleviate adverse effects of drought stress on soybean (*Glycine max* L. Merrill.)? **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 201, n. 3, p. 325–335, 2019.

SILVA, F. B. *et al.* Native rhizobia from southern Brazilian grassland promote the growth of grasses. **Rhizosphere**, Amsterdam, v. 16, [art.] 100240, Dec. 2020.

SIMILI, F. F. *et al.* Forage mass production and grazing loss of sorghum hybrid in response to the density of the sowing and the spacing between planting lines. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 40, n. 7, p. 1474–1479, 2011.

SINGH, N.; SINGH, G.; KHANNA, V. Growth of lentil (*Lens culinaris* medikus) as influenced by phosphorus, *Rhizobium* and plant growth promoting rhizobacteria. **Indian Journal of Agricultural Research**, Karnal, v. 50, n. 6, p. 567–572, 2016.

SKORONSKI, E. *et al.* Estudo da aplicação de tanino no tratamento de água para abastecimento captada no rio Tubarão, na cidade de Tubarão, SC. **Revista Ambiente e Água**, Taubaté, v. 9, n. 4, p. 679–687, 2014.

SOLANS, M.; VOBIS, G.; WALL, L. G. Saprophytic actinomycetes promote nodulation in *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis in the presence of high N. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 28, n. 2, p. 106–114, 2009.

SOLOMONSON, L. P. Cyanide as a metabolic inhibitor. *In*: VENNESLAND, B. *et al.* (ed.). **Cyanide in biology**. London: Academic Press, 1981. p. 11–28.

SONG, O. *et al.* Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil Ok-Ryul. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 151–156, 2008.

SOUZA, J. E. B.; FERREIRA, E. P. DE B. Improving sustainability of common bean production systems by co-inoculating rhizobia and azospirilla. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 237, p. 250–257, 2017.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 31, p. 425–448, 2007.

STAJKOVIC, O. *et al.* Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa. **Botanica Serbica**, Belgrado, v. 33, n. 1, p. 107–114, 2009.

STAJKOVIĆ, O. *et al.* Improvement of common bean growth by co-inoculation with *Rhizobium* and plant growth-promoting bacteria. **Romanian Biotechnological Letters**, Bucharest, v. 16, n. 1, p. 5919–5926, 2011.

STAR, L. *et al.* The *Vicia sativa* spp. *nigra* - *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* symbiotic interaction is improved by *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 356, n. 1/2, p. 165–174, 2012.

STEINER, F. *et al.* Co-inoculation of common bean with *rhizobium* and *azospirillum* enhance the drought tolerance. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 67, n. 5, p. 923–932, 2020a.

STEINER, F. *et al.* Peanut response to co-inoculation of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* and molybdenum application in sandy soil of the Brazilian Cerrado. **Agronomy Journal**, Madison, v. 113, n. 1, p. 623–632, 2020b.

STEINER, F.; FERREIRA, H. C. P.; ZUFFO, A. M. Can co-inoculation of *Rhizobium tropici* and *Azospirillum brasilense* increase common bean nodulation and grain yield? **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 40, n. 1, p. 81–98, 2019.

STROSCHEIN, M. R. *et al.* Characterization and influence of alfalfa rhizobia on germination and early growth of rice seedling. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 10, p. 1738–1743, 2011.

SUBRAMANIAN, P. *et al.* Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* MN110. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 76, n. 3, p. 327–332, 2015.

SULEWSKA, H. *et al.* The use of microorganisms as bio-fertilizers in the cultivation of white lupine. **Open Chemistry**, Warsaw, v. 17, n. 1, p. 813–822, 2019.

TAVARES, M. J. *et al.* The expression of an exogenous ACC deaminase by the endophyte *Serratia grimesii* BXF1 promotes the early nodulation and growth of

common bean. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 66, n. 3, p. 252–259, 2018.

TEIXEIRA, D. A. *et al.* Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 118–123, 2007.

TIAN, T. *et al.* The role of rhizodeposits in shaping rhizomicrobiome. **Environmental Microbiology Reports**, Hoboken, v. 12, n. 2, p. 160–172, 2020.

TIMMUSK, S. *et al.* Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: Enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 5, [art.] e6086, 2014.

TITTABUTR, P. *et al.* Alleviation of the effect of environmental stresses using co-inoculation of mungbean by *Bradyrhizobium* and rhizobacteria containing stress-induced ACC deaminase enzyme. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Chillán, v. 59, n. 4, p. 559–571, 2013.

TONELLI, M. L.; MAGALLANES-NOGUERA, C.; FABRA, A. Symbiotic performance and induction of systemic resistance against *Cercospora sojina* in soybean plants co-inoculated with *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium japonicum* E109. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 199, n. 9, p. 1283–1291, 2017.

TONIETO, L.; STEIN, P. P. Silvicultura da acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.) no Brasil. **Florestar Estatístico**, São Paulo, v. 4, n. 12, p. 11–16, 1997.

TOUKABRI, W. *et al.* Response of intercropped barley and fenugreek to mono- and co-inoculation with *Sinorhizobium meliloti* F42 and *Variovorax paradoxus* F310 under contrasting agroclimatic regions. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 203, n. 4, p. 1657–1670, 2021.

TSAVKELOVA, E. A. *et al.* Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Dordrecht, v. 42, n. 2, p. 117–126, 2006.

TU, T. C.; LIN, S. H.; SHEN, F. T. Enhancing symbiotic nitrogen fixation and soybean growth through co-inoculation with *Bradyrhizobium* and *Pseudomonas* isolates. **Sustainability**, Basel, v. 13, n. 20, [art.] 11539, 2021.

VALVERDE, A. *et al.* Differential effects of coinoculations with *Pseudomonas jessenii* PS06 (a phosphate-solubilizing bacterium) and *Mesorhizobium ciceri* C-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. **Plant and Soil**, The Hague, v. 287, n. 1/2, p. 43–50, 2006.

