

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA APLICAÇÃO DE ÁCIDO HÚMICO SOBRE O
CRESCIMENTO DE SOJA E SOBRE O MICROBIOMA
EDOFÍTICO EM CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO HÍDRICA**

**Maura Santos Reis de Andrade da Silva
Bióloga**

2022

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA APLICAÇÃO DE ÁCIDO HÚMICO SOBRE O
CRESCIMENTO DE SOJA E SOBRE O MICROBIOMA
EDOFÍTICO EM CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO HÍDRICA**

Discente: Maura Santos Reis de Andrade da Silva

Orientador: Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária

S586e	<p>Silva, Maura Santos Reis de Andrade</p> <p>Efeito da aplicação de ácido húmico sobre o crescimento de soja e sobre o microbioma edofítico em condições de restrição hídrica / Maura Santos Reis de Andrade Silva. -- Jaboticabal, 2022</p> <p>120 p.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientador: Everton Rigobelo</p> <p>1. Microbiota. 2. Estresse hídrico. 3. Substâncias húmicas. 4. Glycine Max. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFEITO DA APLICAÇÃO DE ÁCIDO HÚMICO SOBRE O CRESCIMENTO DE SOJA E SOBRE O MICROBIOMA ENDOFÍTICO EM CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO HÍDRICA

AUTORA: MAURA SANTOS REIS DE ANDRADE DA SILVA

ORIENTADOR: EVERLON CID RIGOBELLO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELLO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV UNESP Jaboticabal

Profa. Dra. JOYCE DÓRIA RODRIGUES (Participação Virtual)
Universidade Federal de Lavras-UFLA / Lavras/MG

Documento assinado digitalmente
JOYCE DÓRIA RODRIGUES
Data: 31/05/2022 17:48:53-0300
Verifique em <https://verificador.jit.br>

Pesquisador Dr. LUIZ FERNANDO DE SOUSA ANTUNES (Participação Virtual)
Instituto de Agronomia / Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Seropédica/RJ

Prof.ª Dr.ª JANETE APPARECIDA DESIDERIO (Participação Virtual)
Vice-Diretoria / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. GUSTAVO VITTI MÔRO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 25 de abril de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Maura Santos Reis de Andrade da Silva nasceu aos 22 dias do mês de março de 1992, no bairro Campo Grande, município e Estado do Rio de Janeiro. Filha de Ubiranilce Santos Reis e João Batista de Andrade da Silva, concluiu em 2010 o ensino médio e técnico no antigo CEFETQ, atual IFRJ. Estagiou por um ano (2011) no Laboratório de Análise de Águas da Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais (CPRM). Em 2012, ingressou no curso de Ciências Biológicas no Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), foi bolsista de iniciação científica do CNPq e posteriormente da FAPERJ de janeiro de 2013 a fevereiro de 2016, quando obteve a titulação de bacharela em Ciências Biológicas. Em março do mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado na UFRRJ, junto ao Curso de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo, onde defendeu sua dissertação - em fevereiro de 2018 - intitulada “Resposta de plantas de arroz a aplicação de ácido húmico e bactérias promotoras de crescimento” sob orientação da Dr^a. Vera Lúcia Divan Baldani. Em março de 2018, iniciou o curso de Doutorado no programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, sob orientação do Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - FCAV/ Unesp. Durante o Doutorado, coorientou alunos de iniciação científica e na realização de trabalhos de conclusão de curso, além da publicação de artigos científicos em revistas internacionais oriundos do trabalho de Doutorado e de parcerias.

“My name is on the palm of Your hand
And Your hands, they hold the stars.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus, meu Pai de amor! Obrigada pelos “sins” e “nãos” recebidos, sei que seus planos são lindos e que sua vontade é boa, perfeita e agradável.

A minha mãe, que é a pessoa mais forte que eu conheço! Obrigada por cada oração, conselho e principalmente, amor.

Aos meus tesouros, Camilla, Carol e Natália. Obrigada pelo carinho, amor e apoio. Amo tanto vocês!

A minha tia Isanir, que é minha segunda mãe! Ao meu pai, pelo incentivo, apoio, amor e torcida.

As minhas amigas, Bebelly e Liandra Paula, por essa linda amizade e parceria, vocês são incríveis.

A Bianca, Fernanda, Roberta, Fernando Buzzo, Noemi, Paola, Carlos, Edvan, Ana Claudia, Luziane, grandes parceiros de laboratório. E as minhas queridas coorientandas, Gleiciane e Ana Clara.

Aos meus amigos Ritinha, Hagabo, Eliane, Cleudson Gabriel, Roberto Carlos por todo apoio e parceria.

A minha psicóloga Priscila, por todo apoio e trabalho excepcional.

Aos professores Alan Panosso, Mara Cristina Pessoa, Durvalina, Veronica Massena e Ferraudo por todo auxílio ao longo dessa caminhada.

Assim como, ao Dr Luiz Colnago pela ajuda indescritível.

Ao Ederson, Neemias e Veronica pelo apoio fundamental para que eu chegasse até aqui.

Ao professor Everlon por todo apoio, orientação, paciência e confiança.

À EMBRAPA Agrobiologia e todo corpo de funcionários, pelo acolhimento e toda infraestrutura oferecida durante as análises.

Aos técnicos Lúcio e Wilson, pela amizade e por toda a parceria.

Ao Conselho do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária e a todos os componentes da Seção Técnica de Pós-Graduação, e aos professores do Curso de Pós-Graduação da Unesp/ Jaboticabal.

Ao Lucas Amoroso, pelo auxílio na realização das análises de bioinformática e ao laboratório de Bioinformática do Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental.

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

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
CAPÍTULO 1- Considerações gerais	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Soja no Brasil.....	4
2.2 Microbioma vegetal.....	7
2.3 Promoção de crescimento vegetal por bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e Substâncias húmicas (SH)	8
2.5 BPCV e SH na tolerância de plantas ao estresse.....	18
3 REFERÊNCIAS.....	22
CAPÍTULO 2- K-humate as an agricultural alternative to increase nodulation of soybeans inoculated with <i>Bradyrhizobium</i>	32
Introduction.....	33
Material and methods.....	34
Potassium humate - K-humate (KH)	34
Inoculant survival in soybean seeds in the presence of K-humate	35
Experiment under controlled conditions	36
Experiment in pots with soil	36
Data analysis	37
Results.....	37
Effect of KH on inoculant survival, biomass production and root morphology in soybean seedlings	37
Effect of KH application on biomass production and nodulation in soybean plants.....	42
Discussion	45
Conclusions	48
References	50
CAPÍTULO 3 – Efeito da aplicação de ácidos húmicos de vermicomposto e gongocomposto sobre o microbioma da soja em condições de restrição hídrica	57
1. INTRODUÇÃO	59
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	61
2.1 Extração de ácidos húmicos.....	61
2.2 Caracterização dos ácidos húmicos.....	61
2.3 Experimento em solo.....	62

2.4 Umidade no solo, teor relativo de água na folha (TRA) e teores de clorofilas e carotenoides	63
2.5 Análise de dados de experimentação em casa de vegetação.....	64
2.6 Extração de DNA	64
2.7 Sequenciamento das amostras	65
2.8 Processamento dos dados de sequenciamento	66
2.9 Análises de diversidade e estatísticas	67
3. RESULTADOS	67
3.1 Crescimento vegetal e caracterização de ácidos húmicos	67
3.2 Sequenciamento e processamento de dados	70
3.3 Medidas ecológicas e de composição microbiana	72
4. DISCUSSÃO	83
5. CONCLUSÃO.....	89
6.REFERÊNCIAS.....	90
CAPÍTULO 4- Considerações finais.....	100
APÊNDICES.....	102

EFEITO DA APLICAÇÃO DE ÁCIDO HÚMICO SOBRE O CRESCIMENTO DE SOJA E SOBRE O MICROBIOMA ENDOFÍTICO EM CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO HÍDRICA

RESUMO Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e ácidos húmicos (AH) são opções promissoras para reduzir o uso de fertilizantes minerais, bem como, melhorar a resposta de plantas a estresses. E embora muitos estudos tenham demonstrado os efeitos de BPCV e AH separadamente, poucas informações estão disponíveis sobre as respostas das plantas à aplicação combinada desses bioestimulantes em leguminosas, como a soja. Ademais, são praticamente inexistentes estudos que abordem os efeitos que AH exerce sobre a comunidade microbiana endofítica de plantas, e como esta relação afeta o crescimento, desenvolvimento e proteção vegetal a estresses. Neste contexto, esta tese teve o objetivo de avaliar o efeito de K-humato [KH](AH comercial) sobre a soja e seu simbionte. Para isso, diferentes doses de KH foram testadas em semente de soja inoculada com *Bradyrhizobium*, com intuito de observar se este composto aumenta a sobrevivência do inoculante em semente e se favorece o desenvolvimento radicular e por conseguinte, a nodulação e incremento de N na planta. A concentração de 50 mg KH L⁻¹ foi a mais promissora e foi capaz de proporcionar maiores incrementos sobre a nodulação (número e massa de nódulos), biomassa, teor de N na parte aérea e sobrevivência do inoculante na semente, em relação ao controle. Adicionalmente, foi avaliado o papel de AH de diferentes compostos orgânicos, a saber: vermicomposto e gongocomposto, sobre o crescimento da soja e a modulação de sua microbiota sob déficit hídrico. O material vegetal foi processado para a obtenção de comunidades microbianas endofíticas. Os marcadores filogenéticos de bactérias (16S rRNA) e fungos (ITS) foram amplificados e sequenciados por tecnologia Illumina. Foi observado que em ambas as condições ambientais, os AH estimularam mais o crescimento da soja que o controle. A composição bacteriana em folhas se distinguiu com aplicação de AH, dando origem a dois grupos distintos: um formado pelo tratamento controle e outro, pelos tratamentos com os AH. Na presença de estresse, a composição bacteriana se diferiu entre os três tratamentos. Não foi observado diferenças sobre a composição da comunidade fúngica perante a utilização de AH. Táxons microbianos foram diferentemente abundantes (DA) nas plantas. Sendo a fração fúngica, mais afetada por AH em raízes estressadas. As comunidades microbianas estimuladas na presença de AH parecem estar relacionadas com a promoção direta e indireta do crescimento vegetal.

Palavras-chave: microbiota, estresse hídrico, Substâncias húmicas, *Glycine Max*

EFFECT OF HUMIC ACID APPLICATION ON SOYBEAN GROWTH AND ON EDOPHYTIC MICROBIOME UNDER WATER RESTRICTED CONDITIONS

ABSTRACT Plant growth-promoting bacteria (PGPB) and humic acids (HA) are promising options to reduce the use of mineral fertilizers, as well as improve the response of plants to stress. And while many studies have demonstrated the effects of PGPB and HA separately, little information is available on plant responses to the combined application of these biostimulants to legumes such as soybeans. Furthermore, there are practically no studies that address the effects that HA exerts on the endophytic microbial community of plants, and how this relationship affects growth, development and plant protection against stress. In this context, this thesis aimed to evaluate the effect of K-humate [KH](commercial HA) on soybean and its symbiont. For this, different doses of KH were tested in soybean seed inoculated with *Bradyrhizobium*, in order to observe whether this compound increases the survival of the inoculant in seed and whether it favors root development and, consequently, nodulation and N increment in the plant. The concentration of 50 mg KH L⁻¹ was the most promising and was able to provide greater increments on nodulation (number and mass of nodules), biomass, N content in the shoot and survival of the inoculant in the seed, in relation to the control. Additionally, the role of HA of different organic compounds, namely: vermicompost and millicompost, on soybean growth and the modulation of its microbiota under water deficit was evaluated. The plant material was processed to obtain endophytic microbial communities. Phylogenetic markers of bacteria (16S rRNA) and fungi (ITS) were amplified and sequenced by Illumina technology. It was observed that under both environmental conditions, HA stimulated more soybean growth than the control. The bacterial composition in leaves was distinguished with the application of HA, giving rise to two distinct groups: one formed by the control treatment and the other, by the treatments with HA. In the presence of stress, the bacterial composition differed between the three treatments. No differences were observed on the composition of the fungal community when using HA. Microbial taxa were differently abundant (DA) in plants. Being the fungal fraction, most affected by HA in stressed roots. The microbial communities stimulated in the presence of HA seem to be related to the direct and indirect promotion of plant growth.

Keywords: microbiota, water stress, Humic substances, *Glycine Max*

CAPÍTULO 1- Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

As leguminosas abrangem importantes culturas de grãos, sendo a soja (*Glycine max* (L.) Merr.) uma das mais importantes, e esta característica é devido a ampla utilização de seus óleos e proteínas para alimentação animal e humana (Sediyama et al., 2015). O cultivo da soja nos trópicos tem obtidos resultados positivos principalmente devido a inoculação das sementes desta cultura com rizóbios eficientes. Estas bactérias em associação com a soja são capazes de fixar biologicamente o nitrogênio (N) atmosférico, garantindo a planta, todo o N necessário para seu desenvolvimento sem a utilização de fertilizantes nitrogenados, mesmo em cultivares altamente produtivas (Alves et al., 2003; Hungria e Mendes, 2015). Atualmente, o Brasil é o maior produtor de soja, seguido pelos Estados Unidos (EMBRAPA, 2021). No Brasil, esta associação é capaz de fornecer até 300Kg ha⁻¹ de N para a soja, liberando para o solo cerca de 20 a 30 kg ha⁻¹ de N (Hungria e Mendes, 2015). Tem sido desenvolvidas estratégias para melhorar o desempenho da simbiose da soja e o *Bradyrhizobium*. E tais estratégias visam aumentar a incorporação de N via fixação biológica de nitrogênio (FBN) para melhorar o desempenho da cultura (Moretti et al., 2020).

Trabalhos recentes têm mostrado a potencialidade de ácidos húmicos (AH) em melhorar a nodulação e o acúmulo de nitrogênio em leguminosas (Gao et al., 2015; da Silva et al., 2021a). E além do efeito sobre a melhoria do sistema radicular e aumento na absorção de nutrientes pelas plantas, AH também apresenta papel marcante sobre a tolerâncias de plantas a estresses abióticos (Canellas et al., 2020; Nardi et al., 2021). A produção de grãos de soja é afetada por condições ambientais adversas. O déficit hídrico é um dos fatores que limitam a produção desta cultura (Freitas et al., 2022).

As cepas de *Bradyrhizobium* têm diferentes níveis de tolerância a escassez de água e as mais tolerantes podem contribuir para o desempenho da planta hospedeira em face a restrição hídrica. Neste contexto, a manutenção do processo

de FBN sob a o déficit hídrico é essencial para auxiliar a soja a lidar com tal adversidade nos sistemas de produção dependentes de FBN. E a busca de tecnologias sustentáveis que contribuam para a resiliência na agricultura é necessária (Freitas et al., 2022). Sendo assim, a utilização de AH surge como uma alternativa para intensificar ganhos sobre a FBN e alternativamente, pode contribuir para o desempenho da planta sob seca.

Vários estudos têm demonstrado o papel do microbioma endofítico em processos metabólicos da planta hospedeira (Vandenkoornhuyse et al., 2015). Apesar dos alegados benefícios de AH sobre o crescimento vegetal, ainda não são totalmente claros os mecanismos destas substâncias na planta, ainda mais, no tocante a diversidade microbiana vegetal. Neste cenário, é plausível que os mecanismos responsáveis pela ação benéfica de AH no crescimento das plantas envolvam alguma ação prévia sobre o microbioma da planta. Os resultados apresentados por da Silva et al. (2021b) apoiam fortemente essa hipótese. Os autores observaram que a aplicação radicular AH em plantas de arroz cultivadas em hidroponia, causou o aumento de grupos bacterianos relacionados ao crescimento vegetal. Esses resultados estiveram associados ao incremento de biomassa e estímulo ao sistema radicular. E apesar dos seus achados, não foram avaliadas a composição fúngicas das amostras. Os resultados relatados por Della Lucia et al. (2021) também apoiam o papel da microbiota endofítica nos mecanismos responsáveis pela ação benéfica de leonardita -composto com elevado teor de ácido húmico - no crescimento de beterraba, uma vez que muitos dos endófitos estimulados em condições de hidroponia e campo, tem relação com importantes bioestimulantes vegetais. Estes resultados estiveram associados com a regulação de genes envolvidos em vias de sinalização dependentes da auxina e, aumentos no rendimento dessa planta. Logo, é crível que mudanças na diversidade destes microrganismos na presença de AH podem explicar o aumento do crescimento das plantas por AH. O que chama atenção para a necessidade de mais estudos nesta vertente, tendo em vista os poucos trabalhos que abordaram essa questão. Além do mais, ainda não há trabalhos que relataram o efeito de AH sobre a microbiota vegetal em condições ambientais adversas, seja por tensões abióticas como bióticas.

Sendo assim, este estudo foi desenvolvido em três capítulos. O primeiro capítulo aborda a revisão de literatura desta tese, enquanto, o segundo capítulo avaliou o efeito de K-humato sobre a promoção de crescimento e nodulação em soja e o potencial desse produto em aumentar a viabilidade de *Bradyrhizobium* em sementes desta cultura. Enquanto o terceiro capítulo, buscou extrair e caracterizar ácidos húmicos de gongocomposto e vermicomposto e avaliar o efeito deles sobre o crescimento da soja, bem como, avançar na investigação dos efeitos desses AH sobre a microbiota vegetal, sob restrição hídrica. Utilizando a abordagem de metataxonômica para a identificação dos microrganismos endofíticos (bactérias e fungos) dessa planta.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Soja no Brasil

A soja cultivada (*Glycine max* [L] Merrill) possui origem no Leste da Ásia, mais especificamente no Nordeste da China. Em 1882, D'Utra fez o relato inaugural da soja no Brasil, nessa época esta planta era cultivada na Bahia. Todavia, as cultivares não tiveram boa adaptabilidade em latitudes em torno de 12° Sul e em clima tropical. Em 1908, a soja foi introduzida em São Paulo em latitude em torno de 22° Sul, onde as primeiras observações foram realizadas no Instituto Agrônomo de Campinas. Nessa região, essa cultura se desenvolveu melhor que na Bahia. Contudo, foi no Rio Grande do Sul que a soja encontrou condições de clima favorável para o seu estabelecimento, já que eram condições similares do seu local de origem (Sediyama et al., 2015; Cattelan e Dall'Agnol, 2018). Foi a cultura que recebeu considerável incentivo estatal por meio de políticas de financiamento e incentivo a cadeia produtiva. Nos anos de 1954 a 1958 o Brasil continha 0,5% da produção global de soja e ascendeu de forma a atingir a marca 16% em 1976. A soja teve um papel marcante perante a mudanças relevantes na base da produção brasileira a datar de 1960 (Sediyama et al., 2015).

Até 1980, a soja se restringia ao sul do país, por se tratar de cultivares adaptadas a climas temperados. Com o desenvolvimento de cultivares adaptadas a baixas latitudes, foi possível sua expansão ao cerrado uma vez que eram cultivares menos sensíveis a variações do fotoperíodo (Sediyama et al., 2015). O melhoramento genético da soja também foi acompanhado da inoculação de sementes com estirpes de *Bradyrhizobium* eficiente em fixar N e na ausência de fertilizantes nitrogenados. Vale ressaltar que as variedades de soja inseridas no Brasil já possuíam a capacidade de fixar simbioticamente o N (Freire e Verneti, 1999).

Na antiga Seção de Microbiologia Agrícola (SEMIA), em 1950, foi iniciada pesquisas para produção de inoculantes em soja. Visando atender a demanda fomentada pelo início da expansão dessa cultura, aquecida pela produção industrial de óleo. Tal expansão estimulou pesquisas focadas no melhoramento genético,

seleção de estirpes de rizóbios e experimentações visando o controle de fatores limitantes a produtividade (como por exemplo, acidez do solo, deficiência de fósforo etc.; Freire e Vernetti, 1999).

Apesar do alto requerimento por N – estima-se que seja necessário 80Kg de N para a produção de 1.000 kg de grãos de soja – esta cultura consegue obter todo N necessário para o seu desenvolvimento através do N presente na matéria orgânica do solo e em sua maioria, devido a FBN. Este processo biológico é configurado pela simbiose de plantas leguminosas com bactérias diazotróficas tidas comumente como “rizóbios”. Essa associação permite a quebra da tripla ligação do nitrogênio atmosférico (N_2) que é transformado em uma forma assimilável pela planta, o N_2 compõe cerca de 78% da atmosfera. No Brasil, a aquisição de N por soja via FBN ocorre através inoculação de sementes/sulco desta cultura com cepas elite de *Bradyrhizobium*. Chegando a fornecer até 300 kg ha^{-1} de N para a cultura, sendo assim, para atingir a produtividade média nacional de 3.000 kg ha^{-1} é requerido 240 kg N ha^{-1} (Hungria et al., 2007; Hungria e Mendes, 2015b). A soja acumula elevada quantidade de N em suas raízes o que pode contribuir com o balanço positivo de nitrogênio no solo e por conseguinte, favorecer o aumento em produtividade da cultura sucessora. E a utilização da prática de plantio direto pode incrementar ganhos sobre FBN (Araujo et al., 2006). No Brasil, A FBN na soja resulta em uma economia estimada em US\$ 15 bilhões por ano, devido a não utilização de fertilizantes nitrogenados. Adicionado aos ganhos econômicos, tem-se também, vantagens ambientais (Hungria e Mendes, 2015b).

Na atualidade, quatro estirpes de *Bradyrhizobium* podem compor o inoculante de soja no Brasil, sendo estas: *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 (= CPAC 15), *B. diazoefficiens* SEMIA 5080 (= CPAC 7), *B. elkanii* SEMIA 5019 (= 29w) e SEMIA 587), as estirpes são utilizadas sozinhas ou em combinação. Em 2006, a RELARE (Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologias de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola) decidiu que os inoculantes podem ser compostos por apenas uma das estirpes e isso se deve ao fato de que, cada uma delas é bastante eficiente em fixar N até nas cultivares mais produtivas, podendo conferir ganhos em rendimentos superiores a 4000 Kg ha^{-1} (Hungria et al., 2007).

A legislação estipula que a concentração mínima do inoculante deve ser de 1×10^9 células viáveis/g ou mL até a data de validade, sendo exigido a ausência de contaminantes na diluição 1×10^{-5} . Também é requerido que a dose aplicada forneça ao menos 1,2 milhão de células viáveis por semente (Santos et al., 2019).

Doses de N foram testadas em plantios de soja no Brasil, no entanto, com a aplicação de inoculante contendo estirpes eficazes, dificilmente é observado efeito significativo sobre aumento de produtividade nessa cultura mediante a aplicação de N. Em solos de baixa disponibilidade de N e com primeiro plantio de soja, a aplicação inicial de até 30 Kg N ha^{-1} não teve efeito significativo em face a ganhos de produtividade e no teor de N nos grãos em plantas inoculadas. Após ao período de enchimento de grãos, as plantas apresentam-se amareladas devido a translocação de N das folhas para o grão. O que pode visualmente se assemelhar a deficiência de N e indicar a necessidade da aplicação de fertilizantes nitrogenados. Contudo, a aplicação de N nesse momento não tem ganhos significativos em produtividade. Inclusive, a aplicação de sulfato de amônio em doses de 30 a 60 kg N ha^{-1} no início do enchimento de vagens, não foi capaz de proporcionar ganhos na produção de grãos, tanto no plantio convencional como no plantio direto (Alves et al., 2003).

A soja tem reconhecido valor devido ao seu alto teor proteico, que é mais elevado do que outras oleaginosas. E por esta característica seus grãos são utilizados como matéria-prima para a produção de farelo proteico. Que é empregado, em grande parte, para a fabricação de ração, principalmente para aves, suínos e bovinos confinados. O teor proteico é uma vantagem competitiva tanto para indústria brasileira como para os países que importam o grão em larga escala. Inclusive, nas safras de 2014/15 e 2016/17 o teor médio de proteína da soja brasileira foi de 36,69%, enquanto que na soja americana, foi de 34,70% entre 2006 e 2015, caindo para 34,1% na safra de 2017 (EMBRAPA, 2019).

Apesar do farelo ser um dos principais produtos derivado da soja, o mercado de óleo ascendeu e esse produto vem se tornando mais competitivo. Inclusive, o óleo de soja tem recebido destaque pelo sucesso do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB). Em 2017, 70% da produção brasileira de biodiesel foi suprida pelo óleo de soja (Hirakuri et al., 2018). As bebidas à base de

soja (BBS) vêm crescendo no mercado, empresas tradicionais no ramo alimentício têm investido na produção de BBS (Hirakuri et al, 2018).

O Brasil é maior produtor mundial de soja, na safra de 2020/2021 produziu 135,409 milhões de toneladas, com 38,502 milhões de hectares de área plantada e produtividade de 3.517 kg ha⁻¹. O estado brasileiro de maior produção é o Mato Grosso seguido por, Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás (EMBRAPA, 2021). O plantio de soja também tem se expandido para estados do Norte e Nordeste, em específico para regiões tidas como MATOPIBA (Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia) e o Pará (Seixas et al., 2020).

2.2 Microbioma vegetal

Os espécimes vegetais albergam uma vasta diversidade de microrganismos dentro e fora de seus tecidos, sendo classificados como, endofíticos, epifíticos e rizosféricos. Esses grupos microbianos estão relacionados a funções importantes, como nutrição e a resistência vegetal a estresses bióticos e abióticos. Logo, a capacidade da planta de se estabelecer no ambiente, está relacionada a sua fisiologia juntamente com sua microbiota associada (Vandenkoornhuysen et al., 2015).

Muitos desses microrganismos são recrutados do solo, enquanto outros, são transferidos verticalmente pela semente. A análise do microbioma da planta compreende a relação entre a ecologia microbiana e a biologia do hospedeiro, essa microbiota fornece funções adicionais para seu parceiro vegetal. Tais funções exercidas pelos microrganismos, ampliam a capacidade da planta a se adaptar a diferentes condições ambientais, que é de extrema relevância para o vegetal tendo em vista seu estilo de vida sésstil. Neste sentido, a planta pode ser tida como um holobionte (Trivedi et al. 2022). Este termo está relacionado a visão coletiva das funções e interações entre o hospedeiro e sua microbiota associada, como uma única entidade dinâmica (Lyu et al., 2021).

O uso de abordagens de sequenciamento de DNA está ampliando o conhecimento sobre a diversidade microbiana em diferentes organismos, como por exemplo, em uma vasta quantidade de plantas (Hassani et al., 2018). Esta técnica baseia-se na amplificação de alvos específicos de DNA, tais informações contidas

nestas sequências, auxiliam na identificação dos grupos microbianos presentes na amostra e permitem explorar o papel destes táxons na planta (de Carvalho et al., 2021).

E a relevância disso, é que uma das estratégias utilizadas para superar as limitações dos inoculantes atuais, é a escolha de microrganismos tendo como base seu perfil de diversidade no microbioma da planta. A identificação de microrganismos-alvo, tendo em conta a ecologia microbiana, pode auxiliar a preservação de algumas interações entre os microrganismos e o hospedeiro vegetal. Proporcionando funções mais efetivas para o crescimento da planta do que quando comparado por um único isolado (de Souza et al., 2020). Comunidades microbianas selecionadas a partir de grupos dominantes do microbioma de cana-de-açúcar, foram capazes de proporcionar crescimento em milho (Armanhi et al., 2018). E esse mesmo consórcio, também foi capaz de reduzir a temperatura de folhas de milho sob restrição hídrica e melhorar seu crescimento, mesmo na presença deste estresse (Armanhi et al., 2021). Logo, é notório que o uso direcionado de microrganismos, a partir de técnicas dependentes e independentes de cultivo, pode promover o crescimento vegetal e a resiliência de plantas frente a tensões ambientais. Explorar o potencial biológico das comunidades microbianas é uma estratégia de grande relevância para o desenvolvimento de técnicas agrícolas mais sustentáveis e promissoras.

2.3 Promoção de crescimento vegetal por bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e Substâncias húmicas (SH)

As substâncias húmicas (SH) são frações constituintes da matéria orgânica do solo e são altamente complexas e biologicamente ativas (Canellas e Olivares, 2014). Essas substâncias incluem ácidos húmicos (AH), ácidos fulvicos (AF) e huminas (Schnitzer, 1978). No entanto, alguns trabalhos têm mostrado que as huminas podem ser consideradas fragmentos de AH fortemente associado a fração mineral do solo (Garcia et al., 2019). As plantas apresentam elevada plasticidade em seu desenvolvimento, o que lhes confere sensibilidade em responder às mais diversas condições ambientais. A presença de microrganismos benéficos, como

BPCV e de compostos bioativos como SH, tem proporcionado o melhor condicionamento a diversas culturas. Um dos principais impactos de BPCV e SH é a melhoria na aquisição de nutriente, estímulo ao sistema radicular e maior tolerâncias a estresses (Olivares et al., 2017). Estudos com leguminosas e seus simbioses na presença de SH, tem apresentado resultados promissores sobre a FBN. Um dos primeiros trabalhos nesta temática em casa de vegetação, mostrou que aplicação de AF e AH podem aumentar o peso seco da planta e do nódulo em amendoim e soja, mas não o número de nódulos (Tan e Tantiwiranond, 1983). Já, Til'ba e Sinegovskaya (2012) observaram em campo, que aplicação de humato de sódio (Na-humato) em sementes de soja inoculada com *Bradyrhizobium* na presença de molibdato, juntamente a aplicação foliar com Na-humato foi capaz de melhorar o rendimento de soja em campo, maiores valores sobre o número de nódulos e a eficiência de FBN foram encontradas. SH já foram relatados por aumentar o crescimento microbiano, com efeito na regulação do metabolismo celular (Kirschner et al., 1999; Tikhonov et al., 2010).

Tabela 1: Estudos com bactérias associadas a substâncias húmicas.

Microrganismos	Substâncias húmicas	Efeito Biológicos	Referências
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Na-humato e ácidos fúlvicos (AF)	Na-humato e AF aumenta o crescimento celular de <i>Azotobacter chroococcum</i> .	(Gaur e Bhardwaj, 1971)
<i>Pseudomonas</i> sp.	AF	O AF aumentou metabolismo celular de <i>Pseudomonas</i> .	(De Haan, 1974)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Ácido húmicos (AH)	O AH aumentou a sobrevivência de <i>Klebsiella aerogenes</i> exposta à irradiação ultravioleta (UV).	(Bitton et al., 1972)
<i>Mycobacterium avium</i>	AH e AF	AH e AF o crescimento de <i>Mycobacterium avium</i> .	(Kirschner et al., 1999)
<i>Bacillus subtilis</i>	AH	AH aumentou o número de <i>B. subtilis</i> imobilizado em esferas de alginato.	(Young et al., 2006)
Bactérias no solo e do trato digestivo de minhocas	AH	AH estimulou o crescimento bacteriano.	(Tikhonov et al., 2010)
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	Material húmico solúvel em água (MHSA)	MHSA estimulou o crescimento e o metabolismo celular, incluindo proteínas relacionadas à nodulação e FBN.	(Gao et al., 2015)
<i>Streptomyces</i> sp.	AH	AH estimulou o crescimento e a habilidade de <i>Streptomyces</i> sp. Em solubilizar fosfato de rocha.	(Farhat et al., 2015)
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AF comercial	AF estimula o crescimento celular de <i>S. meliloti</i> .	(Capstaff et al., 2020)
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	K-humato de leonardita	Aumenta a sobrevivência de <i>Bradyrhizobium</i> spp. em sementes de soja	(da Silva et al., 2021a)

Um trabalho avaliou o papel de SH-solúveis em água (SHSA) em *Bradyrhizobium liaoningense*, nesta condição *B. liaoningense* apresentou perfil gênico semelhante ao encontrado pela mesma estirpe na presença de flavonoides (Gao et al., 2015). Os flavonoides são moléculas responsáveis por ativar genes em rizóbios que são fundamentais para iniciação do processo de simbiose (Oldroyd et al., 2011). Além disso, foi observado a maior expressão de genes *nod*, *nif* e na formação do complexo nitrogenase na bactéria em vida livre quando em contato com esta substância. Experimentos em casa de vegetação confirmaram maior incremento na FBN em plantas inoculadas com *B. liaoningense* na presença de SHSA. Estes resultados elucidam o efeito direto de SH na bactéria e como isto pode estar relacionado a melhoria da simbiose com a planta hospedeira (Gao et al., 2015). Os AF também foram capazes de induzir o crescimento de *Sinorhizobium meliloti*, e atrelado a isto, esta combinação proporcionou o aumento de nódulos ativos e de rendimentos de *Medicago sativa* (Capstaff et al., 2020). Estas plantas tratadas com AF, apresentaram em raízes, a expressão de genes relacionados a diferentes processos, como: defesa, oxirredução, metabolismo de C e N, além de genes específicos de nodulação. Tais dados sugerem que SH atua sobre a própria planta (Capstaff et al., 2020), podendo induzir a nodulação precoce, como também atua na expressão de genes relacionados a FBN no microssimbionte (Gao et al., 2015).

Aplicação de AF em *Medicago sativa* induziu a expressão de genes envolvidos com a modificação da parede celular (Capstaff et al., 2020). A regulação positiva de genes relacionados a plasticidade da parede celular e diferenciação de pelos radiculares foi observada na promoção de crescimento de *Arabidopsis thaliana* quando inoculado com *Azospirillum* (Spaepen et al., 2014). A ação de AH na funcionalidade da raiz e conseqüente crescimento vegetal, foi relacionada com uma etapa inicial de interação física do complexo molecular de AH com poros da parede celular (Olaetxea et al., 2015). da Silva et al. (2021b) observaram o enriquecimento de bactérias com capacidade de produzir enzimas com atuação na parede celular, como celulasas e pectinases, em raízes de arroz tratadas com AH, o aumento destes microrganismos pode estar relacionado a mudanças na parede celular ocasionadas pela interação de SH com estas estruturas. Sabe-se que a microbiota

associada ao vegetal sofre influência de fatores externos e internos, que modulam os processos fisiológicos das plantas, como SH (Taulé et al., 2021).

Relatórios anteriores confirmaram que aplicação de SH causou o aumento do tamanho e a densidade de pelos radiculares (Canellas et al., 2010), estas estruturas são conhecidas por iniciarem o processo de formação de nódulos em leguminosa (Badenoch-Jones et al., 1985), neste sentido, a aplicação de SH poderia também atuar na indução da nodulação, já que o aumento na produção de pelos radiculares forneceria mais sítios para infecção de rizóbios. Aplicação de K-humato e *Bradyrhizobium* em sementes de soja, proporcionou alterações morfológicas nas raízes de plantas quando comparado com controle inoculado (Figura 1). Em experimento em casa de vegetação, foi observado melhores valores para nodulação e incremento de N na parte aérea de plantas inoculadas com *Bradyrhizobium* a uma concentração de 50 mgL^{-1} de K-humato via semente quando comparado com a inoculação sozinha (da Silva et al., 2021a). Um outro trabalho utilizou uma bactéria solubilizadora de fósforo, *Pseudomonas putida*, juntamente a AH em plantas de soja, apesar do efeito sobre aumento do pH e do fósforo no solo, a combinação não foi capaz de aumentar o rendimento da cultura (Winarso et al., 2011). Além disso, SH parecem aumentar a sobrevivência de rizóbios em sementes de soja (da Silva et al., 2021a), proteger bactérias contra irradiação (Bitton et al., 1972) e aumentar a viabilidade do inoculante durante o armazenamento quando aplicado junto ao alginato (Young et al., 2006). Tais características indicam que além do efeito na melhoria da comunicação entre microrganismos e plantas, este composto pode atuar na proteção do inoculante contra efeitos deletérios do ambiente.

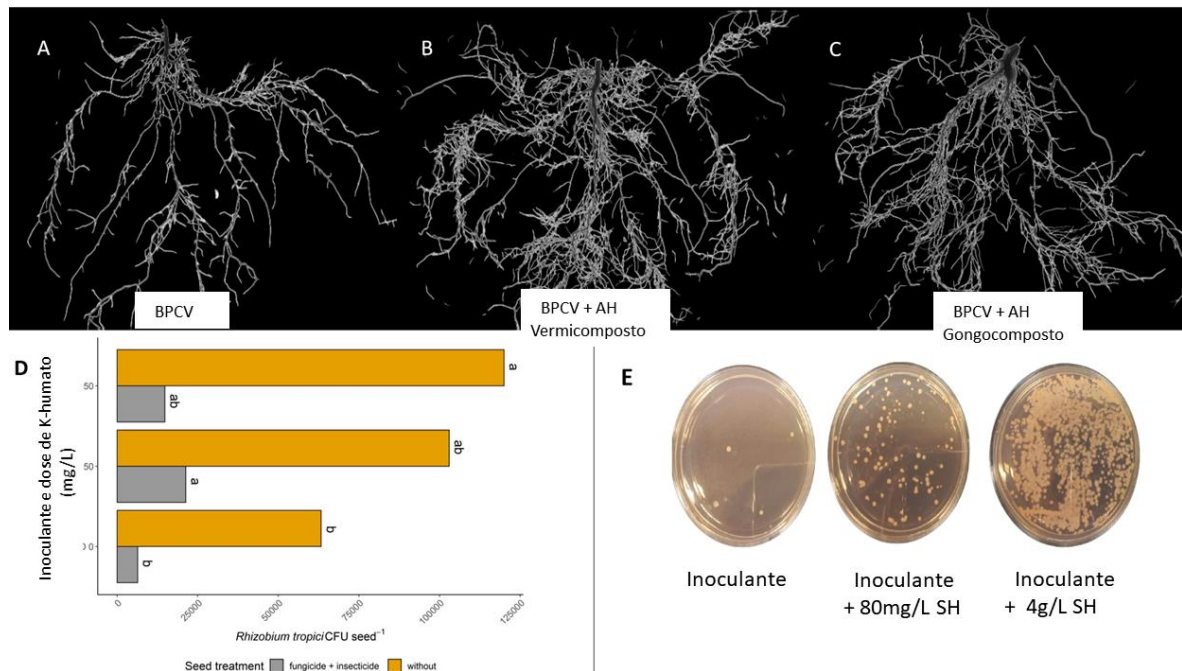


Figura 1: Efeitos relacionados ao uso combinado de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e substâncias húmicas (SH). (A–C) Impacto positivo em raízes de soja inoculadas com *Bradyrhizobium* (A) e *Bradyrhizobium* em combinação com ácido húmico (AH) de vermicomposto (B) e Gongocomposto (C). (D) Aumento da sobrevivência de *Rhizobium* (D0) em sementes de soja na presença de 50 (D50) e 150 (D150) mgL⁻¹ K-humato em sementes não tratadas com fungicida e inseticida (barras amarelas) quanto em sementes tratadas com fungicida e inseticida (barras cinzentas). Os valores são expressos em unidades formadoras de colônias (UFC) de *Rhizobium* por grama de semente. (E) Aumento do crescimento de *Rhizobium tropici* (inoculante) com a aplicação de K-humato (dados não publicados).

Em plantas não leguminosas, Canellas e Olivares (2014) propuseram um conceito de biofertilizantes baseado na inoculação de bactérias endofíticas junto a aplicação de SH. No qual, esta substância proporcionaria o aumento da interação bacteriana com o hospedeiro vegetal, atrelado, a proteção do inoculante nos domínios hidrofóbicos de SH. De fato, foi observado que após 25 dias de contato com a semente, a maior sobrevivência bacteriana ocorreu no tratamento que recebeu SH (da Silva et al., 2021a). A composição estrutural da matéria orgânica humificada permite a adsorção em raízes, esta característica pode promover o maior contato das bactérias inoculadas nas raízes das plantas. Aumentando as chances do inoculante em se estabelecer no tecido de vegetal, o que permitiria que

microrganismos pré-selecionados quando aplicados na planta, apresentassem vantagem na colonização frente aos microrganismos competitivos residentes do solo (Canellas e Olivares, 2014). Adicionalmente, a aplicação de SH é capaz de mudar a arquitetura e morfologia radicular, induzindo a formação de raízes laterais e o incremento sobre comprimento e densidade de pelos radiculares (Nardi et al., 2017; Olivares et al., 2017). E dada que a penetração de BPCV endofíticas ocorre de forma oportunista, as aberturas naturais oriundas do surgimento de novas raízes propiciada por SH pode favorecer a entrada destes microrganismos no hospedeiro vegetal (Olivares et al., 2017). Canellas e Olivares (2017) observaram que AH foi capaz de modular células da borda de raízes e promover a maior agregação e consequente aumento da população da bactéria inoculada ao redor desta estrutura, favorecendo assim, o processo de infecção. Estes resultados podem explicar estudos anteriores que mostraram a maior colonização de *H seropedicae* em raízes de milho na presença de SH (Canellas et al., 2013; Canellas e Olivares, 2017).

Assim, não é surpresa que a utilização de SH + BPCV promovam efeitos consistentes sobre o crescimento vegetal, com aumentos sobre incremento de massa e maiores teores de nutrientes. De fato, plantas de tomates inoculadas com espécies de *Bacillus* e AH apresentaram maiores teores de Fe e K, além do maior crescimento da parte aérea e de raízes (Galambos et al., 2020). A aplicação de AH e *Burkholderia* aumentou a parte aérea, raiz e os teores N, P, K, Ca e Mg em abacaxi (Baldotto et al., 2010). Em solos com baixa fertilidade, o tratamento com AH e *H seropedicae* obtiveram a maior produção de milho quando comparado ao controle (Canellas et al., 2008). Já em cana de açúcar, a aplicação foliar com *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *G. diazotrophicus* combinado com K-humato promoveu o aumento de 37% da produção em relação a plantas não tratadas (da Silva et al., 2017). A inoculação com *Bacillus megatorium*, *Bacillus subtilis* e a aplicação de 400 kg ha⁻¹ AH no plantio de batata, proporcionou em relação ao controle, o aumento em 140% da produção total de tubérculos, enquanto a aplicação de fertilizante NPK 100% promoveu o aumento de apenas de 111% (Ekin, 2020). O uso combinando de SH e microrganismos benéficos podem auxiliar na transição do cultivo convencional para práticas mais agroecológicas.

O aumento das concentrações de nutrientes na planta não está apenas relacionado a quelação por BPCV ou SH, mas também pela melhoria na capacidade radicular de captar nutrientes da solução do solo (Zanin et al., 2019; Jindo et al., 2020). Estes bioestimulantes também podem melhorar a nutrição vegetal alterando a morfologia radicular (Marques Júnior et al., 2008), e esse efeito é geralmente atribuído à ação de auxinas. BPCV podem sintetizar esses hormônios, como já demonstrado em teste de HPLC (Nutaratat et al., 2017), enquanto as SH podem atuar mimetizando esses compostos. Estudos também apontaram a presença de auxinas na estrutura molecular de SH (Muscolo et al., 1998). Além disso, genes relacionados ao transporte de macro e micronutrientes foram regulados em tomate após a aplicação de BPCV e AH, assim como, a regulação de genes codificadores de ATPase (Galambos et al., 2020). A enzima H^+ ATPase está envolvida em mecanismos fundamentais para o desenvolvimento vegetal. Como por exemplo, (a) o sistema primário de transporte de íons que é fundamental para absorção de nutrientes e também, (b) no crescimento da célula vegetal, por meio da acidificação do apoplasto, que é fundamental para o aumento da plasticidade da parede celular (Hager et al., 1991; Barbez et al., 2017). Sabendo-se que SH induzem a atividade de H^+ ATPase em plantas, Olivares e colaboradores (2017) hipotetizaram que a diminuição do pH ocasionado pela extrusão de prótons por H^+ -ATPase, induzida por SH, poderia facilitar o processo de colonização endofítica. Uma vez que, as enzimas hidrolíticas da parede celular utilizadas por BPCV para entrada e disseminação no tecido vegetal, parecem ter sua ação intensificada em pH baixo.

Mudanças no metabolismo vegetal já foram relatadas anteriormente após aplicação de bioestimulantes, a inoculação de BPCV e AH. A atividade de enzimas relacionadas a assimilação de N foi promovida pela aplicação de AH e de *H. seropedicae* em milho (Canellas et al., 2013). De forma similar, a inoculação de *Enterobacter* sp. 32 A e aplicação de AH em tomate, foi capaz de induzir genes relacionados com a assimilação de N (Galambos et al., 2020). A aplicação de bactérias benéficas e humatos foi capaz de aumentar a produtividade em tomate e de estimular o metabolismo secundário e de defesa da planta. A expressão de genes relacionados a hormônios vegetais como, o ácido jasmônico, auxinas, giberelinas e citocininas foram observados em plantas na presença de AH e BPCV,

a modulação hormonal na planta é um dos mecanismos relacionados a promoção de crescimento vegetal. O metabolismo oxidativo vegetal também foi afetado por AH, este composto foi capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de enzimas envolvidas no metabolismo de EROS em raízes de arroz, aplicação de AH foi correlacionado com aumento do crescimento radicular destas plantas. Estudos propuseram que concentrações adequadas de EROS podem atuar na sinalização para o crescimento radicular (García et al., 2016). Alterações fisiológicas causadas por BPCV e SH podem justificar mudanças no perfil de exsudação radicular, a aplicação *H seropedicae* e AH alterou a composição de exsudados radiculares em milho, promovendo o aumento da quantidade e variedade de compostos nitrogenados (da Silva Lima et al., 2014). Puglisi et al. (2008, 2009) mostraram que SH afetou a deposição de C pelas raízes de milho, resultando também, na mudança da comunidade microbiana da rizosfera. A aplicação AH e um consórcio microbiano (bactérias e fungos) em mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L.) alterou significativamente a comunidade bacteriana da rizosfera, possivelmente devido a mudanças no padrão de exsudados radiculares. Atrelado a isso, foi observado um aumento de 50% de massa seca da parte aérea e de 43% de raiz (Schoebitz et al., 2016).

A rizodeposição, afeta a atividade e composição das comunidades microbianas associada ao vegetal. Estes microrganismos desempenham papel fundamental na retroalimentação planta-solo. Neste sentido, a modulação da natureza química de exsudados radiculares mediada por SH e BPCV pode fornecer um ganho adicional ao vegetal, recrutando microrganismos que atuem na melhoria da nutrição de plantas e na proteção contra estresse, como também na ciclagem de nutrientes.

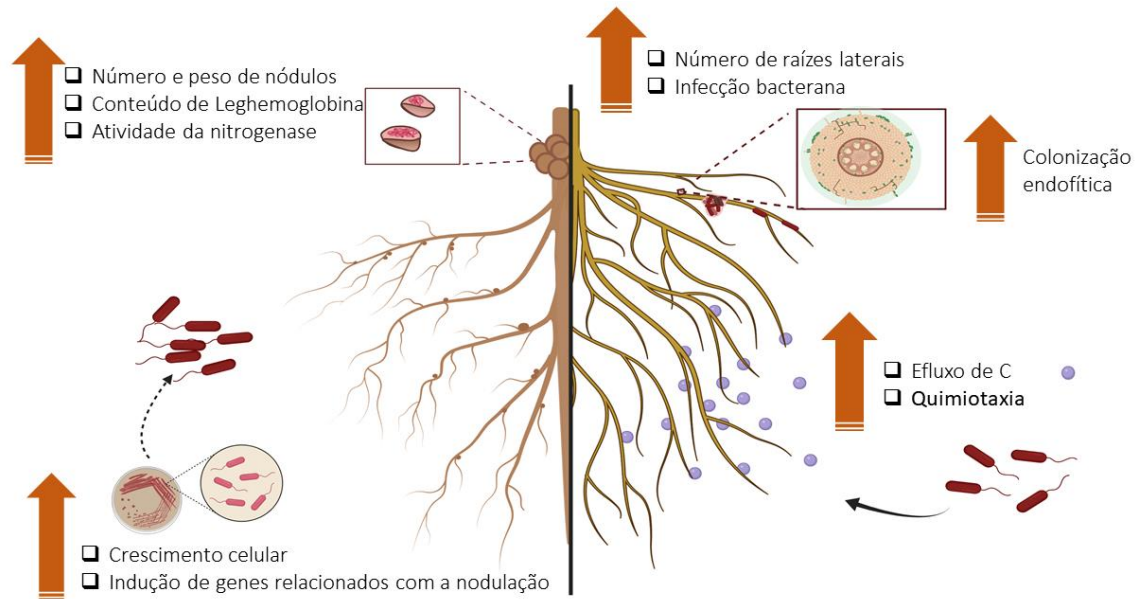


Figura 2: Resumo dos resultados encontrados na literatura sobre os efeitos de substâncias húmicas (SH) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e a interação com sistemas radiculares de plantas. A aplicação de SH ao meio de cultura afeta o crescimento e metabolismo bacteriano de rizóbios e induz a expressão de genes relacionados aos processos de nodulação e fixação de nitrogênio. Experimentos em casa de vegetação revelaram que a aplicação de SH + rizóbios em leguminosas proporcionou aumento no número e peso de nódulos, teores de N, atividade de nitrogenase e teor de leg-hemoglobina. Em plantas não leguminosas, a combinação de SH + BPCV tem sido associada ao aumento da colonização endofítica. O aumento da ramificação radicular devido a SH proporciona mais pontos de infecção para entrada bacteriana e, portanto, para colonização do tecido vegetal. O aumento do efluxo de carbono através das raízes estimula a quimiotaxia microbiana do solo para a rizosfera. Adaptado de Olivares et al. (2017). Figura criada usando BioRender (<https://biorender.com/>).