VARGAS-DÍAZ, A. A. *et al.* Isolation and evaluation of endophytic bacteria from root nodules of *Glycine max* L. (merr.) and their potential use as biofertilizers.

**Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 17, n. 3, [art.] e1103, [p. 1-13], 2019.

VARGAS, L. K. *et al.* Genetic diversity and symbiotic efficiency of black wattle-nodulating rhizobia in soils of Rio Grande do Sul state, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 31, n. 5, p. 647–654, 2007.

VERMA, J. P. *et al.* Effect of indigenous *Mesorhizobium* spp. and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 51, p. 282–286, 2013.

VERMA, J. P.; YADAV, J.; TIWARI, K. N. Application of *Rhizobium* sp. BHURC01 and plant growth promoting Rhizobacteria on nodulation, plant biomass and yields of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Agricultural Research**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 148–156, 2010.

VERMA, J. P.; YADAV, J.; TIWARI, K. N. Enhancement of nodulation and yield of chickpea by co-inoculation of indigenous *Mesorhizobium* spp. and plant growth-promoting rhizobacteria in eastern uttar pradesh. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 43, n. 3, p. 605–621, 2012.

VERSALOVIC, J. *et al.* Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polimerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 5, n. 1, p. 25–40, 1994.

VICARIO, J. C. *et al.* Promotion of peanut growth by co-inoculation with selected strains of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 35, n. 2, p. 413–419, 2016.

VIEIRA, N. D. *et al.* Response of dry bean to nitrogen fertilization and inoculation with *Rhizobium tropici* and *Azospirillum brasilense*. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 52, n. 7, p. 686–694, 2021.

VIJAYABHARATHI, R. *et al.* Deciphering the tri-dimensional effect of endophytic *Streptomyces* sp. on chickpea for plant growth promotion, helper effect with *Mesorhizobium ciceri* and host-plant resistance induction against *Botrytis cinerea*. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 122, n. 6, p. 98–107, 2018.

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970.

VO, Q. A. T. *et al.* Isolation and characterisation of endophytic actinobacteria and their effect on the growth and nodulation of chickpea (*Cicer arietinum*). **Plant and Soil**, The Hague, v. 466, n. 1/2, p. 357–371, 2021.

VOISARD, C. *et al.* Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps

suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. **The EMBO Journal**, Eynshamv, 8, n. 2, p. 351–358, 1989.

VON GREBMER, K. *et al.* **Global Hunger Index: hunger and food systems in conflict settings**. Bonn: Stockholm International Peace Research Institute, 2021. 56 p.

VURUKONDA, S. S. K. P. *et al.* Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, Jena, v. 184, p. 13–24, 2016.

WALLACE, B. C. *et al.* OpenMEE: Intuitive, open-source software for meta-analysis in ecology and evolutionary biology. **Methods in Ecology and Evolution**, Oxford, v. 8, n. 8, p. 941–947, 2017.

WANI, P. A.; KHAN, M. S.; ZAIDI, A. Synergistic effects of the inoculation with nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria on the performance of field-grown chickpea. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 170, n. 2, p. 283–287, 2007.

WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the Rhizosphere. *In*: O’GARA, F. O.; DOWLING, D. N.; BOESTEN, B. (ed.). **Molecular ecology of rhizosphere microorganisms**. New York: VCH Publishers, 1994. p. 1–17.

WINAGRASKI, E. **Diversidade, riqueza e potencial de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares em testes clonais de *Acacia mearnsii* de Wild**. 2018. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

WINAGRASKI, E. *et al.* Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in forest ecosystems of Brazil: a review. **Cerne**, Lavras, MG, v. 25, n. 1, p. 25–35, 2019.

YADAV, J.; VERMA, J. P. Effect of seed inoculation with indigenous *Rhizobium* and plant growth promoting rhizobacteria on nutrients uptake and yields of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 63, p. 70–77, 2014.

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

YADEGARI, M.; RAHMANI, H. A. Evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds’ inoculation with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 5, n. 9, p. 792–799, 2010.



YAMAMOTO, S.; HARAYAMA, S. PCR amplification and direct sequencing of gyrB genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 61, n. 3, p. 1104–1109, 1995.

YASMEEN, S.; BANO, A. Combined effect of phosphate-solubilizing microorganisms, rhizobium and enterobacter on root nodulation and physiology of soybean (*Glycine max* L.). **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 45, n. 18, p. 2373–2384, 2014.

YU, J. *et al.* Auxin control of root organogenesis from callus in tissue culture. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, [art.] 1385, [p. 1–4], 2017.

YUHASHI, K. I. *et al.* Rhizobitoxine production by *Bradyrhizobium elkanii* enhances nodulation and competitiveness on *Macroptilium atropurpureum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, n. 6, p. 2658–2663, 2000.

ZARPELON, T. G. **Caracterização de rizobactérias e eficiência do Rizolyptus® no enraizamento e crescimento de eucalipto**. 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

ZEFFA, D. M. *et al.* Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on co-inoculation with *Bradyrhizobium* in soybean crop: a meta-analysis of studies from 1987 to 2018. **PeerJ**, Corte Madera, v. 8, [art.] e7905, 2020.

ZELLER, S. L.; BRANDL, H.; SCHMID, B. Host-plant selectivity of rhizobacteria in a crop/weed model system. **Plos One**, San Francisco, v. 2, n. 9, [art.] e846, 2007.

ZHAO, L. *et al.* Identification and characterization of the endophytic plant growth promoter *Bacillus cereus* strain MQ23 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 567–575, 2011.

ZHAO, L. F. *et al.* Colonization and plant growth promoting characterization of endophytic *Pseudomonas chlororaphis* strain Zong1 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 629–637, 2013.