2.5 BPCV e SH na tolerância de plantas ao estresse

A tolerância de plantas ao estresse abiótico é obtida por meio de diferentes procedimentos como, melhoramento vegetal, engenharia genética e utilização de fertilizantes, estes processos são demorados e onerosos e em alguns casos, geram prejuízos ao ambiente (Eneji et al., 2008; Khan et al., 2017; Hasanuzzaman et al., 2018; Lamaoui et al., 2018; Wani et al., 2020). Uma abordagem ambientalmente correta para a melhoria da produção agrícola no que tange mitigar os efeitos adversos de estresses ambientais é a utilização de BPCV e de bioestimulantes, como SH (Marques Júnior et al., 2008; García et al., 2016; Olivares et al., 2017). Estas biotecnologias são bastante difundidas e amplamente aceitas em diversas localidades (Rose et al., 2014; Santos et al., 2019). A utilização de BPCV e de SH em conjunto ou separadamente foi relatado por aumentar o crescimento vegetal em condições normais e estressoras (Canellas e Olivares, 2014; Olivares et al., 2017) Relatórios anteriores indicaram que alterações na morfologia radicular induzidas SH podem melhorar a colonização de BPCV, favorecendo sua fixação e sobrevivência na superfície radicular (Canellas et al., 2013; Canellas e Olivares, 2017). O aumento da colonização e multiplicação de BPCV em plantas mediado por SH pode estar atrelado a melhoria no estabelecimento vegetal, no entanto, não se deve desconsiderar o efeito direto de SH tanto sobre plantas como sobre a bactéria inoculada.

Recentemente, a aplicação de AH e isolado de *Bacillus cereus* SA1 proporcionou mudanças morfológicas e fisiológicas em tomate em casa de vegetação sob estresse térmico. As plantas tratadas com estes dois bioestimulantes quando comparadas com o controle (sem SA1, sem AH) apresentaram maior comprimento da parte aérea e raiz, maiores concentrações de P, K e Fe, maior biomassa seca e fresca, aumento na fluorescência da clorofila e alterações no teor de ácido salicílico (AS), tanto em condições normais como sob estresse térmico (Khan et al., 2020).

Testes em campo com cártamo mostraram que aplicação de diferentes espécies de *Bacillus* (*Bacillus megatorium* M3 e *Bacillus subtilis* OSU142) e AH

(*Carthamus tinctorius L.*) proporcionou em condições irrigadas e não irrigadas, um efeito aditivo sobre o crescimento e produção desta cultura (Ekin, 2020).

Em condição de sequeiro, o uso combinado destas BPCV e AH auxiliou aclimação de plantas de cártamo durante a falta de água, melhorando características relacionadas ao rendimento e a sua morfologia, como a altura da planta, número e diâmetro de capítulos, diâmetro de caule, peso de 1000 sementes, número de sementes e óleo (Ekin,2020). Os autores propuseram que os ganhos em rendimentos em sequeiro, pode estar relacionada a maior tolerância desta planta ao déficit hídrico, com aumento do conteúdo de água e minerais, o que pode ser atribuído ao incremento do sistema radicular, pela ação de BPCV e AH (Olivares et al., 2017). Semelhantemente, o efeito da aplicação de BPCV e SH em milho foi acentuado no ano marcado com um estresse severo a seca. Foi observado também, que parcelas de milho que receberam estes bioestimulantes, apresentaram maiores quantidade de raízes deixadas ao solo após a colheita, o que pode contribuir com a manutenção da matéria orgânica deste recurso (Canellas et al., 2015; Olivares et al., 2017).

Um dos principais impactos BPCV e SH sobre o crescimento vegetal é a melhoria na aquisição de nutrientes e estímulo ao sistema radicular, muitas vezes estes efeitos são relacionados a auxina ou a compostos com “efeito like auxina” (Canellas et al., 2002; Spaepen et al., 2014). Foi proposto que o papel da auxina no crescimento vegetal está relacionado a indução da atividade de H⁺-ATPases, que gera a acidificação apoplástica e assim, proporciona o afrouxamento da parede celular, permitindo o alongamento da célula (Hager et al., 1991; Frías et al., 1996). A ativação de H⁺-ATPases também melhora a absorção de nutrientes, impulsionando o transporte de íons através da membrana celular (Sze, 1985; Morsomme e Boutry, 2000). Canellas e colaboradores (2013) relataram que a aplicação de *H seropedicae* e SH em milho ativou o metabolismo da planta, incluindo o aprimoramento da atividade H⁺-ATPases, alterações no metabolismo de açúcar e N, fotossíntese, bem como, indução de raízes laterais e a maior colonização por *H seropedicae*.

Tais processos já foram estimulados por BPCV e SH em diferentes culturas. Neste sentido, para alívio dos danos de estresse salino, foi testada a aplicação em conjunto e separadamente de *Pseudomonas stutzeri* e AH em pimentas com

diferentes sensibilidades a salinidade. Apesar de *P. stutzeri* e AH apresentarem resultados promissores quando aplicados separadamente, quando combinados não apresentaram sinergismo de ação em parâmetros vegetais, apenas na melhoria das taxas de K^+/Na^+ e Ca^{2+}/Na^+ (Amor e Cuadra-Crespo, 2011; Bacilio et al., 2017). As combinações e/ou concentrações BPCV e AH, época de aplicação e espécie vegetal são fatores afetam o efeito de BPCV e AH sobre o crescimento vegetal.

Diferentemente, a aplicação BPCV e AH foi promissora durante estresse por alta temperatura em tomateiro, além de estimular o crescimento vegetal, houve regulação positiva do fator de transcrição responsivo ao estresse térmico (*SIHsfA1a*) e o transportador de potássio (K) de alta afinidade (*SIHKT1*) (Khan et al., 2020). O K auxilia na regulação do equilíbrio iônico e na manutenção da homeostase de íons sob estresse (Hasanuzzaman et al., 2018). Maiores concentrações de prolina foram estimuladas por BPCV e AH durante o estresse, o acúmulo deste aminoácido é considerado um mecanismo adaptativo sob estresse abiótico (Ashraf e Foolad, 2007). As enzimas antioxidantes também foram estimuladas pela aplicação de BPCV e AH juntamente a menores valores de peroxidação lipídica (Khan et al., 2020). Estas enzimas atuam na limpeza EROs, estes compostos em excesso causam prejuízo as plantas (Arora et al., 2002). Notavelmente, a ação protetora do AH em plantas de arroz submetidas ao estresse osmótico foi associado maior atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POX; García et al., 2016). A avaliação da recuperação de plantas de cana-de-açúcar ao déficit hídrico quando tratadas com BPCV e/ou AH revelou que AH auxiliou a recuperação de plantas a seca através maior indução da atividade de enzimas antioxidantes, este tratamento também proporcionou o aumento da taxa de fotossintética líquida como consequência da maior transpiração e condutância estomática (Aguilar et al., 2016), este comportamento também foi observado anteriormente em milho (Canellas et al., 2013). Russell et al. (2006) atribuíram à abertura estomática a atividade H^+ -ATPase induzida pela ação “like-auxina” de SH. Enquanto a inoculação com BPCV induziu a maior preservação de água no tecido da planta, através da manutenção do potencial de água nas folhas e do conteúdo relativo de água (CRA), tais efeitos possivelmente associados ao fechamento eficiente dos estômatos, este comportamento assemelha-se “*delayed stress on set*”

que é um termo utilizado para designar a maior preservação hídrica no tecido vegetal (Aguiar et al., 2016). As plantas de cana de açúcar tratadas com AH combinado com BPCV exibiram o maior potencial hídrico após reidratação e alto CRA. Plantas de feijão comum cv 'Grafite' que receberam a aplicação de *Rhizobium tropici*, *H seropedicae* e SH foram submetidas a seca, estas plantas apresentaram em relação a plantas controle, a maior preservação da água nos tecidos vegetais devido ao maior CRA (da Piedade Melo et al., 2017).

A aplicação de suspensões microbianas e SH pode promover a adaptação de plantas a ambientes estressados (Olivares et al., 2017). A utilização destes compostos na promoção de crescimento vegetal gera mudanças fisiológicas, transcricionais e metabólicas que podem preparar as plantas para uma defesa aprimorada antes de qualquer ocorrência de estresse. Um trabalho recente constatou o efeito “priming” de AH em plantas de milho perante diferentes estresses abióticos. Onde, a exposição prévia das plantas ao AH gerou um condicionamento metabólico a planta, de modo que, o vegetal apresentou maior tolerância quando foi desafiado por um estresse abiótico subsequente (Canellas et al., 2020).

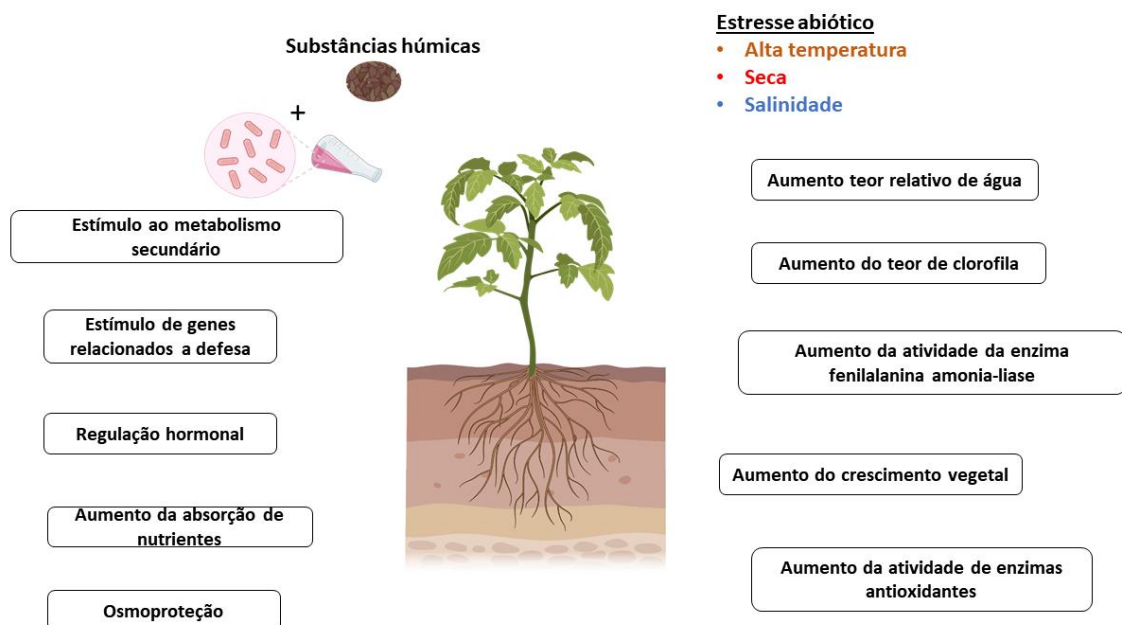


Figura 3: Mecanismos relacionados à tolerância vegetal ao estresse abiótico mediado por Substâncias húmicas e Bactérias promotoras de crescimento vegetal. Figura criada usando BioRender (<https://biorender.com/>).

3 REFERÊNCIAS

Aguiar NO, Medici LO, Olivares FL, Dobbss LB, Torres-Netto A, Silva SF, Novotny EH, Canellas LP (2016) Metabolic profile and antioxidant responses during drought stress recovery in sugarcane treated with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria: metabolic profile and antioxidant responses in drought stressed sugarcane. **Annals Of Applied Biology** 168: 203–213.

Alves BJR, Boddey RM, Urquiaga S (2003) The Success of BNF In Soybean in Brazil. **Plant And Soil** 252:1–9.

Amor FM, Del Cuadra-Crespo P (2011) Plant Growth-promoting bacteria as a tool to improve salinity tolerance in sweet pepper. **Functional Plant Biology** 39:82–90.

Araújo ES et al (2006) Importância do N das raízes da soja para a produtividade da cultura sucessora e para o balanço de N do sistema. **Embrapa Agrobiologia-Circular Técnica (INFOTECA-E)**.

Armanhi JSL, de Souza RSC, Biazotti BB, Yassitepe JECT, Arruda P (2021) Modulating Drought Stress Response of Maize by a Synthetic Bacterial Community. **Frontiers In Microbiology** 12:3042.

Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative Stress and Antioxidative System in Plants. **Current Science** 82:1227–1238.

Ashraf M, Foolad MR (2007) Roles of Glycine Betaine and Proline in Improving Plant Abiotic Stress Resistance. **Environmental and Experimental Botany** [S59:206–216].

Bacilio M, Moreno M, Lopez-Aguilar DR, Bashan Y (2017) Scaling from the growth chamber to the greenhouse to the field: demonstration of diminishing effects of mitigation of salinity in peppers inoculated with plant growth-promoting bacterium and humic acids. **Applied Soil Ecology** 119:327–338.

Badenoch-Jones J, Flanders DJ, Rolfe BG (1985) Association of *Rhizobium* strains with roots of *Trifolium repens*. **Applied and Environmental Microbiology** 49:1511–1520.

Baldotto LEB, Baldotto MA, Canellas LP, Bressan-Smith R, Olivares FL (2010) Growth promotion of pineapple “vitória” by humic acids and *Burkholderia* spp during acclimatization **Revista Brasileira De Ciência Do Solo** 34:1593–1600.

Barbez E Dünser K Gaidora A Lendl T Busch W (2017) Auxin steers root cell expansion via apoplastic pH regulation in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences** 114:E4884–E4893.

Bitton G, Henis Y, Lahav N (1972) Effect of several clay minerals and humic acid on the survival of *Klebsiella aerogenes* exposed to ultraviolet irradiation. **Applied Microbiology** 23:870–874.

Canellas LP, Balmori DM, Médiçi LO, Aguiar NO, Campostrini E, Rosa RCC, Façanha AR, Olivares FLA (2013) Combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea Mays* L). **Plant And Soil** 366 :119–132.

Canellas LP, Canellas NOA, da S, Irineu LES, Olivares FL, Piccolo (2020) A plant chemical priming by humic acids. **Chemical and biological technologies in agriculture** 7:12.

Canellas LP, Olivares FL (2014) Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chemical And Biological Technologies In Agriculture** 1 : 3.

Canellas LP, Olivares FL (2017) Production of border cells and colonization of maize root tips by *Herbaspirillum seropedicae* are modulated by humic acid. **Plant And Soil** 417: 403–413.

Canellas LP, Olivares FL, Aguiar NO, Jones DL, Nebbioso A, Mazzei P, Piccolo A (2015) Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae** 196 :15–27.

Canellas LP, Olivares FL, Okorokova-Façanha AL, Façanha AR (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation lateral root emergence and plasma membrane H⁺-atpase activity in maize roots. **Plant Physiology** 130:1951–1957.

Canellas LP, Piccolo A Dobbss LB, Spaccini R, Olivares FL, Zandonadi DB, Façanha AR (2010) Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. **Chemosphere** 78:457–466.

Canellas LP, Teixeira Junior LRL, Dobbss LB, Silva CA, Medici LO Zandonadi DB Façanha AR (2008) Humic acids crossinteractions with root and organic acids. **Annals Of Applied Biology** 153:157-166.

Capstaff NM, Morrison F, Cheema J, Brett P, Hill L, Muñoz-García JC, Khimyak YZ, Domoney C, Miller AJ (2020) Fulvic acid increases forage legume growth inducing preferential up-regulation of nodulation and signalling-related genes. **Journal Of Experimental Botany** 71:5689–5704.

Cattelan AJ, Dall'agnol A (2018) The rapid soybean growth in Brazil. **Ocl** 25:102.

Da Piedade MA, Olivares FL, Médici LO, Torres-Neto A, Dobbss LB, Canellas LP (2017) Mixed Rhizobia and *Herbaspirillum seropedicae* inoculations with humic acid-like substances improve water-stress recovery in Common Beans. **Chemical And Biological Technologies in Agriculture** 4:6. 2017

Da Silva LL, Olivares FL, Rodrigues OR, Vega MRG, Aguiar NO, Canellas LP (2014) Root exudate profiling of maize seedlings inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* and humic acids. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture** 1:23.

da Silva MSRA, de Melo SSB, Hidalgo CW, Oliveira R, Barbosa SC H, Oliveira EC, Rigobelo E C (2021a) K-Humate as an agricultural alternative to increase nodulation of soybeans inoculated with *Bradyrhizobium*. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology** [S L] V 36 P 102129 2021 A

da Silva MSRA et al. (2021b) Humic acids enrich the plant microbiota with bacterial candidates for the suppression of pathogens. **Applied Soil Ecology** 168: 104146.

Da Silva SF, Olivares FL, Canellas LP (2017) The biostimulant manufactured using diazotrophic endophytic bacteria and humates is effective to increase sugarcane yield. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture** 4: 24.

de Carvalho LAL, Teheran-Sierra LG, Funnicelli MIG, da Silva RC, Campanari MFZ, de Souza RSC, Arruda P, Soares MA, Pinheiro DG (2021) Farming systems influence the compositional structural and functional characteristics of the sugarcane-associated microbiome. **Microbiological Research** 252:126866.

de Haan H (1974) Effect of a fulvic acid fraction on the growth of a *Pseudomonas* from Tjeukemeer (The Netherlands). **Freshwater Biology** 4 :301–310.

de Souza RSC, Armanhi JSL, Arruda P (2020) From microbiome to traits: designing synthetic microbial communities for improved crop resiliency. **Frontiers in Plant Science** 11:1179.

de Souza RSC, Armanhi JSL, Arruda P (2020) From microbiome to traits: designing synthetic microbial communities for improved crop resiliency **Frontiers in Plant Science** 11

Della Lucia M C Bertoldo G Broccanello C Maretto L Ravi S Marinello F Sartori L Marsilio G Baglieri A Romano A Colombo M Magro F Campagna G Concheri G Squartini A Stevanato P Novel Effects Of Leonardite-Based Applications On Sugar Beet **Frontiers In Plant Science** [S L] V 12 2021 Disponível Em: <<https://www.frontiersin.org/Article/103389/Fpls2021646025>> Acesso Em: 18 Mar 2022

Ekin Z (2020) Field evaluation of rhizobacterial inoculants in combination with humic substances to improve seed and oil yields of safflower (*Carthamus tinctorius* L) under irrigated and rainfed conditions **Applied Ecology And Environmental Research** 18:6377–6403.

Embrapa **Dados Econômicos - Portal Embrapa** 2021 Disponível Em: <<https://www.embrapa.br/en/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>> Acesso Em: 3 Abr 2022

Eneji AE, Inanaga S, Muranaka S, Li J, Hattori T, An P, Tsuji W (2008) Growth and nutrient use in four grasses under drought stress as mediated by silicon fertilizers. **Journal of Plant Nutrition** 31:355–365.

Farhat MB, Boukhris I, Chouayekh H (2015) Mineral phosphate solubilization by *Streptomyces* sp. CTM396 involves the excretion of gluconic acid and is stimulated by humic acids. **FEMS microbiology letters** 362.

Freire JRJ, Verneti FDJA (1999) Pesquisa com Soja a seleção de Rizóbio e a produção de inoculantes no Brasil **Pesquisa Agropecuária Gaúcha** 5: 117–126.

Freitas VF, De Cerezini P, Hungria M, Nogueira MA (2022) Strategies to deal with drought-stress in Biological Nitrogen Fixation in Soybean. **Applied Soil Ecology** 172:104352.

Frías I, Caldeira MT, Pérez-Castiñeira JR, Navarro-Aviñó JP, Culiañez-Maciá FA, Kuppinger O, Stransky H, Pagés M, Hager A, Serrano RA (1996) Major isoform of the maize plasma Membrane H(+)-Atpase: characterization and induction by auxin in coleoptiles **The Plant Cell** 8:1533–1544.

Galambos N, Compant S, Moretto M, Sicher C, Puopolo G, Wäckers F, Sessitsch A, Pertot I, Perazzolli M (2020) Humic acid enhances the growth of tomato promoted by endophytic bacterial strains through the activation of hormone- growth- and transcription-related processes. **Frontiers In Plant Science** 11:582267.

Gao TG, Yuan XY, Jiang F, Zhen LB, Shui YJ, Tao WE, Li YH (2015) Nodulation characterization and proteomic profiling of *Bradyrhizobium Liaoningense* Ccbau05525 in response to water-soluble humic materials. **Scientific Reports** [S L] V 5 N 1 P 10836 2015

García AC, Olaetxea M, Santos LA, Mora V, Baigorri R, Fuentes M, Zamarreño AM, Berbara RLL, Garcia-Mina J M (2016) Involvement of hormone- and ros-signaling pathways in the beneficial action of humic substances on plants growing under normal and stressing conditions. **Biomed Research International** 2016:1–13.

García AC, Castro TAVT, Berbara RLL, Tavares OCH, Elias SS, Amaral SNMB, Zonta E (2019) Revisão Sobre a Relação Estrutura-Função das Substâncias Húmicas e a sua Regulação do Metabolismo Oxidativo em Plantas. **Revista Vitual de química** 11:754-770.

Gaur AC, Bhardwaj KKR (1971) Influence of sodium humate on the crop plants inoculated with bacteria of agricultural importance. **Plant And Soil** 35:613–621.

Hager A, Debus G, Edel HG, Stransky H, Serrano R (1991) Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺-Atpase **Planta** 185:4.

Hasanuzzaman M, Bhuyan M, Nahar K, Hossain Md, Mahmud J, Hossen Md, Masud A, Moumita FM (2018) Potassium: a vital regulator of plant responses and tolerance to abiotic stresses. **Agronomy** 8:31.

Hassani MA, Durán P, Hacquard S (2018) Microbial interactions within the plant holobiont. **Microbiome** 6 :58.

Hirakuri MH, Lorini I, França-Neto JB, Krzyzanowski FC, Henning AA, Henning FA, Benassi VT (2018) Análise de aspectos econômicos sobre a qualidade de grãos de soja no Brasil. **Circular técnica**145:1-22.

Hungria M, Campo RJ, Mendes IC (2007). A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**.

Hungria M, Mendes IC (2015). Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? 10.

Jindo K, Olivares FL, Malcher DJP, Sánchez-Monedero MA, Kempenaar C, Canellas LP (2020) From lab to field: role of humic substances under open-field and greenhouse conditions as biostimulant and biocontrol agente. **Frontiers in Plant Science** 11:426.

Khan A, Tan DKY, Munsif F, Afridi MZ, Shah F, Wei F, Fahad S, Zhou R (2017) Nitrogen nutrition in cotton and control strategies for greenhouse gas emissions: A Review. **Environmental Science and Pollution Research** 24:23471–23487.

Khan MA, Asaf S, Khan AL, Jan R, Kang SM, Kim KM, Lee IJ (2020) Extending thermotolerance to tomato seedlings by inoculation with sa1 isolate of *Bacillus*

cereus and comparison with exogenous humic acid application. **Plos One**15: E0232228.

Kirschner RA, Parker BC, Falkinham JO (1999) Humic and fulvic acids stimulate the growth of *Mycobacterium avium*. **Fems Microbiology Ecology** 30:327–332.

Lamaoui M, Jemo M, Datla R, Bekkaoui F (2018) Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. **Frontiers in Chemistry** 6 :26.

Lyu D, Zajonc J, Pagé A, Tanney CAS, Shah A, Monjezi N, Msimbira LA, Antar M, Nazari M, Backer R, Smith DL (2021) Plant holobiont theory: the phytomicrobiome plays a central role in evolution and success. **Microorganisms** 9 : 675.

Marques JRB, Canellas LP, Silva LG, Olivares FL (2008) Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. **Revista Brasileira De Ciência Do Solo** 32:1121–1128.

Moretti LG, Crusciol CAC, Bossolani JW, Momesso L, Garcia A, Kuramae EE, Hungria M (2020) Bacterial Consortium and microbial metabolites increase grain quality and soybean yield. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition** 20:1923–1934.

Morsomme P, Boutry M (2000) The Plant Plasma Membrane H⁺-Atpase: Structure Function And Regulation **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Biomembranes** 1465:1–16.

Muscolo A, Cutrupi S, Nardi S (1998) IAA detection in humic substances. **Soil Biology and Biochemistry** 30:1199-1201.