## APÊNDICE 1

Relação de bactérias isoladas da região rizosférica de *Acacia mearnsii*

Isolado	Município	Gram	Crescimento LM	Latitude	Longitude
1A	Cristal	-	+	(-31°03'41")	(-52°02'18")
2N	Cristal	-	+	(-31°03'41")	(-52°02'18")
3N	Cristal	-	+	(-31°03'41")	(-52°02'18")
4N	Cristal	+	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
5N	Jaguarão	-	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
6N	Cristal	+	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
7N	Cristal	-	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
8N	Cristal	-	+	(-31°03'41")	(-52°02'18")
9N	Jaguarão	-	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
10N	Jaguarão	-	+	(-32°16'34")	(-53°19'19")
11N	Cristal	+	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
12N	Cristal	-	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
13N	Cristal	+	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
14N	Cristal	-	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
15N	Cristal	-	+	(-31°03'41")	(-52°02'18")
16N	Cristal	+	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
17N	Jaguarão	+	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
18N	Jaguarão	-	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
19N	Jaguarão	+	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
20N	Jaguarão	-	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
21N	Jaguarão	+	+	(-32°16'34")	(-53°19'19")
22A	Jaguarão	-	+	(-32°16'34")	(-53°19'19")
23N	Cristal	-	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
24N	Jaguarão	-	+	(-32°16'34")	(-53°19'19")
25N	Cristal	-	+	(-31°03'41")	(-52°02'18")
26A	Jaguarão	-	+	(-32°16'34")	(-53°19'19")
27N	Cristal	-	+	(-31°03'41")	(-52°02'18")
28N	Cristal	+	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
29N	Jaguarão	-	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
30N	Jaguarão	-	+	(-32°16'34")	(-53°19'19")
31N	Jaguarão	-	+	(-32°16'34")	(-53°19'19")
32N	Jaguarão	-	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
33N	Jaguarão	+	+	(-32°16'34")	(-53°19'19")
34K	Cristal	-	+	(-31°03'41")	(-52°02'18")
35K	Cristal	-	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
36K	Cristal	-	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
37K	Cristal	-	+	(-31°03'41")	(-52°02'18")
38K	Jaguarão	-	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")

Continua...

## Continuação

39K	Jaguarão	-	+	(-32°16'34")	(-53°19'19")
40K	Jaguarão	-	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
41K	Jaguarão	+	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
42K	Jaguarão	+	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
43K	Jaguarão	-	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
44K	Cristal	-	+	(-31°03'41")	(-52°02'18")
45K	Cristal	-	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
46K	Cristal	+	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
47K	Cristal	+	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
48K	Cristal	-	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
49K	Cristal	-	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
50K	Cristal	-	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
51K	Cristal	-	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
52K	Cristal	-	+	(-31°03'41")	(-52°02'18")
53K	Cristal	-	+	(-31°03'41")	(-52°02'18")
54K	Cristal	-	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
55k	Jaguarão	+	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
56K	Jaguarão	-	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
57K	Jaguarão	+	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
58K	Jaguarão	+	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
59K	Jaguarão	-	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
60K	Jaguarão	-	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
61K	Cristal	-	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
62K	Cristal	+	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
63K	Cristal	+	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
64K	Cristal	+	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
65K	Jaguarão	-	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
66K	Jaguarão	-	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
67K	Jaguarão	+	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
68A	Jaguarão	-	+	(-32°16'34")	(-53°19'19")
69K	Cristal	-	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
70A	Cristal	-	+	(-31°03'41")	(-52°02'18")
71K	Jaguarão	+	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
72K	Jaguarão	+	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
73K	Jaguarão	+	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
74K	Jaguarão	-	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
75K	Cristal	+	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
76K	Jaguarão	-	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
77J	Cristal	-	+	(-31°03'41")	(-52°02'18")
78J	Cristal	-	+	(-31°03'41")	(-52°02'18")

Continua...

## Continuação

79J	Cristal	-	+	(-31°03'41")	(-52°02'18")
80J	Jaguarão	-	+	(-32°16'34")	(-53°19'19")
81L	Jaguarão	-	+	(-32°16'34")	(-53°19'19")
82L	Jaguarão	-	+	(-32°16'34")	(-53°19'19")
83L	Cristal	-	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
84L	Cristal	-	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
85L	Jaguarão	-	+	(-32°16'34")	(-53°19'19")
86L	Jaguarão	-	+	(-32°16'34")	(-53°19'19")
87L	Jaguarão	-	+	(-32°16'34")	(-53°19'19")
88L	Jaguarão	-	+	(-32°16'34")	(-53°19'19")
89L	Cristal	-	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
90L	Cristal	-	+	(-31°03'41")	(-52°02'18")
91L	Jaguarão	-	+	(-32°16'34")	(-53°19'19")
92L	Jaguarão	-	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
93L	Jaguarão	+	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
94L	Jaguarão	-	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
95L	Cristal	+	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
96L	Cristal	-	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
97L	Cristal	-	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
98L	Jaguarão	-	+	(-32°16'34")	(-53°19'19")
99M	Jaguarão	+	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")
100M	Cristal	+	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
101M	Cristal	+	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
102M	Cristal	-	-	(-31°03'41")	(-52°02'18")
103M	Jaguarão	-	+	(-32°16'34")	(-53°19'19")
105M	Jaguarão	-	+	(-32°16'34")	(-53°19'19")
106M	Jaguarão	+	-	(-32°16'34")	(-53°19'19")