Nardi S, Ertani A, Francioso O(2017) Soil–root cross-talking: the role of humic substances. **Journal Of Plant Nutrition And Soil Science**180:5–13.

Nardi S, Schiavon M, Francioso O (2021) Chemical structure and biological activity of humic substances define their role as plant growth promoters. **Molecules** 26: 2256.

Nutaratat P, Monprasit A, Srisuk N (2017) High-yield production of indole-3-acetic acid by *Enterobacter* sp Dmku-Rp206 a rice phyllosphere bacterium that possesses plant growth-promoting traits. **3 Biotech** 7:305.

Olaetxea M, Mora V, Bacaicoa E, Garnica M, Fuentes M, Casanova E, Zamarreño A M, Iriarte JC, Etayo D, Ederra I, Gonzalo R, Baigorri R, García-Mina JM (2015) Abscisic acid regulation of root hydraulic conductivity and aquaporin gene expression is crucial to the plant shoot growth enhancement caused by rhizosphere humic acids **Plant Physiology** 169 : 2587–2596.

Oldroyd GED, Murray JD, Poole OS, Downie JA (2011) The rules of engagement in the legume-Rhizobial symbiosis. **Annual Review Of Genetics** 45:119–144.

Olivares FL, Busato JG, de Paula AM, da Silva LL, Aguiar NO, Canellas LP (2017) Plant Growth Promoting Bacteria And Humic Substances: Crop Promotion And Mechanisms Of Action **Chemical And Biological Technologies In Agriculture** [S L] V 4 N 1 P 30 2017

Puglisi E, Fragoulis G, Del Re AAM, Spaccini R, Piccolo A, Gigliotti G, Said-Pullicino D, Trevisan M (2008) Carbon deposition in soil Rhizosphere following amendments with compost and its soluble fractions as evaluated by combined soil–plant rhizobox and reporter gene systems. **Chemosphere** 73:1292–1299.

Puglisi E, Fragoulis G, Ricciuti P, Cappa F, Spaccini R, Piccolo A, Trevisan M, Crecchio C (2009) Effects of a humic acid and its size-fractions on the bacterial community of soil rhizosphere under maize (*Zea Mays* L). **Chemosphere** 77:829–837.

Rose MT, Patti AF, Little KR, Brown AL, Jackson WR, Cavagnaro TRA (2014) Meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances. **Advances in Agronomy** 124:37–89.

Russell L, Stokes AR, Macdonald H, Muscolo A, Nardi S (2006) Stomatal responses to humic substances and auxin are sensitive to inhibitors of phospholipase A2. **Plant and Soil** 283:175–185.

Santos MS, Nogueira MA, Hungria M (2019) Microbial Inoculants: reviewing the past discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **Amb Express** 9:205.

Schnitzer M (1978). Humic substances: chemistry and reactions. **Developments in soil science** (Vol. 8, pp. 1-64). Elsevier.

Schoebitz, M, López MD, Serrí H, Martínez O, Zagal E (2016) Combined application of microbial consortium and humic substances to improve the growth performance of blueberry seedlings. **Journal of soil science and plant nutrition**16:1010-1023.

Sediyama T, Silva F, Borém, A (2015) Soja: do plantio à colheita. **Viçosa: UFV**.

Seixas CDS, Neumaier N, Balbinot Junior AA, Krzyzanowski FC, Leite RDC (2020) Tecnologias de produção de soja. **Embrapa Soja-Sistema de Produção (INFOTECA-E)**.

Spaepen S, Bossuyt S, Engelen K, Marchal K, Vanderleyden J (2014) Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. **The New Phytologist** 201:850–861.

Sze H (1985) H⁺-Translocating Atpases: advances using membrane vesicles **Annual Review of Plant Physiology** 36:175–208.

Tan KH, Tantiwiranond D (1983) Effect of humic acids on nodulation and dry matter production of Soybean Peanut and clover. **Soil Science Society of America Journal** 47:1121.

Taulé C, Vaz-Jauri P, Battistoni F (2021) Insights into the early stages of plant–endophytic bacteria interaction. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 37:1-13.

Tikhonov VV, Yakushev A V, Zavgorodnyaya Y, Byzov BA, Demin VV (2010) Effects of humic acids on the growth of bacteria. **Eurasian Soil Science** 43:305–313.

Til'ba VA, Sinegovskaya VT (2012) Role of symbiotic Nitrogen fixation in increasing photosynthetic productivity of Soybean. **Russian Agricultural Sciences** 38:361–363.

Trivedi P, Batista BD, Bazany KE, Singh BK (2022). Plant–microbiome interactions under a changing world: responses, consequences and perspectives. **New Phytologist**.

Vandenkoornhuyse P, Quaiser A, Duhamel M, Le Van A, Dufresne A (2015) The importance of the microbiome of the plant Holobiont. **The New Phytologist** 206:1196–1206.

Wani SH, Kumar V, Khare T, Tripathi P, Shah T, Ramakrishna C, Aglawe S, Mangrauthia SKM (2020) Applications for engineering abiotic stress tolerance in plants **Biologia**75:1063–1081.

Winarso S, Sulistyanto DHEA (2011) Effects of humic compounds and phosphate-solubilizing bacteria on phosphorus availability in an acid soil. **Journal of Ecology and The Natural Environment** 3:232–240.

Young C-C, Rekha PD, Lai WA, Arun AB (2006) Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. **Biotechnology and Bioengineering** 95:76–83.

Zanin L, Tomasi N, Cesco S, Varanini Z, Pinton R (2019) Humic substances contribute to plant iron nutrition acting as chelators and biostimulants. **Frontiers in PlantScience**10:675.

CAPÍTULO 2- K-humate as an agricultural alternative to increase nodulation of soybeans inoculated with *Bradyrhizobium*

Abstract-The use of products based on humic substances (HS), such as K humate (KH), along with soybean seed inoculation technology, can provide positive impacts on biological nitrogen fixation (BNF). In this work, different KH concentrations (0, 50, 100, 150, 200 and 4000 mg L⁻¹ KH) were applied to soybean seeds inoculated with *Bradyrhizobium*, and the effect of this compound on the *Bradyrhizobium* seed survival, root morphology, nodulation, biomass increase and N content was evaluated. KH concentrations of 50, 100 and 4000 mg L⁻¹ increased ($p < 0.05$) the survival of *Bradyrhizobium* in seeds after 25 days of storage. The application of KH showed superior effects compared to the control in relation to the length of primary roots (50 and 4000 mg KH L⁻¹), total length of roots (50, 100 and 150 mg L⁻¹ KH), volume (all concentrations), diameter (50, 100 and 4000 mg L⁻¹ KH) and root area (50, 100 and 200 mg KH L⁻¹). In the soil experiment, a KH concentration of 50 mg L⁻¹ was able to provide greater increments ($p < 0.05$) in nodulation (number and weight of nodules), biomass and N content in shoots than the control. All KH doses increased the number of nodules in relation to inoculation with *Bradyrhizobium*, suggesting that KH affects the communication between microsymbionts and the host plant. A KH concentration of 50 mg L⁻¹ was the most promising considering the N input in leaves.

Keywords: *Glycine max* (L.) Merr.; *B diazoefficiens*; *B japonicum*; humic acids; fulvic acids

Introduction

Brazil became the top soybean producer worldwide in 2020 and, together with other South American countries, Brazil accounts for 55% of global soybean production (USDA, 2020). The success of this crop in Brazil is partly attributed to the benefits of biological nitrogen fixation (BNF), especially by the inoculation of seeds of this crop with elite *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* and *B. diazoefficiens* strains, whose partnership is able to meet all N demands of the plants (Hungria et al., 2006), providing the country with savings of approximately US\$ 15 billion per year (Hungria and Mendes, 2015). This biotechnology allows greater entry of N into agricultural systems and a decrease in the use of nitrogen fertilizers, which, in addition to being costly, have environmental impacts (Sá et al., 2017). The search for more productive cultivars requires greater N input, and for this, research is encouraged to stimulate BNF and the maintenance of this process, since adverse environmental conditions put at risk the efficiency of biological processes (Hungria et al., 2015). In this sense, practices to increase nodulation are of great importance for sustainable agriculture, and experiments have been carried out to ensure improvement in the efficiency of symbiotic nitrogen fixation (Hungria et al., 2013, 2015; Chibeba et al., 2015; Souza and Ferreira, 2017).

Increases in grain yield and soybean quality accompany the benefits provided to the roots (Barbosa et al., 2021). Many works have shown that humic substances (HS) stimulate the root system of different cultures (Canellas and Olivares, 2014), and this effect can be explained through the documented role of HS in acting like auxin (Canellas et al., 2002; Canellas and Olivares, 2014; Trevisan et al., 2009). HS have already been reported to improve plant nutrition and the responses of plants to biotic and abiotic stresses (Loffredo and Senesi, 2009; García et al., 2016). In addition, this compound type has already been documented to increase the survival of bacteria when exposed to irradiation (Bitton et al., 1972) and over long periods of storage when applied together with alginate (Young et al., 2006); therefore, regarding the cultivation of inoculated plants in the field, HS have the potential to provide gains to the plant and provide additional protection to the inoculant under field conditions.

Methodologically, HS are separated according to their solubility within specific pH ranges, and three humic fractions are described based on this postulate: humic acids (HA), fulvic acids (FA) and humines (Schnitzer, 1978). In recent years, humic acids have become commercially available as soluble and affordable salts, known as potassium humates [K-humate, KH] (Imbufe et al., 2005). This product is commonly used to improve soil aggregate stability (Imbufe et al, 2005), and little is known about its potential when applied together with microbial inoculants in crops with high economic value, such as soybeans.

A few studies have evaluated the application of HS and rhizobia in legumes (Tan and Tantiwiranond, 1983; Gao et al., 2015), but in these cases, humidified material was applied to the substrate (sand and vermiculite/sand). Although positive results have been obtained, evaluations of plants in soil and with the application of HS in seeds along with inoculants, as is usually performed by farmers, still need to be conducted. Therefore, we expanded our studies, and here, we report the results obtained when *Bradyrhizobium* spp. and HS, in the form of K-humate, were applied to soybean seeds at the time of planting in an experiment carried out in a greenhouse. Our hypothesis is that the use of K-humate together with soybean inoculant can stimulate the root system and favor the entry of inoculated strains into root infection sites, which is an effect already discussed in works with grasses (Canellas and Olivares, 2014; Olivares et al., 2017) that would result in the early formation of nodules and, thus, in the fixation of nitrogen in earlier stages. We also believe that K-humate may favor the greater survival of bacteria in soybean seeds. For this, this compound was applied together with *Bradyrhizobium* in soybean seeds, and the effects on the root morphology, plant material weight, N and P contents and *Bradyrhizobium* survival in seed after days of storage were evaluated.

Material and methods

Potassium humate - K-humate (KH)

K-humate (Omnia, Brazil) contains approximately 18.70% (w/v) humic acid and 2.70% fulvic acid and does not contain humine. It is a commercial product

commonly used as a soil conditioner. KH was obtained through alkaline extraction of Victorian brown coal, and its characterization was provided by Imbue et al. (2005). The ^{13}C CP NMR spectrum has the highest peak (0–60 ppm) and can be assigned to alkyl groups, with both linear and substituted chains. Carbonyl-C is observed in the region of 160–190 ppm, and substituted C–O aryl is observed between 140 and 160 ppm. Resonances in the 100–140 ppm region of the spectrum are mainly due to aromatic-C, and the distribution of carbon signals in the spectrum is aliphatic-C at 44%, aromatic-C at 32%, carbonyl-C at 11%, O-alkyl at 9%, with the remainder corresponding to methoxy and N-alkyl groups. The total quantitative elementary analyses of K-humate showed the following results (% w/v): 4.80% potassium, 0.50% iron, 0.15% nitrogen, 0.15% silicon, 0, 10% sulfur, 0.09% sodium, 0.07% chloride, 0.05% calcium, 0.04% phosphorus and 0.60% total aluminium.

Inoculant survival in soybean seeds in the presence of K-humate

This experiment aimed to evaluate whether KH concentrations could affect the survival of *Bradyrhizobium* in soybean seeds. Therefore, seeds were previously sterilized in an autoclave one day before receiving application of the different inoculant treatments at the following concentrations: 0 (only strains of *Bradyrhizobium*, without KH), 50, 100, 150, 200 and 4000 (mg KH L⁻¹). Treatments were planned in a completely randomized design, with eight replicates per treatment. These treatments were called 0 (or control), 50, 100, 150, 200 and 4000 KH, respectively.

The estimation of the number of rhizobial colonies in soybean seeds was performed using the serial dilution technique and direct counting on plates with YMA medium. A commercial liquid inoculant (Biosoja) containing (10⁹CFU mL⁻¹) *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 and *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080 strains (MAPA, 2011) was used with the addition of KH at the above mentioned concentrations. Seed lots were mixed with the inoculant at a 1:10 proportion (inoculant:seed weight) and kept at room temperature. Bacterial survival was measured after 25 days of storage, transferring 10 seeds (~ 3 g of seeds) to 27 mL of sterile saline (0.85%), with dilution plating on YMA medium (with Congo red). The

plates were incubated in an oven at 28°C for seven days, and after microbial growth, colony forming units (CFU) were counted.

Experiment under controlled conditions

In the second experiment, we evaluated whether KH application to seeds affects plant growth and the root morphology of soybean seedlings more significantly than inoculation alone. The experiments took place under controlled conditions and with the application of the same concentrations used in the previous experiment (item 2.2), and the design was completely randomized, with four replicates per treatment.

Soybean seeds received the application of commercial inoculants *B. japonicum* SEMIA 5079 and *B. diazoefficiens* SEMIA 5080. After inoculant application according to the treatments specified above, twenty-five seeds were placed on three germitest paper sheets and moistened with water in an amount equivalent to 2.5 times the weight of the dry paper, and the test was conducted in a germination chamber at 26 °C with a 12/12 h photoperiod for six days.

Only seedlings with all well-developed parts were recorded, and evaluations consisted of measuring the dry weight of the hypocotyl, cotyledon and root, hypocotyl length and primary root length. For root reading, WinRHIZO Arabidopsis software (Regent Instruments, QC, Quebec, Canada; 2011) coupled to an Epson Expression 11000XL LA2400 image scanner was used. Soybean roots were evenly distributed under a water layer in transparent trays (20 cm in width and 30 cm in length) and, later, “scanned”. The total root length (cm), diameter (mm), area (cm²) and volume (cm³) were calculated.

Experiment in pots with soil

The third experiment evaluated whether inoculation together with the application of KH in soybean seeds could favor nodulation and, consequently, a greater increase in plant weight. For this purpose, a test was conducted in greenhouse conditions using 5 L pots filled with red latosol, and fertilization was carried out according to chemical soil analysis, namely, pH, 6.9; C, 10 g kg⁻¹; Al, 0 mmolc kg⁻¹; Ca, 79 mmolc kg⁻¹; Mg, 13 mmolc kg⁻¹; P, 14 mmolc kg⁻¹; and K,

0.7 mmolc kg⁻¹; no source of N was added. The experimental design was a randomized block design with five replicates. Soybean seeds cv. ADV 4317 IPRO received one milliliter of inoculant containing the different KH concentrations used in the previous experiments. Five inoculated seeds were placed into each pot, and after thinning, two plants were left per pot. The experiment was concluded after thirty days. Plant shoots and roots were dried and weighed to obtain the dry weights. Nodules were removed from roots and counted to obtain the number of nodules, which were subsequently dried and weighed to obtain the dry weight of the nodules. After drying and weighing, the plant material (shoots and roots) was ground in a Wiley mill (20 mesh) and submitted for analysis of phosphorus [P] (Ames, 1966) and total nitrogen [N] (Gautam and Panigrahi, 2007). The amounts of nitrogen and phosphorus extracted from soybean shoots and roots were calculated by multiplying the respective concentrations of these nutrients by the amount of dry matter of stems or roots in each treatment.

Data analysis

Data normality and heteroscedasticity were assessed by the Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. An analysis of variance (ANOVA) was performed for each experiment, wherein differences were detected, and means were compared using Tukey's multiple comparison test at the 5% significance level. Principal component analysis (PCA) was used to describe the relationship between plant biometric and morphological variables and their associations with treatments. PCA was performed after data standardization (to avoid the influence of different units of the means of response variables), all statistical analyses were performed with R software (R Core Team, 2019).

Results

Effect of KH on inoculant survival, biomass production and root morphology in soybean seedlings

The treatment with 150 mg KH L⁻¹ was lost before this analysis; therefore, it is not shown in the graph. Treatments with 50, 100 and 4000 mg KH L⁻¹ had higher survival values ($p < 0.05$) compared to the control. In addition, it was observed that the 50 mg KH L⁻¹ treatment provided the greatest cell viability (Fig. 1). The lowest survival value ($p < 0.05$) was attributed to the control (0 mg KH L⁻¹). Concentrations greater than 50 mg KH L⁻¹ did not appear to increase inoculant survival (among them 100, 200 and 4000). Further studies to test whether concentrations below 50 mg KH L⁻¹ could provide greater inoculant survival should be carried out (Fig. 1).

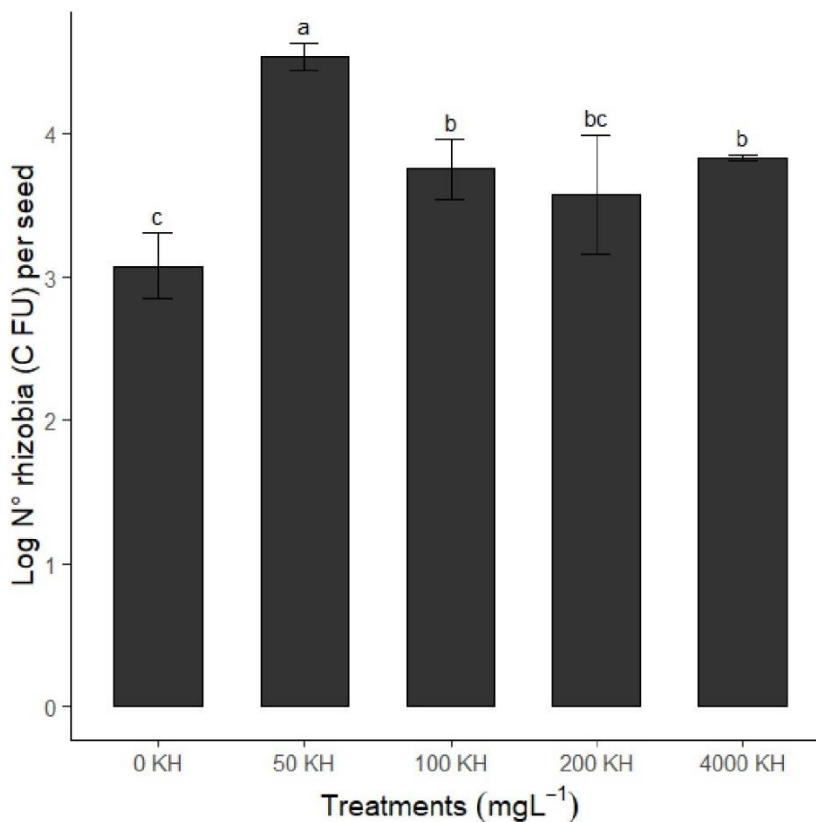


Fig. 1. Survival (\log_{10} of the CFU number) of *Bradyrhizobium* strains inoculated into soybean seeds treated with different K-humate (KH) concentrations, as evaluated after 25 days of contact

The weights of roots and cotyledons showed no difference ($p > 0.05$) among treatments. Regarding the weight of the hypocotyl, KH concentrations of 150 and 4000 mg L⁻¹ showed higher values ($p > 0.05$) than those of the treatment receiving 50 mg KH L⁻¹. On the other hand, no difference ($p > 0.05$) in hypocotyl height in relation

to the primary root length was observed, with the 50 and 4000 mg KH L⁻¹ treatments showing higher values ($p < 0.05$) than that of the control (Table 1).

Table 1. Dry weight values of the hypocotyl, roots, cotyledon and hypocotyl and main root length of soybean seedlings after inoculation with *Bradyrhizobium* seeds with different K-humate (KH) concentrations.

Inoculation	mg. plant ⁻¹			cm	
	Hypocotyl weight	Root weight	Cotyledons weight	Hypocotyl height	Primary root length
<i>Bradyrhizobium</i>	33.10± 2.70 ^{ab}	13.40± 1.50 ^a	71.10± 3.00 ^a	7.43± 1.11 ^a	11.40± 0.68 ^b
<i>Bradyrhizobium</i> + 50 mg KH L ⁻¹	26.50± 8.50 ^b	16.00± 4.60 ^a	66.80± 5.50 ^a	8.97± 2.40 ^a	13.35± 0.72 ^a
<i>Bradyrhizobium</i> + 100 mg KH L ⁻¹	34.20± 4.90 ^{ab}	14.80± 5.70 ^a	73.50± 5.30 ^a	8.22± 0.68 ^a	12.62± 0.50 ^{ab}
<i>Bradyrhizobium</i> + 150 mg KH L ⁻¹	37.50± 2.20 ^a	12.70± 1.40 ^a	65.20± 0.20 ^a	8.20± 0.41 ^a	12.69± 0.48 ^{ab}
<i>Bradyrhizobium</i> + 200 mg KH L ⁻¹	33.60± 1.40 ^{ab}	11.70± 4.70 ^a	69.80± 9.10 ^a	9.08± 0.53 ^a	12.88± 0.95 ^{ab}
<i>Bradyrhizobium</i> + 4000 mg KH L ⁻¹	36.80± 3.50 ^a	14.80± 1.40 ^a	68.00± 4.80 ^a	9.71± 1.16 ^a	12.92± 0.53 ^a

Different letters in rows indicate differences among treatments according to Tukey's test ($p < 0.05$).

An increase ($p < 0.05$) in the total root length was observed when using KH concentrations from 50 to 150 mg L⁻¹ (Fig. 2A), with a decrease at concentrations from 200 to 4000 mg KH L⁻¹, similar to the control. Regarding the root diameter, the 0, 150 and 200 mg KH L⁻¹ treatments showed the lowest values, indicating the stimulation of larger amounts of finer roots. KH concentrations of 50, 100 and 4000 mg L⁻¹ seemed to stimulate thicker roots than the other treatments because these plants presented larger diameter values. All KH concentrations stimulated the root volume in relation to the control ($p < 0.05$), whereas the root area showed higher values for the 50, 150 and 200 mg KH L⁻¹ treatments than for the control (Fig. 2C).

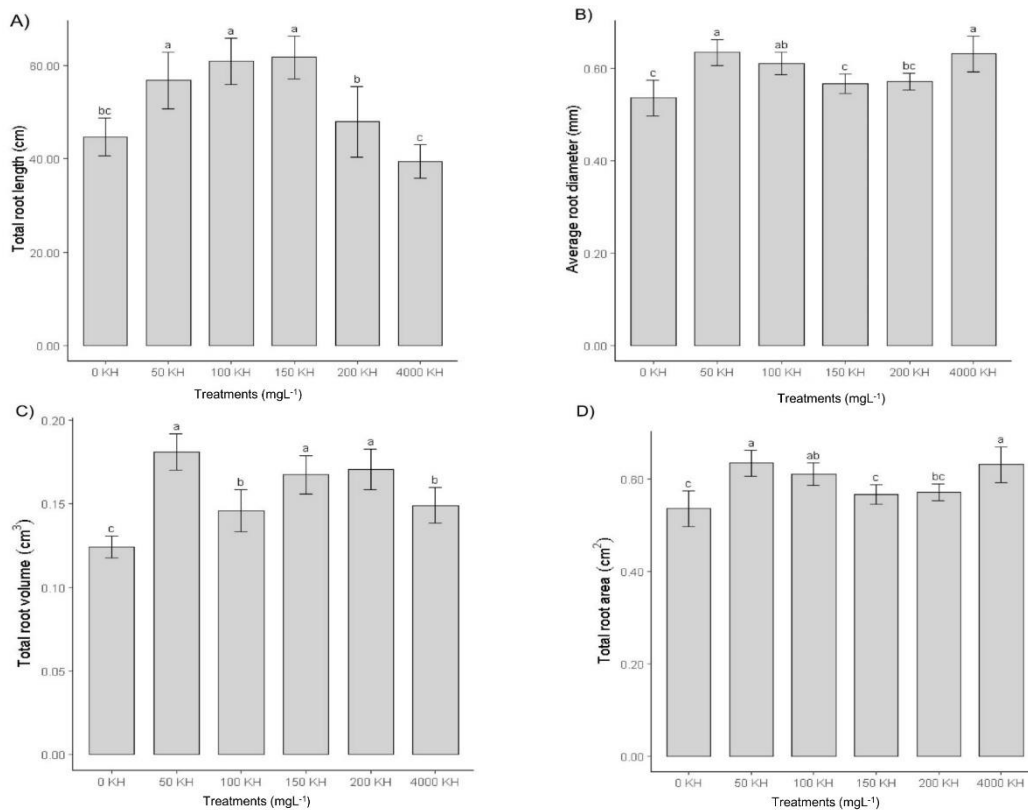


Fig. 2. Root parameters of soybean seedlings inoculated as seeds with *Bradyrhizobium* together with different K-humate (KH) concentrations. KH concentrations of 0-4000 mg L⁻¹ are represented from right to left as follows: 0 KH, 50 KH, 100 KH, 150 KH, 200 KH and 4000 KH.