## APÊNDICE 2

### Lista de artigos utilizados na coleta de dados da Meta-análise

Artigo	Revista	Ano	Autor	País
Co-inoculation Effect of Rhizobia and Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Common Bean Growth in a Low Phosphorus Soil	Frontiers in Plant Science	2017	Korir et al.	Kenya
Effects of co-inoculation of native Rhizobium and Pseudomonas strains on growth parameters and yield of two contrasting Phaseolus vulgaris L. genotypes under Cuban soil conditions	European Journal of Soil Biology	2014	Sánchez et al.	Cuba
Co-inoculation integrated with P-enriched compost improved nodulation and growth of Chickpea ( <i>Cicer arietinum</i> L.) under irrigated and rainfed farming systems	Biology and Fertility of Soils	2014	Shahzad et al.	Pakistan
Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> L.)	Botanica Serbica Romanian Biotechnological Letters	2009	Stajkovic et al.	Serbia
Effects of soybean co-inoculation with plant growth promoting rhizobacteria in field trial		2018	Marinkovic et al.	Serbia
Effects of coinoculation of Rhizobium with plant growth promoting rhizobacteria on the nitrogen fixation and nutrient uptake of <i>Trifolium repens</i> in low phosphorus soil	Journal of plant nutrition	2019	Matse et al.	Taiwan
The <i>Vicia sativa</i> spp. <i>nigra</i> - Rhizobium leguminosarum bv. <i>viciae</i> symbiotic interaction is improved by <i>Azospirillum brasilense</i>	Plant and Soil	2012	Star et al.	Israel
Evaluation of plant growth-promoting traits of Burkholderia and Rhizobium strains isolated from Amazon soils for their co-inoculation in common bean	African Journal of Microbiology Research	2013	Longatti et al.	Brazil
The use of microorganisms as bio-fertilizers in the cultivation of white lupine	Open Chemistry	2019	Sulewska et al.	Poland
A nodule endophytic <i>Bacillus megaterium</i> strain isolated from <i>Medicago polymorpha</i> enhances growth, promotes nodulation by <i>Ensifer medicae</i> and alleviates salt stress in alfalfa plants	Annals of Applied Biology	2018	Chinnaswamy et al.	Spain
Synergistic interactions between <i>Bradyrhizobium japonicum</i> and the endophyte <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> and their effects on growth, and nodulation of soybean under salt stress	Plant Soil	2016	Egamberdieva et al.	China
Synergistic effect of inoculating plant growth-promoting <i>Pseudomonas</i> spp. and Rhizobium leguminosarum-FB1 on growth and nutrient uptake of rajmash ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Archives of Agronomy and Soil Science	2014	Mishra	India
Endophytic Bacteria Improve Plant Growth, Symbiotic Performance of Chickpea ( <i>Cicer arietinum</i> L.) and Induce Suppression of Root Rot Caused by <i>Fusarium solani</i> under Salt Stress	Frontiers in Microbiology	2017	Egamberdieva et al.	Uzbekistan
Relationships between pasture legumes, rhizobacteria and nodule bacteria in heavy metal polluted mine waste of SW Sardinia	Symbiosis	2012	Safronova et al.	Italy

Promotion of growth and metal accumulation of alfalfa by coinoculation with Sinorhizobium and Agrobacterium under copper and zinc stress	PeerJ	2019	Jian et al.	China
Isolation, characterization, and evaluation of bacterial root and nodule endophytes from chickpea cultivated in Northern India	Journal of Basic Microbiology	2015	Saini et al.	India
Identification and characterization of the endophytic plant growth promoter Bacillus cereus strain mq23 isolated from sophora alopecuroides root nodules	Brazilian Journal of Microbiology	2011	Zhao et al.	China
Isolation and evaluation of endophytic bacteria from root nodules of Glycine max L. (Merr.) and their potential use as biofertilizers	Spanish Journal of Agricultural Research	2019	Vargas-Diaz	Mexico
Induced systemic resistance and symbiotic performance of peanut plants challenged with fungal pathogens and co-inoculated with the biocontrol agent Bacillus sp. CHEP5 and Bradyrhizobium sp. SEMIA6151	Microbiological Research	2017	Figueredo et al.	Argentina
Variety specific relationships between effects of rhizobacteria on root exudation, growth and nutrient uptake of soybean	Plant and Soil	2017	Kuzmicheva et al.	Russia
Towards sustainable yield improvement: field inoculation of soybean with Bradyrhizobium and co-inoculation with Azospirillum in Mozambique	Archives of Microbiology	2020	Chibeba et al.	Mozambique
The ACC-Deaminase Producing Bacterium Variovorax sp. CT7.15 as a Tool for Improving Calicotome villosa Nodulation and Growth in Arid Regions of Tunisia	Microorganisms	2020	Bessadok et al.	Tunisia
Can co-inoculation of Bradyrhizobium and Azospirillum alleviate adverse effects of drought stress on soybean (Glycine max L. Merrill.)?	Archives of Microbiology	2019	Silva et al.	Brazil
Co-inoculation of selected nodule endophytic rhizobacterial strains with Rhizobium tropici promotes plant growth and controls damping off in common bean	Pedosphere	2020	Ferreira et al.	Brazil
Illumina sequencing of 16S rRNA tag shows disparity in rhizobial and non-rhizobial diversity associated with root nodules of mung bean (Vigna radiata L.) growing in different habitats in Pakistan	Microbiological Research	2019	Hakim et al.	Pakistan
The expression of an exogenous ACC deaminase by the endophyte Serratia grimesii BXF1 promotes the early nodulation and growth of common bean	Letters in Applied Microbiology	2018	Tavares et al.	Brazil
Isolation and characterisation of endophytic actinobacteria and their effect on the early growth and nodulation of lucerne (Medicago sativa L.)	Plant and Soil	2016	Le et al.	Australia
A synergistic interaction between salt-tolerant Pseudomonas and Mesorhizobium strains improves growth and symbiotic performance of liquorice (Glycyrrhiza uralensis Fish.) under salt stress	Applied Microbiology and Biotechnology	2015	Egamberdieva et al.	Glycyrrhiza uralensis
Co-inoculation of Mesorhizobium sp. and plant growth promoting rhizobacteria Pseudomonas	Legume Research	2015	Kaur et al.	India

sp. as bio-enhancer and bio-fertilizer in chickpea ( <i>Cicer arietinum</i> L.)				
Isolation and characterization of an endophytic bacterium, <i>Bacillus megaterium</i> BMN1, associated with root-nodules of <i>Medicago sativa</i> L. growing in Al-Ahsaa region, Saudi Arabia	Annals of Microbiology	2014	Khalifa and Almalki	Saudi Arabia
ACC deaminase producing <i>Pseudomonas putida</i> strain PSE3 and <i>Rhizobium leguminosarum</i> strain RP2 in synergism improves growth, nodulation and yield of pea grown in alluvial soils	Symbiosis	2013	Ahmad et al.	India
Colonization and plant growth promoting characterization of endophytic <i>Pseudomonas chlororaphis</i> strain Zong1 isolated from <i>Sophora alopecuroides</i> root nodules	Brazilian Journal of Microbiology	2013	Zhao et al.	China
Inoculation of <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Medicago laciniata</i> and <i>Medicago polymorpha</i> with <i>Agrobacterium</i> sp. strain 10C2 may enhance nodulation and shoot dry weight but does not affect host range specificity	Annals of Microbiology	2012	Salem et al.	Tunisia
Enhancement of Nodulation and Yield of Chickpea by Co-inoculation of Indigenous <i>Mesorhizobium</i> spp. and Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Eastern Uttar Pradesh	Communications in Soil Science and Plant Analysis	2012	Verma et al.	India
Enhanced nodulation and symbiotic effectiveness of <i>Medicago truncatula</i> when co-inoculated with <i>Pseudomonas fluorescens</i> WSM3457				
and Ensifer ( <i>Sinorhizobium</i> ) <i>medicae</i> WSM419	Plant and Soil	2011	Fox et al.	Australia
Potential for enhancing lentil ( <i>Lens culinaris</i> ) productivity by co-inoculation with PSB, plant growth-promoting rhizobacteria and <i>Rhizobium</i>	Indian Journal of Agricultural Sciences	2011	Khanna and Sharma	India
ACC deaminase plays a major role in <i>Pseudomonas fluorescens</i> YsS6 ability to promote the nodulation of Alpha- and Betaproteobacteria rhizobial strains	Archives of Microbiology	2019	Nascimento et al.	Brazil
Characterization of plant growth promoting rhizobacteria and their benefits on growth and phosphate nutrition of faba bean and wheat	Biology Open	2019	Bechtaoui et al.	Morocco
Synergism of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (LSE-2) nodule endophyte with <i>Bradyrhizobium</i> sp. (LSBR-3) for improving plant growth, nutrient acquisition and soil health in soybean	World Journal of Microbiology and Biotechnology	2019	Kumawat	India
Can co-inoculation of <i>Rhizobium tropici</i> and <i>Azospirillum brasilense</i> increase common bean nodulation and grain yield?	Semina	2019	Steiner	Brazil
Effect of co-inoculation with <i>Bradyrhizobium japonicum</i> and <i>Pseudomonas putida</i> on root morph-architecture traits, nodulation and growth of soybean in response to phosphorus supply under hydroponic conditions	Bulgarian Journal of Agricultural Science	2018	Jabborova	Uzbekistan
Co-inoculation of <i>Bradyrhizobium</i> stimulates the symbiosis efficiency of <i>Rhizobium</i> with common bean	Plant and Soil	2018	Jesus et al.	Brazil

Symbiotic performance and induction of systemic resistance against <i>Cercospora sojina</i> in soybean plants co-inoculated with <i>Bacillus</i> sp. CHEP5 and <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E111	Archives of Microbiology	2017	Tonelli et al.	Argentina
Mixed rhizobia and <i>Herbaspirillum seropedicae</i> inoculations with humic acid-like substances improve water-stress recovery in common beans	Chemical and Biological Technologies in Agriculture	2017	Melo et al.	Brazil
Coordination between <i>Bradyrhizobium</i> and <i>Pseudomonas</i> alleviates salt stress in soybean through altering root system architecture	Journal of Plant Interactions	2017	Egamberdieva et al.	Uzbekistan
Characterization of <i>Paenibacillus durus</i> (pnf16) a new isolate and its synergistic interaction with other isolated rhizobacteria in promoting growth and yield of chickpea	Journal of microbiology, biotechnology and food sciences	2016	Ahmad et al.	India
Application of biofertilizers and zinc increases yield, nodulation and unsaturated fatty acids of soybean	Zemdirbyste-Agriculture	2016	Sharifi	Iran
<i>Burkholderia fungorum</i> promotes common bean growth in a dystrophic oxisol	Annals of Microbiology	2015	Longatti et al.	Brazil
Two Rhizobacterial Strains, Individually and in Interactions with <i>Rhizobium</i> sp., Enhance Fusarial Wilt Control, Growth, and Yield in Pigeon Pea	Journal of microbiology, biotechnology and food sciences	2014	Dutta et al.	India
Effect of seed inoculation with indigenous <i>Rhizobium</i> and plant growth promoting rhizobacteria on nutrients uptake and yields of chickpea ( <i>Cicer arietinum</i> L.)	European Journal of Soil Biology	2014	Yadav and Verma	India
Co-inoculation of soybean ( <i>Glycine max</i> ) with actinomycetes and <i>Bradyrhizobium japonicum</i> enhances plant growth, nitrogenase activity and plant nutrition	Journal of plant nutrition	2014	Nimnoi et al.	Thailand
Combined Effect of Phosphate-Solubilizing Microorganisms, <i>Rhizobium</i> and <i>Enterobacter</i> on Root Nodulation and Physiology of Soybean ( <i>Glycine max</i> L.)	Communications in Soil Science and Plant Analysis	2014	Yasmeen and Bano	Pakistan
Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability	Biology and Fertility of Soils	2013	Hungria et al.	Brazil
Effect of inoculation methods of <i>Mesorhizobium ciceri</i> and pgpr in chickpea ( <i>Cicer areietinum</i> L.) on symbiotic traits, yields, nutrient uptake and soil properties	Legume Research	2013	Bhattacharjya and Chandra	India
Efficiency of different formulations of <i>Bradyrhizobium japonicum</i> and effect of co-inoculation of <i>Bacillus subtilis</i> with two different strains of <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	World Journal of Microbiology and Biotechnology	2012	Atieno et al.	Kenya
Promoting common bean growth and nitrogen fixation by the co-inoculation of rhizobium and <i>pseudomonas fluorescens</i> isolates	Bulgarian Journal of Agricultural Science	2012	Samavat et al.	Iran
Integrated use of <i>Rhizobium leguminosarum</i> , Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Enriched Compost for	Chilean Journal of Agricultural Research	2012	Iqbal et al.	Pakistan