PCA was performed to assess the relationships of the increase in weight and the root morphology of soybean seedlings with the different treatments applied (0-

4000 mg KH L⁻¹) as seen in the Fig. 3A and 3B. The first two principal components explained ~ 70% of the total variation in the evaluated data (44.8% for PC1 and 23.9% for PC2).

PCA suggested that most response variables linked to root morphology (primary root length, total root length, root diameter, root area, root volume), root weight and hypocotyl height were more strongly affected (showed higher values) by treatments receiving KH at concentrations of 50 and 150 mg KH L⁻¹, and variables were projected opposite of the control treatment.

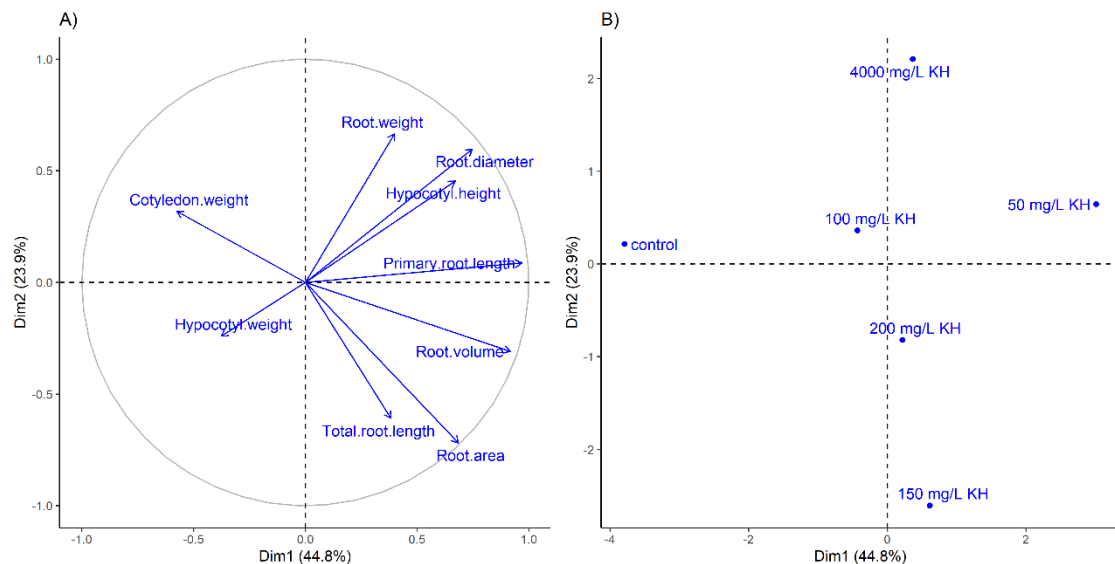


Fig. 3. Principal component analysis (PCA) of the plant weight and morphology of soybean roots inoculated with *Bradyrhizobium* at different K-humate (KH) concentrations. A) PCA for variables and B) for treatments.

Effect of KH application on biomass production and nodulation in soybean plants

All KH concentrations, including the highest (4000 mg KH L⁻¹), stimulated the number of nodules. This concentration along with the control showed the lowest weight values ($p < 0.05$) of nodules when compared to plants that received 50, 100 and 150 mgKHL⁻¹(Table2)..

Table 2. Number and dry weight of the nodules, dry weight of the shoots and roots, root/shoot ratio and N and P levels (shoots and roots) of soybean plants inoculated with *Bradyrhizobium* strains in different K-humate (KH) concentrations in experiments with soil.

Inoculation with <i>Bradyrhizobium</i>	g. plant ⁻¹					mg/kg. plant ⁻¹			
	Number of nodules	Nodule dry weight	Shoot dry weight	Root dry weight	Root/shoot ratio	N shoot	N root	P shoot	P root
0	10±1.00 ^b	0.01 ±0 ^c	0.84 ±0.05 ^c	0.41±0.03 ^a	0.49 ±0.07 ^a	29.43 ±7.49 ^b	7.34± 0.33 ^a	1.21±0.62 ^a	0.20±0.02 ^a
50 mg KH L ⁻¹	22±1.50 ^a	0.14±0.03 ^{ab}	1.56 ±0.02 ^{ab}	0.32 ±0.01 ^b	0.2± 0.01 ^c	65.32 ± 7.11 ^a	4.76 ± 0.89 ^b	4.06± 0.51 ^a	0.23± 0.04 ^a
100 mg KH L ⁻¹	29±2.08 ^a	0.23±0.04 ^a	1.27± 0.05 ^{bc}	0.44 ±0.02 ^a	0.35±0.01 ^b	43.65±9.69 ^{ab}	6.66±0.28 ^{ab}	2.32 ±1.25 ^a	0.29 ±0.06 ^a
150 mg KH L ⁻¹	27±5.50 ^a	0.17±0.05 ^a	1.83 ±0.06 ^a	0.40±0.01 ^{ab}	0.22 ±0.00 ^c	56.84±15.04 ^{ab}	5.62±0.06 ^{ab}	3.64±1.36 ^a	0.27 ±0.10 ^a
200 mg KH L ⁻¹	27± 2.50 ^a	0.05±0.08 ^{bc}	1.27±0.02 ^{bc}	0.36±0.03 ^{ab}	0.29±0.03 ^{bc}	44.72±11.9 ^{ab}	5.35±0.73 ^{ab}	2.57±0.49 ^a	0.24 ±0.08 ^a
4000 mg KH L ⁻¹	27±1.00 ^a	0.03 ±0.03 ^c	1.22 ±0.30 ^{bc}	0.40±0.07 ^{ab}	0.33±0.06 ^b	38.90±13.47 ^{ab}	6.38±1.69 ^{ab}	3.03 ±1.90 ^a	0.27 ±0.08 ^a

Different letters in rows indicate differences among treatments according to Tukey's test ($p < 0.05$).

KH concentrations of 50 and 150 mg L⁻¹ showed higher shoot weight values ($p < 0.05$) than those of the control (Table 2). On the other hand, the 0 and 100 mg KH L⁻¹ treatments showed higher root weight values ($p < 0.05$) than the 50 mg KH L⁻¹ treatment. The decrease in root weight and the greater increase in shoot weight and nodule weight may indicate greater allocation of resources for these two organs when compared to roots. The root/shoot ratio makes clear the greater investment in shoots than in roots in treatments receiving KH. It is noteworthy that all treatments showed a higher number of nodules ($p < 0.05$) compared to the control, which may indicate greater investment in the production of this new organ at the expense of root increases. There was no significant difference ($p > 0.05$) among phosphorus concentrations in the plants. N accumulation in roots was higher ($p < 0.05$) for treatment control than for 50 mg KH L⁻¹. In relation to N in shoots, the 50 mg KH L⁻¹ treatment was superior to the control (table 2).

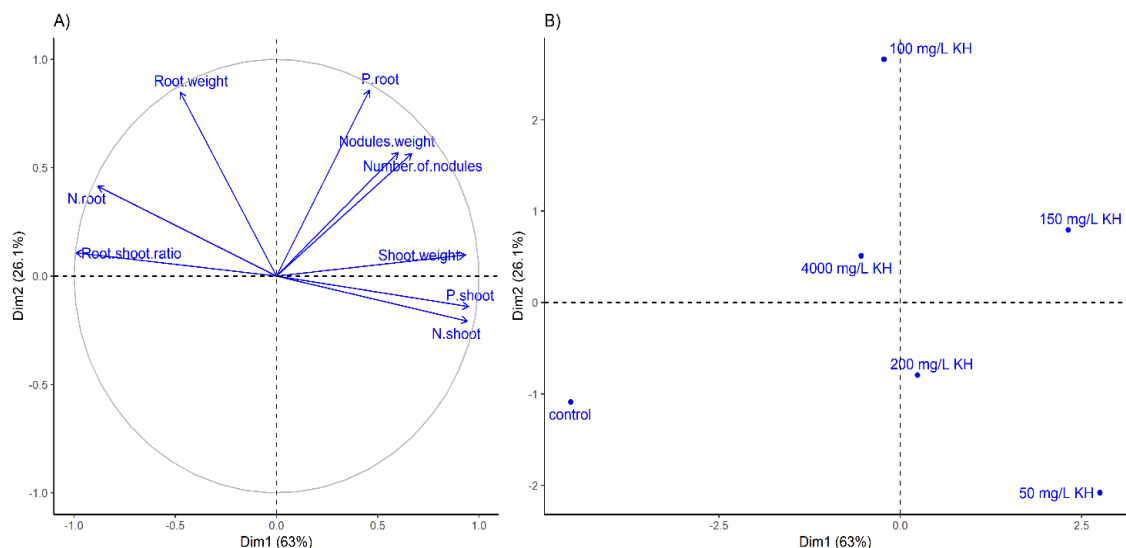


Fig. 4. Biometric and nutritional assessments of soybean inoculated with *Bradyrhizobium* at different K-humate (KH) concentrations. A) PCA for variables and B) for treatments.

The two principal components explained 89.1% of the total variation in the evaluated data (63% for PC1 and 26.1% for PC2). It was observed that variables number of nodules and nodules weight had little influence (Fig. 4A) on the differentiation of treatments. The control (Fig. 4B) was opposed to the 50 mg KH L⁻¹ treatment. The Shoot weight, P from shoot and N from shoot variables were strongly

associated to the 150 mg KH L⁻¹ treatment, while the root/shoot ratio and N from root variables showed lower values for this treatment.

Discussion

The presence of KH increased the survival of *Bradyrhizobium* on soybean seeds (Fig. 1), and this effect may be related to the physical protection of bacteria by this compound. That desiccation is the main cause of low survival of rhizobial strains on seeds. The positive effect of KH on inoculum viability can be attributed to the configuration of these substances, which have hydrolytic properties and the ability to increase water retention (Piccolo et al., 1996, 1997), thus minimizing the impact of desiccation. The benefits of peat inoculants over the greater stability of strains may be related to this characteristic, since peat has high HS levels (Rashid, 1974; Temprano et al., 2002; Hungria et al., 2005). The effective inoculum potential is characterized by the population of bacteria surviving on seeds and in the soil before germination, since it is these viable cells of the inoculant that compete with dominant microorganisms for the colonization of the rhizospheres and plant roots (Deaker et al., 2004).

The high survival of *Bradyrhizobium* in the presence of KH may indicate that this compound increases the viability of strains in commercial liquid inoculant, increasing the bacterial stability on seeds, and this effect may represent gains in the effective inoculum potential. The application of an adequate KH concentration appears to be a possible tool with which to increase the survival of strains on seeds and to increase BNF gains (Fig. 1; Table 2).

Additional effects of KH on the hypocotyl, cotyledons and root dry weight were not observed when compared to plants that did not receive this compound (Table 1). However, the 50 mg KH L⁻¹ concentration was able to induce greater primary root growth compared to the control, and this increase in root growth may have occurred at the expense of the hypocotyl weight. Stimulating root morphology and architecture is one of the hallmarks of the plant response to the presence of HS (Canellas and Olivares, 2014). It is interesting to point out that different modes of HS application, such as direct application to roots (Tavares et al., 2020) and to seeds, such as in our

study, lead to an increase in the root system. Tavares et al. (2017) performed an experiment with calcium sulfate solution (without other nutrients) in the presence of HA and evaluated rice root stimuli, and they demonstrated that plants responded only to reserves present in seeds and showed more efficient use of these resources for the production of larger and more robust root systems. In our work, KH application to soybean seeds induced changes in the root morphology in seedlings, and this effect on the roots may indicate the investment of seed resources for the projection of a more developed root system, which is similar to the results obtained by Tavares et al. (2017).

An increase in primary roots was also observed in plants of different species receiving the application of sodium humate (Van de Venter et al., 1991). The increases in the length, surface area and root volume are closely correlated with the absorption efficiency and the accumulation of nutrients in soybeans (Ao et al., 2010). An increase in the root system due to KH in the presence of *Bradyrhizobium* can provide more robust seedlings (Fig. 2), and this effect can assist plants in improving nutrient acquisition and responses to adverse environmental conditions. Furthermore, Barbosa et al. (2021) observed that the positive effects on grain yield and N concentration in the shoots and grains are probably a result of the well-developed root system.

In relation to the soil experiment, plants receiving only the inoculant (-KH) showed higher root/shoot ratio values than those of all treatments receiving KH, and this ratio may reflect the functional balance between the activities of tissues of the roots and shoots in the environment in which plants are present (Brouwer, 1962a, 1962b, 1962b). Low N levels lead to greater root growth in relation to area, thus causing an increase in this ratio, whereas greater availability of N leads to a greater increase in the shoots in relation to the roots, thus causing a decrease in this ratio (Ryle, 1970; Clement et al., 1978). The plants receiving a KH concentration of 50 mg L⁻¹ presented a greater weight and number of nodules in relation to the control as well as greater biomass accumulation and N in the shoots (Table 2). Plants receiving only the inoculant showed higher root weight values than those receiving 50 mg kH L⁻¹; consequently, higher N values were observed in the roots treated with just the

inoculant than with the 50 mg kH L⁻¹ treatment. It is possible that plants treated with 50 mg kH L⁻¹ have primarily invested in the distribution of C to the shoots and nodules, which would result in smaller increases in root weight.

Interestingly, all treatments receiving KH showed higher amounts of nodules compared to the control, including the KH concentration of 4000 mg L⁻¹, which behaved similarly to the control in relation to several parameters evaluated in Table 2 and Fig. 2.

In legumes, nodules are formed from root hairs; therefore, greater root hair induction can lead to increased nodulation (Badenoch-Jones et al., 1985). HS has recognized roles in the root structure, including greater induction of root hairs in different cultures (Canellas and Olivares, 2014; Garcia et al., 2016; Tavares et al., 2020). Some authors relate this effect to the auxin-like role of HS. In addition, the presence of this hormone in the supramolecular arrangement of HS has previously been reported (Canellas et al., 2002; Nardi et al., 2002; Trevisan et al., 2010). It is tempting to suggest that the pronounced effect on the amounts of nodules in the treatments receiving KH is related to root hair production; however, the 4000 mg kH L⁻¹ treatment, which was approximately 80 times greater than the 50 mg kH L⁻¹ treatment, had the same promoting effect on nodulation. It is thought that if KH plays a hormonal role, very high doses would be inhibitory (Pilet et al., 1979).

Another hypothesis involves the role of KH in mimicking or carrying flavonoid-like compounds in its structures, which could induce the expression of nodulation factors in bacteria while they are still free-living. The application of water-soluble humic material from lignite fermentation in *Bradyrhizobium* increased the expression of *nod* and *nif* genes and the formation of the nitrogenase complex, and these findings were consistent with greenhouse experiments, where an increase in the number and weight of nodules and increased activity of nitrogenase were observed (Gao et al., 2015). This work was carried out under controlled conditions without soil, and the dose of humic compound was higher (5 mL with 300 and 500 mg WSHM L⁻¹) than that used in our study (Gao et al., 2015). In addition, humic material was not applied to seeds along with the inoculant. The origin and mode of HS application may be relevant factors for greater activation of the interaction between the plant and bacterium since minimum concentrations, such as those observed here, produced

similar increases in nodule weight to those found by Gao et al. (2015). However, in this study, all KH doses increased the number of nodules compared to control. It is worth highlighting the importance of soil evaluations since the matrix of this resource can make molecules physically and/or chemically undetectable to microorganisms [for example, by sorption or chemical reactions] (Del Valle et al., 2020). The mobility of these signalling molecules in soil may be affected due to their positive charges (Phillips et al., 1992). A recent study reported that higher organic carbon levels in soils suppress flavonoid signals by up to 70%, resulting in a reduction in nodules in legumes. The repression magnitude was dependent on the chemical structure of the signalling molecule, the availability of metal ions and the source of C (Del Valle et al., 2020). This work highlighted the importance of considering biotic and abiotic soil properties because of the communication between microorganisms and plant roots.

Trends similar to those observed here can be expected for legumes inoculated in the presence of KH, which has the additional benefit of greater nodulation and N accumulation in the shoots, as obtained at a KH concentration of 50 mg L⁻¹. The results of this work suggest that *Bradyrhizobium* and KH inoculation can increase nodulation, N weight and content in the shoots of soybean grown in soil, and the effect is highly dependent on the KH dose.

Conclusions

The positive results of K-humate in association with *Bradyrhizobium* show the potential of these compounds for the development of a new biotechnological product. The results demonstrated herein were obtained under controlled conditions and indicate the possibility of promoting soybean yield when humic compounds are applied along with an inoculant. However, similar field experiments must be developed with different cultivars and edaphoclimatic conditions to confirm the real viability of this compound for use in agriculture.

Further studies on this topic are required because this compound in adequate doses improved the survival of bacteria on soybean seeds and improved nodulation and N accumulation, which represent two major challenges in the management of soybeans by farmers.

When applied to seeds with *Bradyrhizobium* at adequate concentrations, KH promoted changes in most successive stages of plants, affected the morphology of the root system and increased the weight and N content. It was also observed that all KH concentrations promoted greater induction of shoots in relation to roots (root/shoot ratio) and increased the number of nodules.

Author statement

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Veronica Massena, Mr. Wilson Cabral and Mr. Lúcio for their availability and assistance in using WinRHIZO software. They also thank Matheus da Silva Afonso for his assistance with the images in this article. This study was financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Finance Code 001.

References

Ames, B.N., 1966. [10] Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases, in: *Methods in Enzymology, Complex Carbohydrates*. Academic Press, pp. 115–118. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(66\)08014-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(66)08014-5)

Ao, J., Fu, J., Tian, J., Yan, X., Liao, H., 2010. Genetic variability for root morph-architecture traits and root growth dynamics as related to phosphorus efficiency in soybean. *Funct. Plant Biol.* 37, 304–312. <https://doi.org/10.1071/FP09215>

Badenoch-Jones, J., Flanders, D.J., Rolfe, B.G., 1985. Association of Rhizobium Strains with Roots of *Trifolium repens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1511–1520.

Bitton, G., Henis, Y., Lahav, N., 1972. Effect of Several Clay Minerals and AHOon the Survival of *Klebsiella aerogenes* Exposed to Ultraviolet Irradiation¹. *Appl. Microbiol.* 23, 870–874. <https://doi.org/10.1128/AEM.23.5.870-874.1972>

Brouwer, R., 1962a. Distribution of dry matter in the plant. *Neth. J. Agric. Sci.* 10, 361–376. <https://doi.org/10.18174/njas.v10i5.17578>

Brouwer, R., 1962b. Nutritive influences on the distribution of dry matter in the plant. *Neth. J. Agric. Sci.* 10, 399–408. <https://doi.org/10.18174/njas.v10i5.17581>

Canellas, L.P., Olivares, F.L., 2014. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 1, 3. <https://doi.org/10.1186/2196-5641-1-3>

Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha, A.R., 2002. Humic Acids Isolated from Earthworm Compost Enhance Root Elongation, Lateral Root Emergence, and Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity in Maize Roots. *Plant Physiol.* 130, 1951–1957. <https://doi.org/10.1104/pp.007088>

Chibeba, A.M., Guimarães, M. de F., Brito, O.R., Nogueira, M.A., Araujo, R.S., Hungria, M., 2015. Co-Inoculation of Soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum*

Promotes Early Nodulation. *Am. J. Plant Sci.* 6, 1641–1649. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.610164>

Clement, C.R., Hopper, M.J., Jones, L.H.P., 1978. The Uptake of Nitrate by *Lolium perenne* from Flowing Nutrient SolutionI. Effect of NO₃⁻ concentration. *J. Exp. Bot.* 29, 453–464. <https://doi.org/10.1093/jxb/29.2.453>

Conselvan, G.B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Di Foggia, M., Nardi, S., Carletti, P., 2017. Biostimulant activity of humic substances extracted from leonardites. *Plant Soil* 420, 119–134. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3373-z>

Carvalho, R.H., da Conceição Jesus, E., Favero, V.O., Stralio, R., Araújo, A.P., 2020. The Co-inoculation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Increases the Early Nodulation and Development of Common Beans. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 20, 860–864. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00171-8>

Deaker, R., Roughley, R.J., Kennedy, I.R., 2004. Legume seed inoculation technology—a review. *Soil Biol. Biochem.*, Nitrogen Fixation in Australian Agricultural Systems: 13th Australian Nitrogen Fixation Conference 36, 1275–1288. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.04.009>

Del Valle, I., Webster, T.M., Cheng, H.-Y., Thies, J.E., Kessler, A., Miller, M.K., Ball, Z.T., MacKenzie, K.R., Masiello, C.A., Silberg, J.J., Lehmann, J., 2020. Soil organic matter attenuates the efficacy of flavonoid-based plant-microbe communication. *Sci. Adv.* 6, eaax8254. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax8254>

Dewar, R.C., 1993. A root-shoot partitioning model based on carbon-nitrogen-water interactions and munch phloem flow. *Funct. Ecol.* 7, 356–368. <https://doi.org/10.2307/2390216>

García, A.C., Olaetxea, M., Santos, L.A., Mora, V., Baigorri, R., Fuentes, M., Zamarreño, A.M., Berbara, R.L.L., Garcia-Mina, J.M., 2016. Involvement of hormone- and ROS-signaling pathways in the beneficial action of humic substances on plants growing under normal and stressing conditions. *BioMed Res. Int.* 2016, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/3747501>

Gautam, R.K., Panigrahi, S., 2007. Leaf nitrogen determination of corn plant using aerial images and artificial neural networks. *Can. Biosyst. Eng.* 49, 9.

Gao, T.G., Yuan X. Y., Jiang, F., Zhen, L. B., Shui, Y. J., Tao, W. E., Li, Y.H., 2015. Nodulation characterization and proteomic profiling of bradyrhizobium liaoningense ccbau05525 in response to water-soluble humic materials. *Sci. Rep.* 5, 10836. <https://doi.org/10.1038/srep10836>

Hungria, M., Franchini, J.C., Campo, R.J., Crispino, C.C., Moraes, J.Z., Sibaldelli, R.N.R., Mendes, I.C., Arihara, J., 2006. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: Contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield. *Can. J. Plant Sci.* 86, 927–939. <https://doi.org/10.4141/P05-098>

Hungria, M., Loureiro, M.F., Mendes, I.C., Campo, R.J., Graham, P.H., 2005. Inoculant Preparation, Production and Application, in: Werner, D., Newton, W.E. (Eds.), *Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment, nitrogen fixation: origins, applications, and research progress*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 223–253. https://doi.org/10.1007/1-4020-3544-6_11

Hungria, M., Mendes, I.C., 2015. Nitrogen fixation with Soybean: The perfect symbiosis?, in: de Bruijn, F.J. (Ed.), *Biological nitrogen fixation*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, pp. 1009–1024. <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch99>

Hungria, M., Nogueira, M.A., Araujo, R.S., 2015. Soybean seed co-Inoculation with Bradyrhizobium spp. and Azospirillum brasilense: A new biotechnological tool to improve yield and sustainability. *Am. J. Plant Sci.* 6, 811–817. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.66087>

Hungria, M., Nogueira, M.A., Araujo, R.S., 2013. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Biol. Fertil. Soils* 49, 791–801. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0771-5>

Imbufe, A.U., Patti, A.F., Burrow, D., Surapaneni, A., Jackson, W.R., Milner, A.D., 2005. Effects of potassium humate on aggregate stability of two soils from Victoria, Australia. *Geoderma* 125, 321–330. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.09.006>

Jannin, L., Arkoun, M., Ourry, A., Laîné, P., Goux, D., Garnica, M., Fuentes, M., Francisco, S.S., Baigorri, R., Cruz, F., Houdusse, F., Garcia-Mina, J.-M., Yvin, J.-C., Etienne, P., 2012. Microarray analysis of AHeffects on *Brassica napus* growth: Involvement of N, C and S metabolisms. *Plant Soil* 359, 297–319. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1191-x>

Loffredo, E., Senesi, N., 2009. In vitro and in vivo assessment of the potential of compost and its AHfraction to protect ornamental plants from soil-borne pathogenic fungi. *Sci. Hortic.* 122, 432–439. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.05.030>

Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento MAPA 2011. Instrução Normativa N° 13, de 24 de março de 2011. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf/view> (Accessed 15 Oct 2020).