Improving Growth, Nodulation and Yield of Lentil ( <i>Lens culinaris</i> Medik.)				
Improvement of common bean growth by co-inoculation with <i>Rhizobium</i> and plant growth-promoting bacteria	Romanian Biotechnological Letters	2011	Stajkovic et al.	Serbia
Evaluation of bean ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) seeds' inoculation with <i>Rhizobium phaseoli</i> and plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components	African Journal of Agricultural Research Agronomy for Sustainable Development	2010	Yadegari and Rahmani	Iran
Higher soybean yield by inoculation with N-fixing and P-solubilizing bacteria	Journal of plant nutrition	2010	Afzal et al.	Pakistan
Plant growth promoting rhizobacteria increase growth, yield and nitrogen fixation in <i>Phaseolus vulgaris</i>	Journal of Plant Growth Regulation	2010	Yadegari et al.	Iran
Saprophytic Actinomycetes Promote Nodulation in <i>Medicago sativa</i> - <i>Sinorhizobium meliloti</i> Symbiosis in the Presence of High N		2009	Solans et al.	Argentina
Alleviation of drought stress in the common bean ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) by co-inoculation with <i>Paenibacillus polymyxa</i> and <i>Rhizobium tropici</i>	Applied Soil Ecology Australian Journal of Experimental Agriculture	2008	Figueiredo et al.	Brazil
Coinoculation of chickpea with <i>Rhizobium</i> isolates from roots and nodules and phytohormone-producing <i>Enterobacter</i> strains		2007	Mirza et al	Pakistan
Differential effects of coinoculations with <i>Pseudomonas jessenii</i> PS06 (a phosphate-solubilizing bacterium) and <i>Mesorhizobium ciceri</i> C-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions	Plant and Soil	2006	Valverde et al.	Spain
Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize ( <i>Zea mays</i> L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean ( <i>Vigna radiata</i> L.)	Letters in Applied Microbiology	2006	Shaharoon et al.	Pakistan
Effects of co-inoculation of plant growth promoting rhizobacteria and <i>Bradyrhizobium</i> sp. ( <i>Vigna</i> ) on growth and yield of green gram [ <i>Vigna radiata</i> (L.) Wilczek]	Tropical agriculture	2003	Gupta et al.	India
Influence of <i>Pseudomonas syringae</i> R25 and <i>R. putida</i> R105 on the growth and N <sub>2</sub> fixation (acetylene reduction activity) of pea ( <i>Pisum sativum</i> L.) and field bean ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Biology and Fertility of Soils	1993	Freitas et al.	Canada
Co-Inoculation of Common Bean with <i>Rhizobium</i> and <i>Azospirillum</i> Enhance the Drought Tolerance	Russin Journal of Plant Physiology	2020	Steiner et al.	Brazil
Co-Inoculation of Rhizobacteria and Biochar Application Improves Growth and Nutrients in Soybean and Enriches Soil Nutrients and Enzymes	Agronomy	2020	Jaborova et al.	Germany
The Pattern of Secreted Molecules During the Co-Inoculation of Alfalfa Plants With <i>Sinorhizobium meliloti</i> and <i>Delftia</i> sp. strain JD2: An Interaction That Improves Plant Yield	Molecular Plant-Microbe Interactions	2015	Morel et al.	Uruguay