Nardi, S., Concheri, G., Dell’Agnola, G., 1996. Chapter 9 - Biological Activity of Humus, in: Piccolo, A. (Ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 361–406. <https://doi.org/10.1016/B978-044481516-3/50010-4>

Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A., 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biol. Biochem.* 34, 1527–1536. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00174-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00174-8)

Olivares, F.L., Busato, J.G., de Paula, A.M., da Silva Lima, L., Aguiar, N.O., Canellas, L.P., 2017. Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 4, 30. <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0112-x>

Phillips, D.A., Joseph, C.M., Maxwell, C.A., 1992. Trigonelline and Stachydrine Released from Alfalfa Seeds Activate NodD2 Protein in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 99, 1526–1531. <https://doi.org/10.1104/pp.99.4.1526>

Piccolo, A., Celano, G., Pietramellara, G., 1993. Effects of fractions of coal-derived humic substances on seed germination and growth of seedlings (*Lactuca sativa* and *Lycopersicum esculentum*). *Biol. Fertil. Soils* 16, 11–15. <https://doi.org/10.1007/BF00336508>

Piccolo, A., Pietramellara, G., Mbagwu, J.S.C., 1997. Use of humic substances as soil conditioners to increase aggregate stability. *Geoderma* 75, 267–277. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(96\)00092-4](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(96)00092-4)

Piccolo, A., Pietramellara, G., Mbagwu, J.S.C., 1996. Effects of coal derived humic substances on water retention and structural stability of Mediterranean soils. *Soil Use Manag.* 12, 209–213. <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.1996.tb00545.x>

Pilet, P.E., Elliott, M.C., Moloney, M.M., 1979. Endogenous and exogenous auxin in the control of root growth. *Planta* 146, 405–408. <https://doi.org/10.1007/BF00380852>

Pinos, N.Q., Berbara, R.L.L., Tavares, O.C.H., García, A.C., 2019. Different structures in humic substances lead to impaired germination but increased protection against saline stress in corn. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 50, 2209–2225. <https://doi.org/10.1080/00103624.2019.1659294>

Rashid, M.A., 1974. Absorption of metals on sedimentary and peat humic acids. *Chem. Geol.* 13, 115–123. [https://doi.org/10.1016/0009-2541\(74\)90003-5](https://doi.org/10.1016/0009-2541(74)90003-5)

R Core Team., 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

Rogers, A., Gibon, Y., Stitt, M., Morgan, P.B., Bernacchi, C.J., Ort, D.R., Long, S.P., 2006. Increased C availability at elevated carbon dioxide concentration improves N assimilation in a legume. *Plant Cell Environ.* 29, 1651–1658. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01549.x>

Ryle, G.J.A., 1970. Effects of two levels of applied nitrogen on the growth of S37 cocksfoot in small simulated swards in a controlled environment. *Grass Forage Sci.* 25, 20–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1970.tb00601.x>

Sá, J.C. de M., Lal, R., Cerri, C.C., Lorenz, K., Hungria, M., de Faccio Carvalho, P.C., 2017. Low-carbon agriculture in South America to mitigate global climate change and advance food security. *Environ. Int.* 98, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.10.020>

Schnitzer, M., 1978. Chapter 1 Humic Substances: Chemistry and Reactions, in: Schnitzer, M., Khan, S.U. (Eds.), *Developments in soil science, soil organic matter*. Elsevier, pp. 1–64. [https://doi.org/10.1016/S0166-2481\(08\)70016-3](https://doi.org/10.1016/S0166-2481(08)70016-3)

Siczek, A., Frąc, M., Nawrocka, A., Wielbo, J., Kidaj, D., 2015. The response of rhizosphere microbial properties to flavonoids and Nod factors. *Acta Agric. Scand. Sect. B — Soil Plant Sci.* 65, 125–131. <https://doi.org/10.1080/09064710.2014.975835>

Siczek, A., Lipiec, J., Wielbo, J., Kidaj, D., Szarlip, P., 2014. Symbiotic Activity of Pea (*Pisum sativum*) after Application of Nod Factors under Field Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 7344–7351. <https://doi.org/10.3390/ijms15057344>

Souza, J.E.B., Ferreira, E.P. de B., 2017. Improving sustainability of common bean production systems by co-inoculating rhizobia and azospirilla. *Agric. Ecosyst. Environ.* 237, 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.12.040>

Suliman, S., Tran, L.-S.P., 2015. Phosphorus homeostasis in legume nodules as an adaptive strategy to phosphorus deficiency. *Plant Sci.* 239, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.06.018>

Tan, K.H., Tantiwiranond, D., 1983. Effect of humic acids on nodulation and dry matter production of Soybean, Peanut, and Clover1. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47, 1121. <https://doi.org/10.2136/sssaj1983.03615995004700060012x>

EMBRAPA. Brazil to profit more from soybeans by prioritizing grain quality. 2019. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/42730069/brasil-pode-ganhar-mais-com-a-soja-se-priorizar-a-qualidade-do-grao>>. Acesso em: 12 mar. 2022.

EMBRAPA. Dados econômicos - Portal Embrapa. 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 12 mar. 2022.

VANDENKOORNHUYSE, P.; QUAISER, A.; DUHAMEL, M.; LE VAN, A.; DUFRESNE, A. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *The New Phytologist*, [s. l.], v. 206, n. 4, p. 1196–1206, 2015.

Trevisan, S., Pizzeghello, D., Ruperti, B., Francioso, O., Sassi, A., Palme, K., Quaggiotti, S., Nardi, S., 2009. Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in *Arabidopsis*. *Plant Biol.* <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00248.x>

USDA, United States Department of Agriculture USDA, 2020. World Agricultural Production(Circular Series WAP 3-20 March 2020). <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf> (Accessed 23 September 2020).

Van de Venter, H.A., Furter, M., Dekker, J., Cronje, I.J., 1991. Stimulation of seedling root growth by coal-derived sodium humate. *Plant Soil* 138, 17–21. <https://doi.org/10.1007/BF00011803>

Vaughan, D., Malcolm, R.E., 1985. Influence of humic substances on growth and physiological processes. *Soil Org. Matter Biol. Act.* 37–75. https://doi.org/10.1007/978-94-009-5105-1_2

Vincent, J.M., Thompson, J.A., Donovan, K.O., 1962. Death of root-nodule bacteria on drying. *Aust. J. Agric. Res.* 13, 258–270. <https://doi.org/10.1071/ar9620258>

Young, C.-C., Rekha, P.D., Lai, W.-A., Arun, A.B., 2006. Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. *Biotechnol. Bioeng.* 95, 76–83 <https://doi.org/10.1002/bit.20957>

CAPÍTULO 3 – Efeito da aplicação de ácidos húmicos de vermicomposto e gongocomposto sobre o microbioma da soja em condições de restrição hídrica

RESUMO- O mercado global de ácidos húmicos (AH) vem aumentando constantemente com base na percepção de suas propriedades multifuncionais, como bioestimulante vegetal, veículo microbiano e como agente que promove a proteção de plantas contra estresse ambiental. Mas apesar disso, ainda há lacunas sobre os mecanismos de AH nas plantas, bem como, seu papel na comunidade endofítica vegetal. Neste sentido, este trabalho teve o objetivo de avaliar respostas de plantas de soja frente a aplicação de AH de diferentes fontes (vermicomposto e gongocomposto) e sob restrição de água. O experimento foi montado em delineamento de blocos ao acaso com seis repetições, no esquema fatorial 3 x 2, tendo como fatores: a aplicação de ácido húmico (sem AH, AH de vermicomposto e AH de gongocomposto) e duas condições hídricas (com e sem restrição hídrica). Os tratamentos foram compostos da seguinte forma: (I) apenas inoculação das sementes de soja com inoculante comercial contendo *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080; (II) inoculação de *B japonicum* SEMIA 5079 e *B diazoefficiens* SEMIA 5080 e aplicação de 100 mgL⁻¹ AH de gongocomposto em sementes de soja e via foliar e (III) inoculação *B japonicum* SEMIA 5079 e *B diazoefficiens* SEMIA 5080 e aplicação de 150 mgL⁻¹ AH de vermicomposto em sementes de soja e via foliar. Após 20 dias, um grupo de plantas foi submetido a restrição hídrica por 5 dias, no outro grupo com os mesmos tratamentos, a irrigação foi mantida. Após este período, ocorreu a coleta das plantas. As avaliações foram: massa seca da parte aérea, da raiz, dos nódulos e número dos nódulos. Também foi avaliado o teor relativo de água nas folhas e os teores de clorofilas e carotenoides. Parte aérea e raízes foram coletadas para extração de DNA. O material vegetal foi processado para a obtenção do fitomicrobioma endofítico. Os marcadores filogenéticos de bactérias (16S rRNA) e fungos (ITS1 e 2) foram amplificados e sequenciados por tecnologia Illumina. Foi observado que em ambas as condições ambientais, os AH proporcionaram maior crescimento vegetal e nodulação de soja, em relação a plantas que não receberam este composto (controle). A aplicação de AH de gongocomposto estimulou o aumento da riqueza de espécies bacterianas em raízes quando comparados aos demais tratamentos, após aplicação de estresse, este efeito desapareceu. A composição bacteriana em folhas se distinguiu com aplicação de AH, dando origem a dois grupos distintos: um formado pelo tratamento controle e outro, pelos tratamentos com os AH. Na presença de estresse, a composição bacteriana se diferiu entre os três tratamentos. Não foi observado diferenças sobre a composição da comunidade fúngica perante a utilização de AH. Táxons microbianos foram diferentemente abundantes (DA) nas plantas. Sendo a fração fúngica, mais afetada por AH em raízes estressadas. As comunidades microbianas estimuladas na presença de AH parecem estar relacionadas com a promoção direta e indireta do crescimento vegetal. AH de vermicomposto parece ter papel mais proeminente na indução de táxons sob estresse.

Palavras-chave: Substâncias húmicas; restrição hídrica; inoculação; bactérias promotoras de crescimento vegetal.

Effect of humic acid application of vermicompost and gong-compost on the soybean microbiome under water restriction conditions

ABSTRACT- The global market for humic acids (HA) is constantly increasing based on the perception of its multifunctional properties, as a plant biostimulant, microbial vehicle and as an agent that promotes the protection of plants against environmental stress. But despite this, there are still gaps about the mechanisms of HA in plants, as well as its role in the plant endophytic community. In this sense, this study aimed to evaluate the responses of soybean plants to the application of HA from different sources (vermicompost and millicompost) and under water restriction. The experiment was set up in a randomized block design with six replications, in a 3 x 2 factorial scheme, having as factors: the application of humic acid (without HA, vermicompost HA and gongcompost HA) and two water conditions (with and without water restriction). The treatments were composed as follows: (I) only inoculation of soybean seeds with commercial inoculant containing *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 and *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080; (II) inoculation of *B japonicum* SEMIA 5079 and *B diazoefficiens* SEMIA 5080 and application of 100 mgL⁻¹ HA of gong compound in soybean seeds and foliar route and (III) inoculation of *B japonicum* SEMIA 5079 and *B diazoefficiens* SEMIA 5080 and application of 150 mgL⁻¹ HA of vermicompost in soybean seeds and foliar route. After 20 days, a group of plants was submitted to water restriction for 5 days, in the other group with the same treatments, irrigation was maintained. After this period, the plants were collected. The evaluations were: dry mass of shoot, root, nodules and number of nodules. The relative water content in the leaves and the chlorophyll and carotenoid contents were also evaluated. Shoot and roots were collected for DNA extraction. The plant material was processed to obtain the endophytic phytomicrobiome. Phylogenetic markers of bacteria (16S rRNA) and fungi (ITS1 and 2) were amplified and sequenced by Illumina technology. It was observed that in both environmental conditions, HA provided greater plant growth and soybean nodulation, compared to plants that did not receive this compound (control). The application of millicompost HA stimulated an increase in the richness of bacterial species in roots when compared to the other treatments, after application of stress, this effect disappeared. The bacterial composition in leaves was distinguished with the application of HA, giving rise to two distinct groups: one formed by the control treatment and the other, by the treatments with HA. In the presence of stress, the bacterial composition differed between the three treatments. No differences were observed on the composition of the fungal community when using HA. Microbial taxa were differently abundant (DA) in plants. Being the fungal fraction, most affected by HA in stressed roots. The microbial communities stimulated in the presence of HA seem to be related to the direct and indirect promotion of plant growth. Vermicompost HA appears to play a more prominent role in inducing taxa under stress.

Keywords: Humic substances; water restriction; inoculation; plant growth promoting bacteria.

1. INTRODUÇÃO

Bioestimulantes, aplicados ao solo ou às plantas, são reconhecidos por melhorar a saúde, a qualidade e o rendimento das plantas (Nardi et al., 2018). O húmus de minhoca é reconhecido pela sua utilização na agricultura assim como os ácidos húmicos (AH) extraídos deste composto (García et al., 2018; Lamar et al., 2021). A aplicação de AH em doses baixas é capaz de induzir efeitos benéficos ao vegetal, aperfeiçoando a capacidade das plantas em adquirir nutrientes e auxiliando-as a superar condições de estresse (Canellas et al., 2010; Nardi et al., 2021). O papel de AH no metabolismo vegetal está intimamente relacionado a estrutura destas substâncias, e é esperado que compostos oriundo de diferentes matrizes atuem de forma distintas nas plantas (Nardi et al., 2021). Um outro composto que tem se destacado pelo benefício as plantas é o gongocomposto, que é produzido a partir do processamento de diplópodes. Estes animais são capazes de utilizar restos agrícolas e urbanos, gerando resíduos orgânicos de ótima qualidade para o estabelecimento de plantas. Apesar de estudos incipientes sobre a potencialidade deste composto, alguns trabalhos têm afirmado que o gongocomposto tem proporcionado ganhos superiores a plantas quando comparado ao vermicomposto (Ramanathan e Alagesan, 2012). E até o presente momento não há relatos da extração e caracterização de substâncias húmicas (SH) de gongocomposto.

A aplicação de AH de diferentes fontes foi capaz de aumentar o crescimento de soja (Guo et al., 2015; da Silva et al., 2021a). Essa cultura desempenha um papel fundamental no cenário agrícola e econômico do Brasil, e parte do sucesso do estabelecimento da soja no país é devido aos benefícios da inoculação desta cultura com linhagens elite de *Bradyrhizobium* (Hungria e Mendes, 2015). Esta simbiose fornece todo o N necessário para a soja e reduz a dependência de fertilizantes nitrogenados e conseqüentemente, evita que ocorram perdas de N via lixiviação e pela emissão de gases para a atmosfera (Hungria e Mendes, 2015). No entanto, tensões bióticas e abióticas podem causar declínios na produtividade das culturas - prejudicando inclusive a contribuição de processos biológicos para agricultura - e, portanto, são um risco a segurança alimentar global (Freitas et al., 2022). A aplicação de agroquímicos para o controle de algumas dessas tensões podem ser

ineficazes e neste contexto, a utilização de bioestimulantes tem sido recomendada (Klan et al., 2020). Como AH tem papel relevante na resiliência vegetal em face a estresses abióticos e na proteção de bactérias em condições ambientais desfavoráveis, é plausível que a utilização de AH contribua para manutenção de processos biológicos mesmo em condições adversas (Canellas et al., 2020; da Silva et al., 2021a).

É conhecido que o fitomicrobioma tem a capacidade de atuar como uma extensão do genótipo da planta e que sua composição pode responder a fatores externos, como clima, estresses bióticos, manejo do solo e aplicação de bioestimulantes (de Almeida Lopes et al., 2018; Timm et al., 2018; Carrión et al., 2019; da Silva et al., 2021b). Mudanças no microbioma da planta muitas vezes podem aumentar a tolerância ao estresse vegetal. Por exemplo, Tim et al. (2018) demonstraram que diferentes estresses abióticos têm impacto sobre a comunidade bacteriana, com enriquecimento de grupos microbianos específicos, que podem estar contribuindo para proteção da planta a condições ambientais adversas. Um estudo mostrou que a aplicação de um aminoácido relacionado ao estresse da planta (1-aminociclone-1-carboxilato, ACC), pode remodelar o microbioma do solo e promover a maior tolerância vegetal da planta ao estresse salino (Liu et al., 2020a). A aplicação de AH em raízes de arroz também provocou mudanças na composição de gêneros bacterianos associados ao vegetal e autores sugeriram que os grupos enriquecidos estariam relacionados a proteção da planta, no entanto, experimentações sob estresses não foram realizadas (da Silva et al., 2021b).

Apesar destes conhecimentos, são praticamente inexistentes estudos que abordem os efeitos que AH exerce sobre a comunidade microbiana endofítica de plantas, e como esta relação afeta o crescimento, desenvolvimento e proteção vegetal a estresses bióticos e abióticos. É bem estabelecido na literatura que naturalmente as plantas abrigam uma grande diversidade de microrganismos em seus tecidos e esta microbiota é envolvida em funções que afetam o crescimento e a sobrevivência vegetal (Vandenkoornhuysen et al., 2015). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição da comunidade endofíticas de plantas de soja em face a aplicação de ácidos húmicos de diferentes fontes (vermicomposto e gongocomposto), cultivadas em diferentes condições de disponibilidade hídrica.

Especificamente, testamos as seguintes hipóteses: (i) a aplicação de AH de gongocomposto (AH-G) e vermicomposto (AH-V) em soja apresentam eficiência distinta no crescimento de soja e (ii) selecionam diferentes grupos microbianos na planta, relacionados a promoção de crescimento vegetal na presença de restrição hídrica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extração de ácidos húmicos

Os ácidos húmicos de gongocomposto e vermicomposto foram extraídos com KOH 0,1 mol L⁻¹, na razão de 1:10 (v/v) composto:extrator sob agitação por 4h em temperatura ambiente. Os AH e ácido fúlvico (AF) foram separados das huminas. Foi adicionado ao sobrenadante (AH e AF) HCl 6 mol L⁻¹ até que a solução chegasse a pH 1,5. Pois nesta faixa de pH, AH é insolúvel, o que permite sua decantação. Após isso, o AH decantado foi centrifugado a 2000.g por 10 minutos, para separação do AF. Posteriormente o AH foi congelado, para então, ser seco a vácuo no liofilizador.

2.2 Caracterização dos ácidos húmicos

As amostras dos ácidos húmicos foram trituradas para passar em peneira com abertura de malha de 2 mm. A aquisição dos espectros foi realizada por “Cross polarization-magic angle spinning”, em espectrômetro Bruker BioSpin 400 MHz (Bruker Corporation, Billerica, US), ajustado para análise dos núcleos ¹³C. As amostras foram colocadas em sondas de 4 mm e os parâmetros da aquisição dos espectros foram: temperatura 297K, frequência 100.57 MHz, tempo de aquisição 0,04 s, pulse delay 5 s, pulse length 3,8 s, e um total de 1000 scans.

Os diferentes grupos funcionais de carbono das amostras de AH foram caracterizados utilizando técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) seguindo método descrito por Stevenson (1994). As medidas foram efetuadas utilizando 1 mg de amostra triturada e misturada a 100 mg

de brometo de potássio (KBr). Os espectros foram obtidos em espectrômetro, operando entre os comprimentos de onda de 400 a 4000 cm^{-1} .

2.3 Experimento em solo

O experimento foi montado em delineamento de blocos ao acaso com seis repetições, no esquema fatorial 3 x 2, tendo como fatores: a aplicação de ácido húmico (sem AH, AH-G e AH-V) e duas condições hídricas (com e sem restrição hídrica). O experimento foi conduzido em casa de vegetação utilizando vasos de 5L preenchidos com latossolo vermelho, a adubação foi realizada de acordo com a análise química do solo, a saber: pH, 6,9; C, 10g kg^{-1} ; Al, 0 mmolc kg^{-1} ; Ca, 79 mmolc kg^{-1} ; mg, 13 mmolc kg^{-1} ; P, 14 mmolc kg^{-1} ; K, 0,7 mmolc kg^{-1} , não foi adicionado nenhuma fonte de N. Vasos preenchidos com solo seco, foram pesados e posteriormente, colocados em uma bandeja. Na qual, foi adicionado água até dois terços da altura dos vasos - que ficaram imersos por 24 horas - para obtenção da saturação do solo por capilaridade. Após isso, os vasos foram postos sobre a bancada por 2 horas, para que ocorresse a drenagem da água não retida pelo solo. Ao cessar a drenagem da água, os vasos foram pesados novamente e por diferença entre o peso seco e peso de solo saturado de água, foi obtido a capacidade de campo. Para os cálculos foram utilizadas 6 repetições.

A irrigação ocorreu com o mesmo volume de água para todos os vasos até o momento de restrição hídrica. Os tratamentos foram compostos da seguinte forma: (I) apenas inoculação das sementes de soja com inoculante comercial contendo *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080; (II) inoculação de *B japonicum* SEMIA 5079 e *B diazoefficiens* SEMIA 5080 e aplicação de 100 mgL^{-1} AH de gongocomposto em sementes de soja e via foliar e (III) inoculação *B japonicum* SEMIA 5079 e *B diazoefficiens* SEMIA 5080 e aplicação de 150 mgL^{-1} AH de vermicomposto em sementes de soja e via foliar. O volume de 1mL inoculante foi aplicado por semente de soja da cv. ADV 4317 IPRO, os tratamentos que receberam AH tiveram este composto adicionado ao inoculante no momento do plantio nas concentrações descritas acima. O valor obtido das doses de

AH foi baseado em experimentos anteriores de dose-resposta dos distintos AH em soja. Foram deixadas duas plântulas por vaso, a aplicação foliar dos AH ocorreu após 10 dias da germinação das plantas, com aplicações a cada 3 dias. Tais aplicações foram nas doses de 100mgL^{-1} de AH de gongocomposto e 150mgL^{-1} de vermicomposto, ambas diluídas em água. Já no tratamento sem AH, as aplicações ocorreram apenas com água. Após 20 dias, um grupo de plantas foi submetido a restrição hídrica por 5 dias, no outro grupo com os mesmos tratamentos, a irrigação foi mantida. Após este período, ocorreu a coleta das plantas. As avaliações foram: massa seca da parte aérea, da raiz, dos nódulos e número dos nódulos. Também foi avaliado o teor relativo de água nas folhas e os teores de clorofilas e carotenoides. Parte aérea e raízes foram coletadas para extração de DNA.

2.4 Umidade no solo, teor relativo de água na folha (TRA) e teores de clorofilas e carotenoides

Foram coletadas amostras de solo numa profundidade de 10 cm, três amostras por vaso, para a obtenção da umidade do solo. A massa úmida do solo foi pesada e posteriormente, estas amostras foram levadas a estufa por 24 h a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$, para a obtenção da massa seca. Estas mensurações foram utilizadas para obter a umidade do solo, a partir da equação a seguir: $U\% = [(Massa\ úmida\ do\ solo) - (massa\ seca\ do\ solo)] / (massa\ úmida\ do\ solo) \times 100$

Para avaliar o teor relativo de água na folha, foram coletados 15 discos foliares de uma mesma folha do penúltimo trifólio de cada planta como uma única amostra. E então, o seu peso fresco (PF) foi medido. Posteriormente, o material foi submerso em água destilada por 6 horas. O peso turgido (PT) das folhas foi obtido e depois disso, este material foi colocado em uma estufa a 60°C por 48 h para obtenção de seu peso seco (PS). A seguinte equação foi utilizada para calcular o teor relativo de água nas folhas: $TRA = [(PF-PS) / (PT-PS)] \times 100\%$

Foram retirados 0,025 g de massa fresca de folhas, a partir do penúltimo trifólio, e colocados em tubos acrescidos de acetona a 80%. Os tubos foram envolvidos com papel alumínio e acondicionados no escuro até a total descoloração das folhas à temperatura de $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. O processo de extração foi realizado em triplicatas. Após este período, foram realizadas as leituras nos seguintes

comprimentos de ondas: Clorofila a em 663 nm (A662); Clorofila b em 647 nm (A645) e Carotenoides (caroteno [c]+ xantofilas [x]) em 470 nm (A470). Para o cálculo da concentração de clorofilas (Chl) e carotenoides (Car) foram utilizadas fórmulas descritas por Lichtenthaler (1987): $Chl\ a+b = 7,05\ A661,6 + 18,09\ A644,8$. O conteúdo de clorofilas total (Chl a+b) e carotenoides foram expressos em μg do pigmento por grama de massa fresca ($\mu\text{g/g}$).