Coinoculation of <i>Bacillus thuringiensis</i> -KR1 with <i>Rhizobium leguminosarum</i> enhances plant growth and nodulation of pea ( <i>Pisum sativum</i> L.) and lentil ( <i>Lens culinaris</i> L.)	World Journal of Microbiology and Biotechnology	2009	Mishra et al.	India
Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with <i>Bradyrhizobium</i> spp. and <i>Azospirillum brasilense</i> or treated with <i>A. brasilense</i> exudates	Biology and Fertility of Soils	2020	Rondina et al.	Brazil
Co-Inoculation of <i>Bacillus velezensis</i> Strain S141 and <i>Bradyrhizobium</i> Strains Promotes Nodule Growth and Nitrogen Fixation	Microorganisms	2020	Sibponkrung	Thailand
Co-existence of <i>Leclercia adecarboxylata</i> (LSE-1) and <i>Bradyrhizobium</i> sp. (LSBR-3) in nodule niche for multifaceted effects and profitability in soybean production	World Journal of Microbiology and Biotechnology	2019	Kumawat et al.	India
Impact of co-inoculation with plant-growth-promoting rhizobacteria and rhizobium on the biochemical responses of alfalfa-soil system in copper contaminated soil	Ecotoxicology and Environmental Safety	2019	Ju et al.	China
Deciphering the tri-dimensional effect of endophytic <i>Streptomyces</i> sp. on chickpea for plant growth promotion, helper effect with <i>Mesorhizobium ciceri</i> and host-plant resistance induction against <i>Botrytis cinerea</i>	Microbial Pathogenesis	2018	Vijayabharathi et al.	India
Growth of lentil ( <i>Lens culinaris</i> Medikus) as influenced by phosphorus, rhizobium and plant growth promoting rhizobacteria	Indian Journal of Agricultural Research	2016	Singh et al.	India
A new PGPR co-inoculated with <i>Bradyrhizobium japonicum</i> enhances soybean nodulation	Microbiological Research	2014	Masciarelli et al.	Argentina
Effect of indigenous <i>Mesorhizobium</i> spp. and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake of chickpea ( <i>Cicer arietinum</i> L.) under sustainable agriculture	Ecological Engineering	2013	Verma et al.	India
Co-inoculation with <i>Rhizobium</i> and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for inducing salinity tolerance in mung bean under field condition of semi arid climate	Asian Journal of Agriculture and Biology	2013	Aamir et al.	Pakistan
Co-inoculation of phosphate solubilizing bacteria and rhizobia for improving growth and yield of mungbean ( <i>Vigna radiata</i> L.)	The journal of animal & plant sciences	2011	Qureshi et al.	Pakistan
Potential for Improving Healthy and Productivity of Soybean By Plant Growth Promoting Rhizobacteria	Australian Journal of Basic and Applied Sciences	2012	Shehata et al.	Egypt
Effect of Bio-fertilizer inoculations on growth and yield of dwarf field pea ( <i>Pisum sativum</i> L.) in conjunction with different doses of chemical fertilizers	Journal of Agronomy	2010	Mishra et al.	India
Application of <i>Rhizobium</i> sp. BHURC01 and Plant Growth Promoting Rhizobacteria on nodulation, plant biomass and yields of chickpea ( <i>Cicer arietinum</i> L.)	International Journal of Agricultural Research	2010	Verma et al.	India
Application of <i>Rhizobium</i> sp. BHURC01 and Plant Growth Promoting Rhizobacteria on nodulation, plant biomass and yields of chickpea ( <i>Cicer arietinum</i> L.)	International Journal of Agricultural Research	2010	Verma et al.	India

Evaluation of Bean ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) Seeds Inoculation with <i>Rhizobium phaseoli</i> and Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Yield and Yield Components	Pakistan Journal of Biological Sciences	2008	Yadegari and Rahmani	Iran
Synergistic effects of the inoculation with nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria on the performance of field-grown chickpea	Journal of Plant Science and Soil Science	2007	Wani et al.	India
Effect of plant growth promoting rhizobacteria on competitive ability of introduced <i>Bradyrhizobium</i> sp. <i>Vigna</i> for nodulation	Microbiological Research	1998	Gupta et al.	India
Interactions between plant-growthpromoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and <i>Rhizobium</i> spp. in the rhizosphere of <i>Anthyllis cytisoides</i> , a model revegetation in mediterranean semi-arid legume for ecosystems	New Phytologist	1997	Requena et al.	Spain
Rhizobacteria inoculation benefits nutrient availability for phytostabilization in copper contaminated soil: Drivers from bacterial community structures in rhizosphere	Applied Soil Ecology	2020	Ju et al.	China
Multiple Effect of Different Plant Growth Promoting Microorganisms on Beans ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Crop	Brazilian Archives of Biology and Technology	2020	Gabre et al.	Brazil
Illumina sequencing of 16S rRNA tag shows disparity in rhizobial and non-rhizobial diversity associated with root nodules of mung bean ( <i>Vigna radiata</i> L.) growing in different habitats in Pakistan	Microbiological Research	2020	Hakim et al.	Pakistan
Quorum Quenching Activity of the PGPR <i>Bacillus subtilis</i> UD1022 Alters Nodulation Efficiency of <i>Sinorhizobium meliloti</i> on <i>Medicago truncatula</i>	Frontiers in Microbiology	2021	Rosier et al.	United States
Improvement of <i>Medicago sativa</i> Crops Productivity by the Co-inoculation of <i>Sinorhizobium meliloti</i> – <i>Actinobacteria</i> Under Salt Stress	Current Microbiology	2021	Said et al.	Algeria
Dual Microbial Inoculation, a Game Changer? – Bacterial Biostimulants With Multifunctional Growth Promoting Traits to Mitigate Salinity Stress in Spring Mungbean	Frontiers in Microbiology	2021	Kumawat et al.	India
Peanut response to co-inoculation of <i>Bradyrhizobium</i> spp. and <i>Azospirillum brasilense</i> and molybdenum application in sandy soil of the Brazilian Cerrado	Agronomy Journal	2021	Steiner et al.	Brazil
Yield response of common bean to co-inoculation with <i>Rhizobium</i> and <i>Pseudomonas</i> endophytes and microscopic evidence of different colonised spaces inside the nodule	European Journal of Agronomy	2021	Pastor-Bueis et al.	Spain
Exogenous ACC Deaminase Is Key to Improving the Performance of Pasture Legume-Rhizobial Symbioses in the Presence of a High Manganese Concentration	Plants	2020	Paço et al.	Portugal
Co-inoculation of rhizobacteria promotes growth, yield, and nutrient contents in soybean and improves soil enzymes and nutrients under drought conditions	Nature Communications	2021	Jaborova et al.	Germany