2.5 Análise de dados de experimentação em casa de vegetação

Os dados referentes a experimentação tiveram a normalidade e heterocedasticidade avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Posteriormente, foi realizada a análise de variância (ANOVA), e ao ser detectada diferenças, as médias foram comparadas pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey.

2.6 Extração de DNA

Para a obtenção da comunidade endofítica, a parte aérea e raízes das plantas foram esterilizadas. Primeiramente, o material vegetal foi lavado em água corrente, após isto, adicionado em tubos estéreis contendo água sanitária 50% (com 0.01% Tween 20). Agitou-se em vórtex em velocidade máxima por 2 min e então, retirou-se a solução desinfetante e adicionou-se álcool 70%. Posteriormente, ocorreu a agitação em velocidade máxima por 1 min. E então, foi retirada a solução alcoólica e adicionada água destilada (previamente esterilizada). Novamente foi realizada a agitação por 1 min, esta etapa foi realizada mais duas vezes. A água da última lavagem foi inoculada em meio sólido LB e as placas foram incubadas por 3 dias a 28°C, de modo, a inferir a eficiência do processo de esterilização. Parte aérea e raízes esterilizadas foram maceradas em gral e pistilo (previamente esterilizados) na presença de N líquido e 80mg do material foi utilizada para extração de DNA total. Utilizou-se o kit DNeasy® PowerPlant® da Qiagen e a metodologia foi realizada de acordo com a indicação do fabricante. A quantidade e qualidade do DNA total

extraído foi avaliada em NanoDrop® Spectrophotometer ND 1000c. A concentração de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) foi mensurada por absorvância no comprimento de onda de 260 nm e a relação entre os valores de absorvância a 260 e 280 nm (260nm/280nm) foi utilizada como indicador da qualidade do DNA extraído. A integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. O gel foi submetido a 70 V por 90 min e em seguida corado com brometo de etídio e posteriormente visualizado com luz ultravioleta em transiluminador.

2.7 Sequenciamento das amostras

Para a análise de sequenciamento foram utilizadas três repetições de amostras de DNA raízes e de parte aérea de cada tratamento, que foram enviadas para serem sequenciadas na empresa NGS. A região hipervariável do gene 16S rRNA V4 foi amplificada com os iniciadores 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806R (5' - GGACTACHVGGGTWTCTAAT- 3 ' ; Caporaso et al., 2011). Estes foram modificados ao adicionar nucleotídeos degenerados (Ns) na região 5', buscando aumentar a diversidade das sequências alvo (de Souza et al., 2016). Para a fração fúngica, foi selecionado o Espaçador Interno Transcrito (ITS), por meio dos primers ITS1f (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) e ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC; Smith e Peay, 2014). Em ambos os casos, a preparação da biblioteca seguiu protocolos previamente estabelecidos com amplificação em duas etapas (de Souza et al., 2016; Armanhi et al., 2018). Na primeira PCR, a região procariótica V4 (16S rRNA) foi amplificada a partir do DNA total usando os primers citados acima com PNA-clamps (para a redução da amplificação de mitocôndria e cloroplasto; Lundberg et al., 2013). Os produtos dessa amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5%. A purificação desse produto de PCR foi feita com as beads AMPure XP Beads, da Beckman. Após a purificação, foi realizada a ligação dos adaptadores Illumina em uma reação de PCR. Esses produtos da ligação são purificados novamente e depois visualizados em gel de agarose 1,5%. Os produtos da ligação dos adaptadores foram quantificados e normalizados para uma mesma concentração. Após a normalização, é feito um pool equimolar de cada amostra e quantificação por qPCR, para validar e determinar a concentração final do pool em

nM. O kit utilizado foi KAPA Library Quantification kit for Illumina. O equipamento utilizado foi o MiSeq da Illumina, em corridas 2x250 pares de base (pb).

2.8 Processamento dos dados de sequenciamento

O processamento se iniciou pela aferição da qualidade dos dados sequenciados com o programa “FastQC” (v.0.11.9; Andrews, 2010). A seguir, foram estabelecidos os parâmetros de corte das sequências. Para isso, foram utilizadas as funções “-fastx_info”, “-fastq_eestats2” e “-search_oligodb”, do programa “USEARCH” (v.11.0.667; Edgar, 2010) onde obteve-se, respectivamente, os limiares de qualidade média, tamanho e posicionamento dos adaptadores. Os adaptadores foram, então, removidos por meio do programa “atropos” (v.1.1.21; Didion et al., 2017), onde sequências que não os continham (“--discard-untrimmed”), ou fossem menores que 200 pb (“--minimum-length=200”), foram descartadas. As sequências livres de adaptadores passaram por um processo de controle de qualidade com o programa “PRINSEQ-lite” (v.0.20.3; Schmieder e Edwards, 2011), onde fez-se a poda da extremidade final cuja janela de qualidade (“-trim_qual_window=3”) fosse inferior a 20 e 18 para, respectivamente, as sequências “forward” (R1) e “reverse” (R2) de cada biblioteca. Por fim, os pares de bibliotecas foram ordenados (“fastq_pair”; v.1.0; Edwards & Edwards, 2019) e fundidos (“PEAR”; v. 0.9.11; Zhang et al., 2014). As sequências fundidas foram submetidas ao pipeline “DADA2” (v.1.22.0; Callahan et al., 2016), por meio de seu pacote disponibilizado para o programa estatístico R (v. 4.1.2; R Core Team, 2021), para o estabelecimento das sequências variantes de amplicons, ou ASVs (do inglês: “Amplicon Sequence Variants”). O pipeline se inicia com um controle de qualidade (“filterAndTrim”), onde as sequências foram filtradas e truncadas respeitando o tamanho do inserto da região V4 do gene 16S rRNA (“truncLen=250”) – para as sequências de ITS, cujo tamanho apresenta grande variabilidade, esse parâmetro foi suprimido. Em seguida, foram identificados (“learnErrors”) e corrigidos (“dada”) os possíveis erros de sequenciamento, para a obtenção das ASVs exatas para cada amostra. Cada ASV foi classificada taxonomicamente (“assignTaxonomy”), com base nos bancos de referências SILVA (v.138.1; Quast et al., 2012) e UNITE (v.8.2; Abarenkov et al., 2010) para as bibliotecas de 16S rRNA e ITS, respectivamente.

2.9 Análises de diversidade e estatísticas

As contagens de ASVs por amostras, bem como as relativas classificações taxonômicas, foram importadas como um objeto “phyloseq” (pacote R “phyloseq”; v.1.38.0; McMurdie e Holmes, 2013) e transformadas em dados composicionais (função “phyloseq_standardize_otu_abundance” do pacote R “metagMisc”; v.0.0.4; Mikryukov, 2019). Para a alfa diversidade, foram calculadas medidas de riqueza (Chao1) e diversidade (Índices de Shannon e Gini-Simpson), através da função “alpha” do pacote R “microbiome” (v.1.10.0; Lahti et al., 2012). Avaliou-se a existência de diferenças gerais nas médias de alfa diversidade com os testes ANOVA/Kruskal-Wallis (a depender da distribuição dos dados), em caso de significativo (p -valor $< 0,1$) as médias foram comparadas par-a-par, com os testes t de Student/Wilcoxon. Para a beta diversidade, calculou-se as dissimilaridades através do índice de Bray-Curtis (função “distance” do pacote R “phyloseq”), dos quais extraiu-se a clusterização hierárquica das amostras na forma de um dendrograma, bem como uma análise de coordenadas principais (PCoA). A significância estatística da separação das condições avaliadas se deu através de uma análise de PERMANOVA, considerando um p -valor de 0.1. Por fim, foram identificados os microrganismos que possuíram alterações significativas, em suas abundâncias, entre as condições estudadas. Para isso, utilizou-se a abordagem “DESeq2” (Love et al., 2014), a qual implementa o teste Wald para a comparação das médias (p -valor < 0.05). Os perfis taxonômicos e as demais representações gráficas das análises supracitadas foram geradas no R através do pacote “ggplot2” (v.3.3.5; Wickham, 2011).

3. RESULTADOS

3.1 Crescimento vegetal e caracterização de ácidos húmicos

Em relação as variáveis: umidade do solo, TRA e conteúdo de pigmentos, apenas o fator estresse diferiu (p -valor ≤ 0.05). A umidade do solo, TRA nas folhas e conteúdo de pigmentos foram significativamente maiores em plantas irrigadas que em plantas submetidas a restrição hídricas. Em relação a massa seca vegetal, foi

vista diferenças entre os tratamentos com AH em ambas as condições hídricas (tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros vegetais da soja avaliados em distintas condições hídricas.

Parte aérea (g)			
	Sem estresse	Com estresse	
AH			Média Geral
AH-Ver	7,86 Aa	3,37 Aa	5,94 A
AH-Gon	8,01 Aa	3,65 Aa	6,07 A
Controle	4,65 Ba	0,82 Ab	3,18 B
Média Geral	6,40 a	2,40 b	
Massa de raiz (g)			
	Sem estresse	Com estresse	
AH			Média Geral
AH-Ver	1,46 Aa	1,23 Aa	1,36 A
AH-Gon	1,31 Aa	0,88 Aa	1,12 AB
Controle	0,89 Aa	0,39 Aa	0,70 B
Média Geral	1,15 a	0,76 a	
Massa de nódulos (g)			
	Sem estresse	Com estresse	
AH			Média Geral
AH-Ver	0,43 Aa	0,11 Ab	0,29 A
AH-Gon	0,30 Ba	0,15 Ab	0,23 A
Controle	0,07 Ca	0,02 Aa	0,06 B
Média Geral	0,22 a	0,09 b	
Nº de nódulos			
	Sem estresse	Com estresse	
AH			
AH-Ver	127,0 Aa	44,25 Ab	87,85 A
AH-Gon	80,40 Ba	35,65 ABb	64,33 B
Controle	29,37 Ca	6,00 Ab	20,38 C
Média Geral	67,35 a	26,16b	

Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na linha (Com e sem estresse) maiúsculas na coluna (Ácido húmico-AH), diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 10% de significância.

As análises de ressonância magnética nuclear e FTIR revelaram diferenças estruturais entre as amostras de ácidos húmicos testadas (Tabela 2). O AH-G possui menor proporção de C-aquil, que são radicais orgânicos formados por hidrocarbonetos saturados, e são relativamente inertes no solo (ceras, ácidos graxos, parafina etc.).

A maior proporção de C-aquil do AH-V reflete em seu índice de hidrofobicidade (Tabela 2) que torna esse ácido húmico menos solúvel em água. Na região que compreende o comprimento de onda 3300-3500 cm^{-1} , e é atribuída às hidroxilas de radicais fenólicos, carboxílicos e álcoois (Suñer et al., 2018), o AH-G resultou em maior absorbância (Figura1) indicando maior funcionalidade dessa amostra de ácido húmico. Resultado que coincide com aqueles observados na análise de RMN (Tabela 2). A absorbância em outras bandas revela também maior presença de fenóis e anéis aromáticos no AH-V (Stevenson, 1994).

Tabela 2: Distribuição dos diferentes tipos de carbonos, áreas relativas das regiões dos espectros e o grau de aromaticidade no ácido húmico.

	C-aquil 0-45	C-aquil- N/metoxil 45-60	C-aquil- O 60-110	C- aromático 110-160	C-carbonil/ amida 160-220	Índices Hidrofobicidade
AH-G	23,01%	11,39%	22,71%	33,99%	8,91%	1,378
AH-V	30,47%	13,12%	23,14%	28,35%	4,93%	1,738

AH-G- ácidos húmicos de Gongocomposto e AH-V- ácidos húmicos de Vermicomposto.

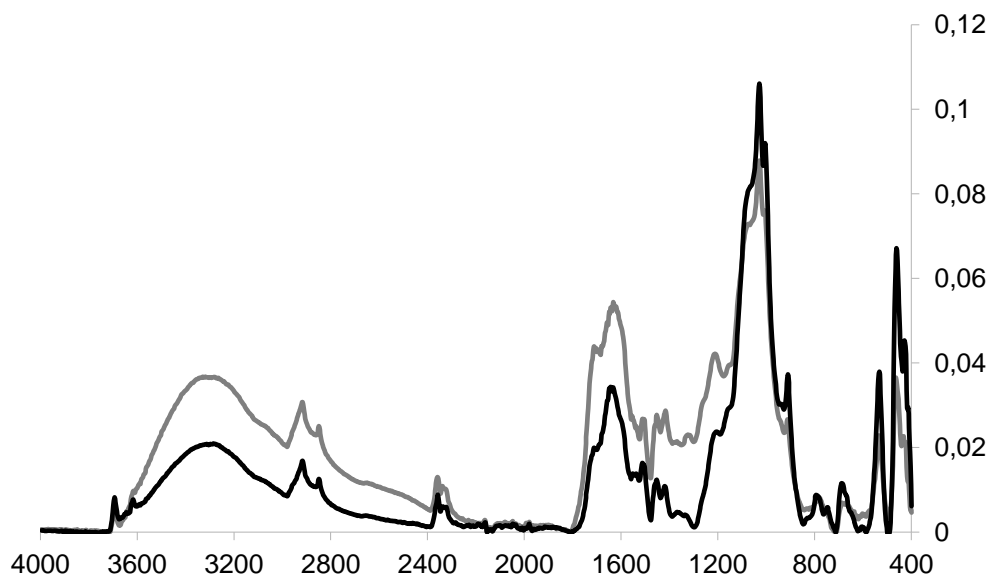


Figura 1. Espectro de absorvância de infravermelho das amostras de ácidos húmicos estudadas. Em cinza o espectro do AH de gongocomposto e em preto o AH do vermicomposto.

3.2 Sequenciamento e processamento de dados

Foram produzidas 71 bibliotecas a partir das amostras, sendo 36 referentes aos amplicons de 16S rRNA e 35 aos de ITS (uma amostra de ITS foi perdida; que corresponde a folha tratamento controle sem estresse). O sequenciamento gerou 3.106.455 reads brutas de 16S rRNA, sendo 885.532 utilizadas para a análise do microbioma. Enquanto para as bibliotecas de ITS, de 2.219.470 reads geradas, 2.010.127 foram utilizadas para as análises subsequentes. Apesar da aplicação de PNA-Clamp, as amostras procarióticas apresentaram contaminação em quantidades elevadas de DNA cloroplastidial e mitocondrial. E devido a isso, o processamento das amostras através do controle de qualidade gerou a redução da quantidade de leituras iniciais dos amplicons procariotos em relação as que foram utilizadas para as análises de microbioma (Tabela 3).

Tabela 3. Contagens das leituras antes (brutas) e após o processamento (usáveis) das sequências.

Amostras	Sem estresse		Com estresse		
	Brutas	Usáveis	Brutas	Usáveis	
Bactérias (16S rRNA)	Folhas (AH-V)	267.204	20.557	267.385	95.609
	Raízes (AH-V)	264.569	65.930	243.535	134.699
	Folhas (AH-G)	281.184	6.128	288.680	18.797
	Raízes (AH-G)	241.509	134.627	249.343	134.240
	Folhas (Controle)	277.144	23.184	226.208	21.716
	Raízes (Controle)	261.774	111.024	237.920	119.021
Fungos (ITS)	Folhas (AH-V)	162.120	145.446	186.807	172.644
	Raízes (AH-V)	191.319	177.186	219.124	206.929
	Folhas (AH-G)	201.449	192.315	204.852	196.030
	Raízes (AH-G)	227.447	165.500	200.815	180.511
	Folhas (Controle)	162.871	154.864	70.597	63.384
	Raízes (Controle)	208.537	182.508	183.532	172.810

AH-V: Amostras tratadas com AH de vermicomposto; AH-G: Amostras tratadas com AH de gongocomposto. Controle se refere a amostras sem adição de AH.

Embora o processamento tenha reduzido consideravelmente a quantidade de sequências, em especial para a fração bacteriana, observa-se que, para a grande maioria das condições, as curvas de rarefação das ASVs (Figura 2) tendenciaram à formação assintota. Dessa forma, indica-se que a amostragem foi capaz de capturar as espécies presente no material vegetal frente as condições empregadas (AH x Estresse). As curvas mais comprometidas foram as das amostras bacterianas em folhas, no entanto, é possível ver que até essas amostras estão próximas a estabilização.

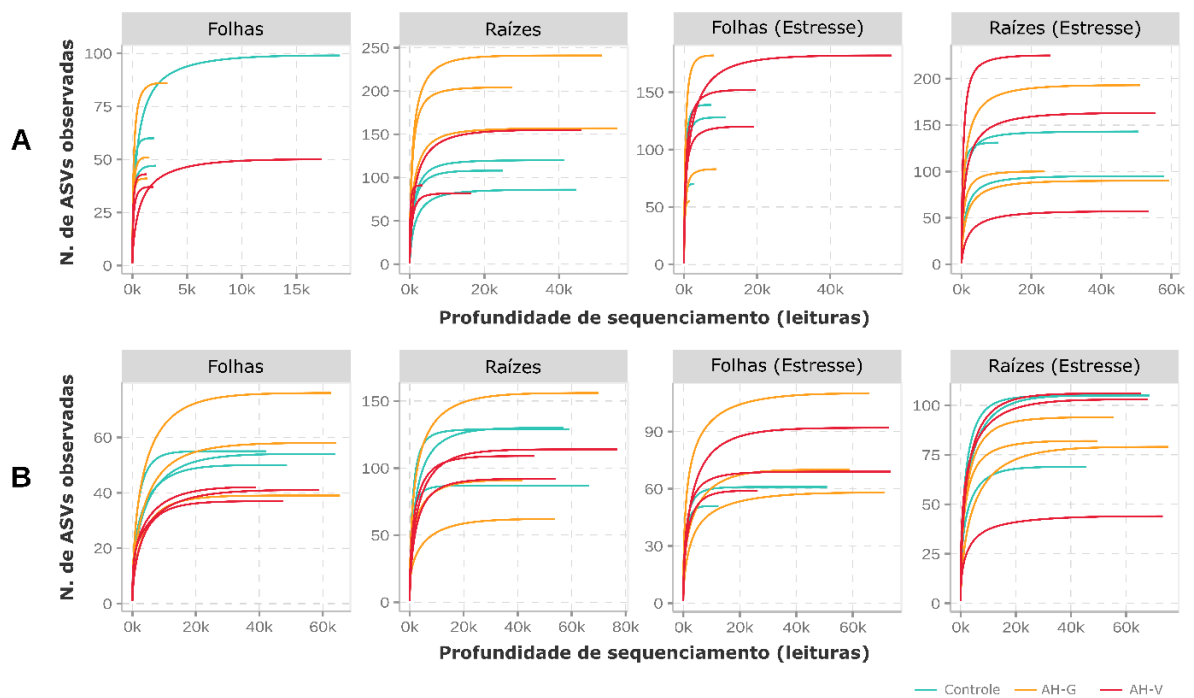


Figura 2. Curva de rarefação de ASVs bacterianas (A) e fúngicas (B) em relação a profundidade do sequenciamento.

3.3 Medidas ecológicas e de composição microbiana

Em relação as amostras bacterianas na ausência de estresse, foi observado maiores valores ($p\text{-valor} \leq 0.1$) nos índices de diversidade Shannon e Gini-Simpson nas folhas do que nas raízes do tratamento controle (Figura 3-A; Apêndice A). Já para o tratamento com AH de vermicomposto e gongocomposto, é observado que raízes apresentaram maior riqueza de espécie que as folhas, no entanto, diferente do observado no tratamento sem AH, a aplicação de AH não afeta os índices de diversidade entre folhas e raízes. A imposição do estresse faz com que essas diferenças se dissipem (Figura 3-A).

Em relação a composição fúngica, no que tange a diferença entre raízes e folhas, nota-se uma maior riqueza de espécies e diversidade em raízes quando comparado a folhas na ausência do estresse (Figura 3-B). Um comportamento similar foi observado em plantas estressadas, mas somente no tratamento controle (Chao1 e Shannon). As diferenças que eram observadas em relação aos diferentes tecidos das plantas não estressadas, parecem ter sido amenizadas ou extinguidas nas plantas estressadas, em especial naquelas cujas aplicações de AH foram

realizadas (Figura 3-B). Na ausência do estresse, aplicação de AH de gongocomposto apresentou em raízes, maiores valores para Chao1 frente os tratamentos com AH de vermicomposto e o controle, e maiores valores dos índices de diversidades avaliados em comparação ao controle (Figura 3-A). A aplicação de AH não altera significativamente as métricas de alfa diversidade (Figura 3-B).

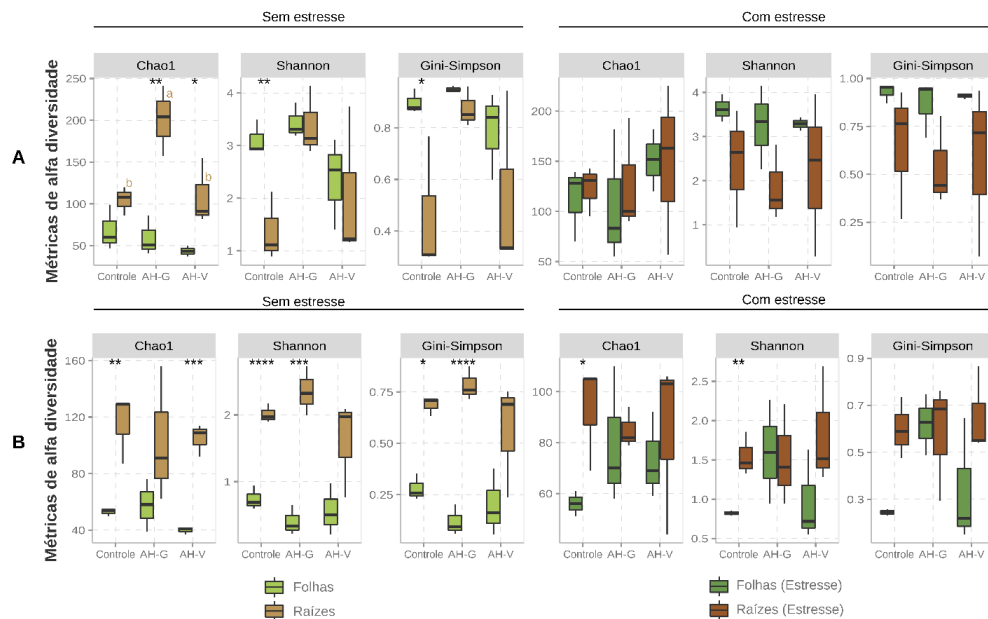


Figura 3. Boxplot das médias das métricas de alfa diversidade das frações bacterianas (A) e fúngicas (B) presentes na parte aérea e raiz de plantas de soja que receberam a aplicação de AH de vermicomposto (AH-V), gongocomposto (AH-G) ou que não receberam aplicação (Controle), na presença e ausência de estresse. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre aplicação de AH dentro de um mesmo material vegetal (teste *post-hoc*). As diferenças significativas entre os diferentes tecidos sob uma mesma condição (aplicação e presença ou ausência de estresse), verificase pela presença dos seguintes símbolos: **** ($p < 0,001$); *** ($p \leq 0,01$); ** ($p \leq 0,05$); * ($p \leq 0,1$). A ausência de letras/símbolos indica que não houve diferenças significativas entre os contrastes.

No tratamento com AH de vermicomposto, na fração bacteriana, as folhas submetidas a estresse apresentaram maior riqueza de espécies que as folhas não estressadas (Figura 4-A). Já na presença de AH de gongocomposto, as raízes estressadas apresentaram menores índices de diversidade (Shannon e Gini-Simpson) que raízes não estressadas (Figura 4-A). Na comunidade fúngica, as raízes das plantas que receberam estresse, apresentaram menores valores de índice Shannon em relação as raízes não estressadas (Figura 4-B). Já as folhas estressadas, apresentaram maiores valores do índice Shannon que folhas não estressadas (Figura 4-B).