Chickpea ( <i>Cicer arietinum</i> L.) as model legume for decoding the co-existence of <i>Pseudomonas fluorescens</i> and <i>Mesorhizobium</i> sp. as bio-fertilizer under diverse agro-climatic zones	Microbiological Research	2021	Nagpal et al.	India
Sustainable production of common beans: inoculation, co-inoculation and mineral fertilization in early-cycle cultivars	Journal of plant nutrition	2021	Bettiol et al.	Brazil
Application of <i>Azospirillum</i> on seeds and leaves, associated with <i>Rhizobium</i> inoculation, increases growth and yield of common bean	Archives of Microbiology Communications in Soil Science and Plant Analysis	2021	Filipini et al.	Brazil
Response of Dry Bean to Nitrogen Fertilization and Inoculation with <i>Rhizobium Tropici</i> and <i>Azospirillum Brasiliensis</i>	Sustainability	2021	Vieira et al.	Brazil
Enhancing Symbiotic Nitrogen Fixation and Soybean Growth through Co-Inoculation with <i>Bradyrhizobium</i> and <i>Pseudomonas</i> Isolates	AMB Express	2021	Garcia et al.	Brazil
Combining microorganisms in inoculants is agronomically important but industrially challenging: case study of a composite inoculant containing <i>Bradyrhizobium</i> and <i>Azospirillum</i> for the soybean crop	Field Crops	2016	Cerezini et al.	Brazil
Strategies to promote early nodulation in soybean under drought	J Basic Microbiol. American Journal of Plant Sciences	2018	Fagotti et al.	Brazil
Quorum sensing communication: <i>Bradyrhizobium</i> - <i>Azospirillum</i> interaction via N-acyl-homoserine lactones in the promotion of soybean symbiosis	Applied Soil Ecology	2015	Hungria et al.	Brazil
Alternative methods of soybean inoculation to overcome adverse conditions at sowing	European Journal of Soil Biology	2021	Galindo et al.	Brazil
Nitrogen recovery from fertilizer and use efficiency response to <i>Bradyrhizobium</i> sp. and <i>Azospirillum brasilense</i> combined with N rates in cowpea-wheat crop sequence	Rhizosphere	2009	Cassan et al.	Argentina
<i>Azospirillum brasilense</i> Az39 and <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn ( <i>Zea mays</i> L.) and soybean ( <i>Glycine max</i> L.)	Rhizosphere	2021	Alemneh et al.	Australia
Large-scale screening of rhizobacteria to enhance the chickpea- <i>Mesorhizobium</i> symbiosis using a plant-based strategy	Plants	2021	Araujo et al.	Brazil
<i>Bacillus subtilis</i> changes the root architecture of soybean grown on nutrient-poor substrate	Plants	2021	Benjelloun et al.	Morocco
Co-Inoculation of <i>Mesorhizobium ciceri</i> with Either <i>Bacillus</i> sp. or <i>Enterobacter aerogenes</i> on Chickpea Improves Growth and Productivity in Phosphate-Deficient Soils in Dry Areas of a Mediterranean Region	Plants	2021	Benjelloun et al.	Morocco
Co-Inoculation of <i>Mesorhizobium ciceri</i> with Either <i>Bacillus</i> sp. or <i>Enterobacter aerogenes</i> on Chickpea Improves Growth and Productivity in Phosphate-Deficient Soils in Dry Areas of a Mediterranean Region	Plants	2021	Benjelloun et al.	Morocco

Plant growth promoting rhizobacteria with ACC deaminase activity isolated from Mediterranean dryland areas in Chile: Effects on early nodulation in alfalfa	Chilean Journal of Agricultural Research	2018	Cedeno-García et al.	Chile
Growth promotion of common bean and genetic diversity of bacteria from Amazon pastureland	Scientia Agricola	2018	Ferreira et al.	Brazil
Rhizobacteria From Root Nodules of an Indigenous Legume Enhance Salinity Stress Tolerance in Soybean	Frontiers in Sustainable Food Systems	2021	Ilangumaran et al.	Canada
Effects of growth-promoting bacteria on soybean root activity, plant development, and yield	Agronomy Journal	2020	Moretti et al.	Brazil
Response of field-grown soybean to co-inoculation with the plant growth promoting rhizobacteria <i>Serratia proteamaculans</i> or <i>Serratia liquefaciens</i> , and <i>Bradyrhizobium japonicum</i> pre-incubated with genistein	European Journal of Agronomy	2002	Pan et al.	Canada
Response of intercropped barley and fenugreek to mono- and co-inoculation with <i>Sinorhizobium meliloti</i> F42 and <i>Variovorax paradoxus</i> F310 under contrasting agroclimatic regions	Archives of Microbiology	2021	Toukabri et al.	Tunisia
Promotion of Peanut Growth by Co-inoculation with Selected Strains of <i>Bradyrhizobium</i> and <i>Azospirillum</i>	Journal of Plant Growth Regulation	2015	Vicario	Argentina
Isolation and characterisation of endophytic actinobacteria and their effect on the growth and nodulation of chickpea ( <i>Cicer arietinum</i> )	Plant and Soil	2021	Vo et al.	Australia
Co-inoculation of <i>Rhizobium</i> and <i>Bradyrhizobium</i> promotes growth and yield of common beans	Applied Soil Ecology	2022	Leite et al.	Brazil

## APÊNDICE 3

### Solução nutritiva para *Acacia mearnsii*

Reagente	SE <sup>1</sup> g L <sup>-1</sup>	SE para 1 L SU <sup>2</sup> mL	Concentração Final mg L <sup>-1</sup>
Macronutrientes			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	22,83	10	228,3
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	60	10	600
MgSO <sub>4</sub>	32,46	10	324,6
KCl	28,6	10	286
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	58,66	10	586,6
Fe EDTA	2,26	10	22,6
Micronutrientes			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86		28,6
ZnCl <sub>2</sub>	0,1	10	1
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,04		0,4
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,02		0,2

<sup>1</sup> Solução estoque; <sup>2</sup> Solução de uso

#### Preparo das soluções estoque

No momento do preparo das soluções, deve-se utilizar vidrarias limpas (balões volumétricos, béckeres, bastões) e balança analítica de três casas.

As soluções estoque dos macronutrientes são preparadas separadamente, para cada reagente. Para os micronutrientes, após serem pesados, irão compor uma única solução estoque.

#### Preparo da solução de uso (para 1 L de solução)

Em um becker, pipetar as soluções estoque (todas as soluções estoque dos macronutrientes e a solução estoque dos micronutrientes) em 500 mL de água destilada. Ajustar com água destilada o volume para 1 L. Ajustar o pH para 6,0. Esterilizar em autoclave por 20 minutos.