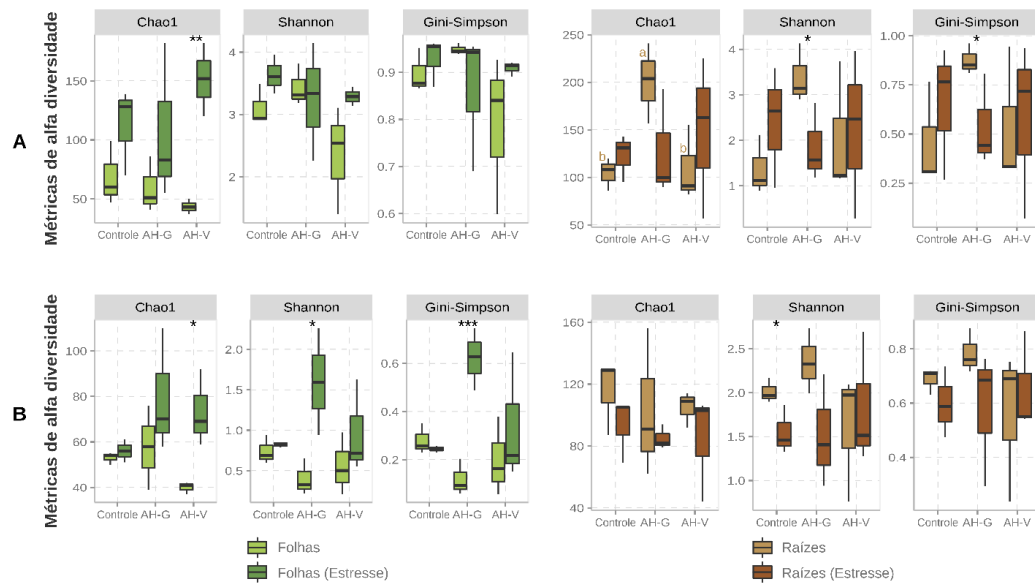


Figura 4. Boxplot das médias das métricas de alfa diversidade das frações bacterianas (A) e fúngicas (B) presentes na parte aérea e raiz de plantas de soja que receberam a aplicação de AH de vermicomposto (AH-V), gongocomposto (AH-G) ou que não receberam aplicação (Controle), na presença e ausência de estresse. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre aplicação de AH dentro de um mesmo material vegetal (teste *post-hoc*). As diferenças significativas entre os tecidos em função do estresse, verifica-se pela presença dos seguintes símbolos: **** ($p < 0,001$); *** ($p \leq 0,01$); ** ($p \leq 0,05$); * ($p \leq 0,1$). A ausência de letras/símbolos indica que não houve diferenças significativas entre os contrastes.

A partir das classificações taxonômicas das ASVs bacterianas, foram identificados um total de 26 filos, 47 classes, 107 ordens, 150 famílias, 250 gêneros e 76 espécies. Considerando-se o nível taxonômico de família, foi observado que a maior abundância dos táxons está dentro do filo *Proteobacteria* e os demais filos, presentes em menor proporção são, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (Figura 5-A). Visualmente, nota-se que há uma maior variedade de grupos bacterianos nas folhas que nas raízes em todas as condições testadas (AH x estresse; Figura 3-A). Em relação as raízes, foi observado que o grupo mais abundante é das *Xanthobactereaceae*, raízes não estressadas que receberam AH de gongocomposto apresentaram maior pluraridade de famílias que as raízes do controle e de AH de vermicomposto, além disso, há maior abundância *Rhizobiaceae*. Esta família compreende os rizóbios, bactérias associadas a FBN em soja (Breedveld e Miller, 1994). Na presença de estresse, em raízes com AH de gongocomposto, há aumento de *Xanthobactereaceae* e com redução relativa da abundância dos demais grupos.

Análise de Coordenadas Principais (PCoA) utilizando as distâncias de Bray-Curtis foi realizada para determinar a dissimilaridade das comunidades bacterianas entre as amostras de parte aérea e raízes nos diferentes tratamentos. Independente da aplicação de AH e da presença de estresse, a composição bacteriana da parte aérea e das raízes são distintas ($p=0.001$; Figura 5-B, C). A significância através da análise da PERMANOVA só foi obtida em amostras de folhas, independentemente do fator “estresse” (Figura 5-B,C). Em consonância ao gráfico de PCoA, o agrupamento hierárquico mostra a separação de dois grupos (Apêndice B). Em condições não estressantes, o resultado da análise PERMANOVA mostra que há diferença significativa ($p=0.02$) frente os tratamentos. Onde é possível observar a separação de dois grupos, no qual, a comunidade do tratamento controle se apresenta mais distantes das comunidades das folhas que receberam AH de vermicomposto e gongocomposto. Já na presença de estresse, há um maior distanciamento das amostras tratadas com diferentes AH ($p=0.009$), formando três grupos distintos, indicando a diferença entre os três tratamentos frente a composição das comunidades bacterianas (Figura 5 C).

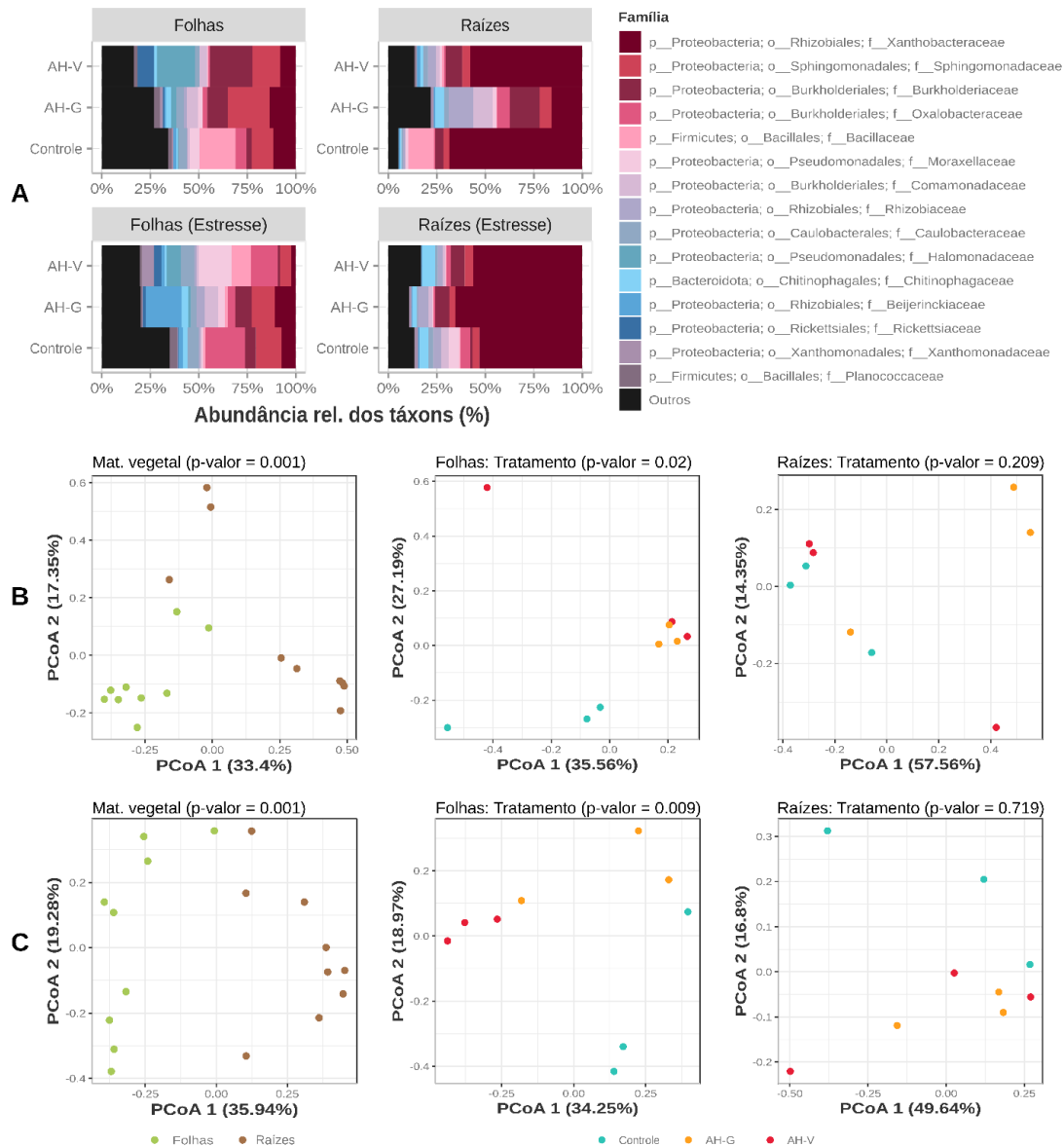


Figura 5. Abundâncias relativas das top 15 ASVs bacterianas, colapsadas ao nível taxonômico de “família” (A). Representação gráfica das Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseadas nas distâncias de Bray-Curtis das amostras, na ausência (B) e presença (C) de estresse. Ao primeiro nível (à esquerda) observa-se os PCoAs de todas as amostras, testadas em função da separação por material vegetal. Em seguida (centro e à direita), observa-se a distribuição das amostras de folhas e raízes, respectivamente, testadas em função dos tratamentos recebidos. Os tratamentos se referem a aplicação de AH de vermicomposto (HA-V), gongocomposto (HA-G) e que não receberam aplicação (controle).

Para as ASVs de fungos, foram obtidos 4 filos, 12 classes, 40 ordens, 106 famílias, 176 gêneros e 205 espécies. Os táxons identificados estão majoritariamente no filo *Ascomycota*, seguido de *Basidiomycota* (Figura 6-A). Vale ressaltar que muitas sequencias dentre as mais abundantes não puderam ser classificadas nem ao nível de filo como pode-se observar na Figura 6. As folhas não

estressadas apresentaram em sua maioria membros relacionados ao filo *Ascomycota*. Em específico, em folhas estressadas que receberam AH de gongocomposto foi observado aumento da família *Erysiphaceae*. Em raízes não estressadas, o controle apresenta o aumento de membros da família *Chaetomiaceae* se comparado aos demais tratamentos. Já o tratamento com AH de gongocomposto apresenta maior abundância de *Nectriaceae* e *Pleosporaceae*. Na presença de estresse, ocorre o aumento de *Chaetomiaceae* em tratamentos com AH e de *Trichosphaeriaceae* no controle. Quanto a distribuição das composições ilustradas no PCoA (Figura 6-B, C) e seus respectivos dendrogramas (Apêndice C), observa-se a separação das amostras de folhas e raízes ($p < 0.05$).

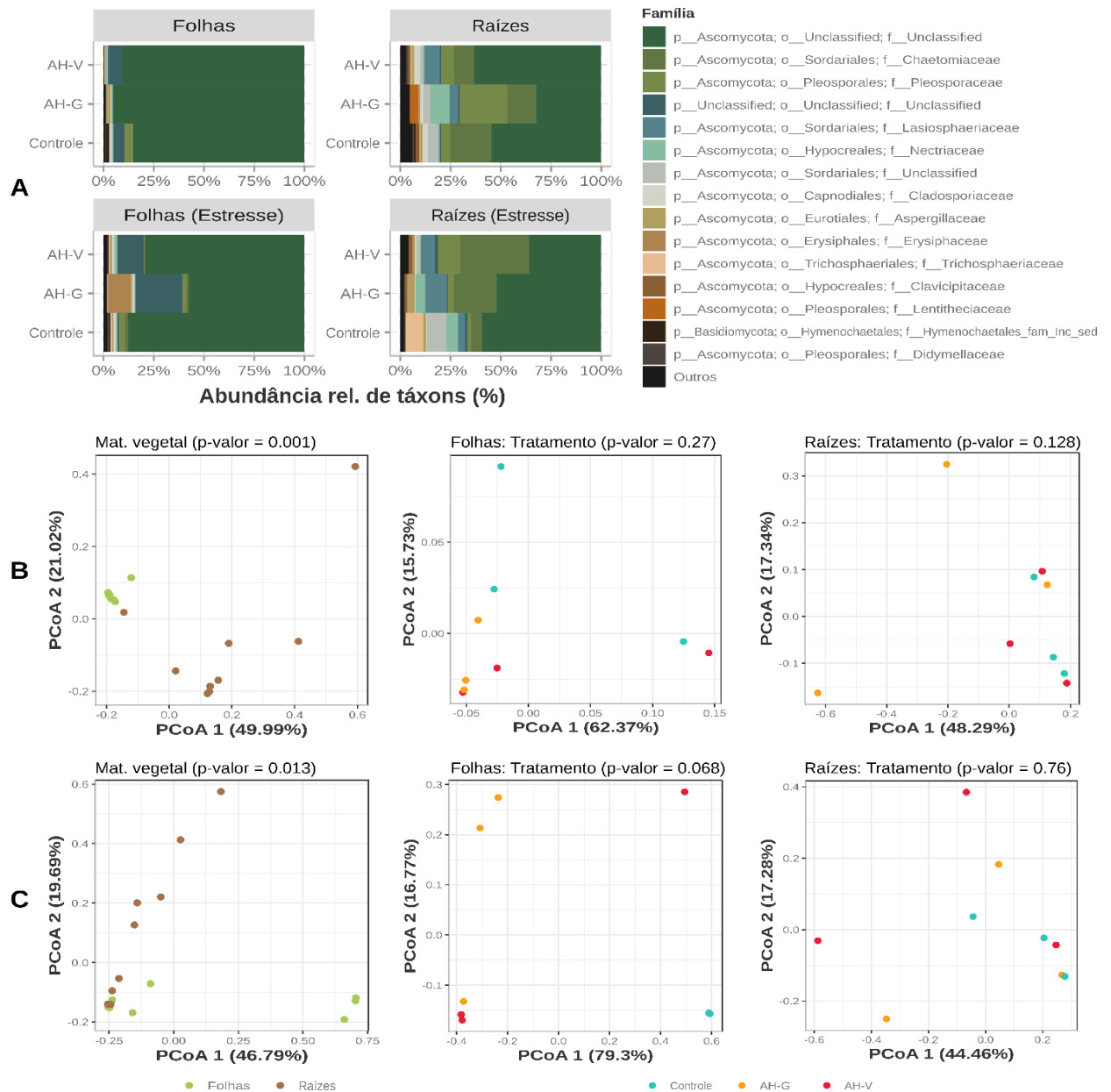


Figura 6. Abundâncias relativas das top 15 ASVs fúngicas, colapsadas ao nível taxonômico de “família” (A). Representação gráfica das Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseadas nas distâncias de Bray-Curtis das amostras, na ausência (B) e presença (C) de estresse. Ao primeiro nível (à esquerda) observa-se os PCoAs de todas as amostras, testadas em função da separação por material vegetal. Em seguida (centro e à direita), observa-se a distribuição das amostras de folhas e raízes, respectivamente, testadas em função dos tratamentos recebidos. Os tratamentos se referem a aplicação de AH de vermicomposto (HA-V), gongocomposto (HA-G) e que não receberam aplicação (controle).

Para avaliar as diferenças composicionais entre as comunidades microbianas presentes nas amostras de folhas e raízes, realizou-se a prospecção de táxons

diferencialmente abundantes (DA) entre as amostras controle e as tratadas com AH, na presença e ausência de estresse. O resumo das contagens de táxons DA encontra-se na Tabela 4. Já a lista dos táxons DA, bem como para qual condição e em qual proporção estes foram identificados é disponibilizado com maiores detalhes nas Tabelas em Apêndice D (Bactérias) e E (Fungos).

A aplicação de AH possuiu grande efeito no contingente bacteriano. Na ausência de estresse, as folhas tratadas tenderam a reduzir consideravelmente a abundância de determinados táxons em comparação ao controle (Tabela 4). Nas demais condições, os tratamentos com AH foram superiores neste quesito, ocasionando o aumento de abundância de táxons específicos (Apêndice D; Figura 7).

Tabela 4. Quantificações dos táxons diferencialmente abundantes (DA) relacionados com cada tratamento nas condições experimentais avaliadas.

	Tratamento	Sem estresse		Com estresse	
		Folhas	Raízes	Folhas	Raízes
Bactérias (16S rRNA)	AH-V	5	15	38	33
	AH-G	2	51	15	22
	Controle	22	4	1	15
Fungos (ITS)	AH-V	3	9	-	27
	AH-G	3	26	-	11
	Controle	2	3	-	9

AH-V: Amostras tratadas com AH de vermicomposto; AH-G.: Amostras tratadas com AH de gongocomposto. Controle se refere a amostras sem adição de AH.

Em folhas não estressadas foi observado que aplicação de AH de vermicomposto promoveu o aumento dos gêneros *Rickettsia*, *Candidatus Hamiltonella*, *Candidatus Portiera* (Figura 7), reconhecidos endossimbiontes da mosca-branca, uma praga que causa danos a soja (Shan et al., 2014; Bello et al., 2021). Apesar da presença destes táxons, não foi observada a prevalência destes grupos em todas as repetições, sendo possivelmente, uma contaminação pontual de uma das réplicas biológicas. Apesar disso, a confirmação destes grupos microbianos mostra que simbioses de inseto podem adentrar em tecidos vegetais.

Os gêneros *Variovorax* e *Kosakonia* foram DA em ambos os tratamentos com AH. No tratamento com AH de gongocomposto, observou-se o aumento de

Cupriavidus pauculus, *Sphingomonas naasensis*, *Actinoplanes luojiashanensis*, *Massilia armeniaca*, *Chitinophaga sedimenti*, *Novosphingobium ginsenosidimutans*. Já em plantas tratadas com AH de vermicomposto houve aumento de *Acinetobacter lwoffii*, *Devosia elaeis*, *Sphingobium yanoikuyae*, *Actinoplanes luojiashanensis*, *Luteibacter jiangsuensis* (Figura 7).



Figura 7: Táxons bacterianos diferencialmente abundantes (DA). Ambos os níveis se apresentam ordenados pela soma das abundâncias relativas. O *heatmap* (esquerda) demonstra a abundância relativa dos táxons em folhas (F), raízes (R), folhas estressadas (FE), raízes estressadas (RE) mediante

a aplicação de ácido húmico de Gongocomposto (AH-G), ácido húmico de vermicomposto (AH-V) e sem aplicação de AH (controle). E o *dot plot* (direita) revela em quais nichos ocorreram diferença de abundâncias entre o material vegetal.

Em relação a porção fúngica, foi observado grupos DA em raízes estressadas, onde os tratamentos com AH foram mais impactantes, em especial o tratamento com AH de vermicomposto. Ao nível de espécie, os tratamentos com AH tiveram a redução de *Nigrospora oryzae*. Em contrapartida, ambos os tratamentos com AH, obtiveram aumento de *Balansia obtecta*, *Cercophora mirabilis*, *Curvularia intermedia*. Além disso, o tratamento com AH de vermicomposto estimulou *Curvularia eragrostidis*, *Curvularia hawaiiensis*, *Erysiphe difusa*, *Periconia epilithographicola* e *Thanatephorus cucumeris* (Figura 8).

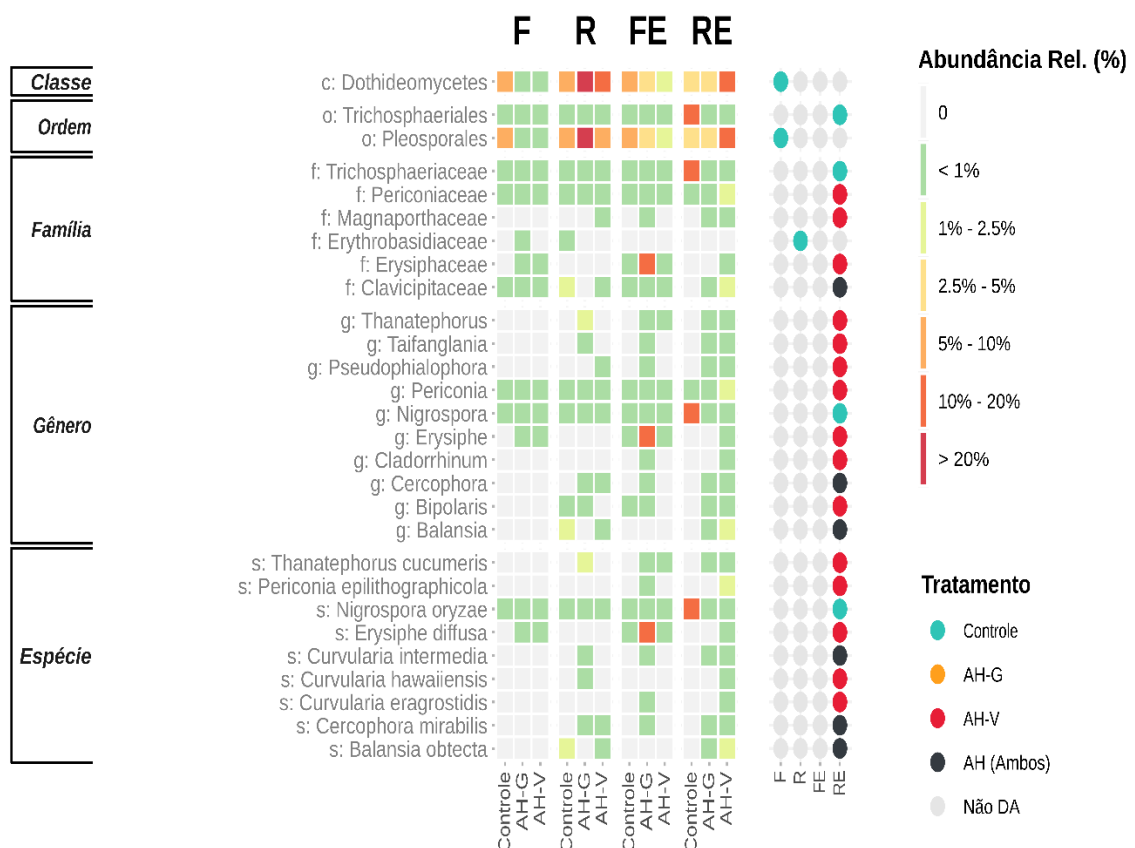


Figura 8: Táxons fúngicos diferencialmente abundantes (DA). Ambos os níveis se apresentam ordenados pela soma das abundâncias relativas. O *heatmap* (esquerda) demonstra a abundância relativa dos táxons em folhas (F), raízes (R), folhas estressadas (FE), raízes estressadas (RE) mediante a aplicação de ácido húmico de Gongocomposto (AH-G), ácido húmico de vermicomposto (AH-V) e sem aplicação de AH (controle). E o *dot plot* (direita) revela em quais nichos ocorreram diferença de abundâncias entre o material vegetal.

4. DISCUSSÃO

Ainda não é totalmente conhecida a relação entre a estrutura química de substâncias húmicas (SH), como por exemplo AH, e a sua função no metabolismo vegetal. Mesmo com inúmeros trabalhos de caracterização destes compostos e avaliação de sua bioatividade em plantas (Nardi et al., 2021). No entanto, sua classificação como promotores de crescimento vegetal é inequívoca.

O efeito de AH no crescimento da planta depende fortemente de fatores como, fonte destas substâncias, concentração, modo de aplicação e propriedades estruturais de suas moléculas. Ao passo que a fonte é importante para a organização dos grupos funcionais e propriedades estruturais, a concentração das moléculas bioativas, é particularmente crítica para potencializar o crescimento da planta (Nardi et al., 2000, 2021; Scaglia et al., 2016).

Aqui, trabalhamos com AH oriundos de gongocomposto e de vermicomposto e até o presente momento, não temos relatos de investigações que tenham extraído e caracterizado AH de gongocomposto, bem como, avaliado seu efeito em plantas e em sua microbiota.

O efeito de AH de gongocomposto e vermicomposto na maioria dos parâmetros de crescimento de soja, foi superior ao controle (tratamento que não recebeu AH), tanto em condições ambientais favoráveis como sob déficit hídrico (Tabela 1). Tais resultados são congruentes com os dados encontrados no trabalho de da Silva et al. (2021a), onde aplicação de K- humato – composto com elevadas concentrações de AH- induziu o aumento sobre a nodulação, crescimento de parte aérea e aumento no teor de N nas folhas de soja.

A concentração utilizada de AH de gongocomposto (100mgL^{-1}) foi menor que de AH de vermicomposto (150mgL^{-1}), proporcionando resultados similares sobre a planta. Estes resultados podem indicar que AH de gongocomposto é mais bioativo na planta que AH de vermicomposto. E este efeito, possivelmente está atrelado a composição química dessas substâncias como observado na Tabela 2. Essas diferenças resultam dos processos biológicos e bioquímicos da compostagem, os quais o material de origem desses ácidos húmicos foi submetido, além de diferenças na própria composição do material de origem. E ajudam a explicar as diferenças relacionadas ao desempenho das plantas (Tabela 1).

É provável que o AH-G esteja em uma etapa mais avançada do processo de humificação, devido à sua maior proporção de C-aromático e C-carbonil (Tabela 2), estruturas cujas proporções tendem a aumentar no decorrer do processo de humificação (Stevenson, 1994). Esses resultados também evidenciam maior quantidade de fenóis e ácidos carboxílicos, grupos funcionais diretamente ligados a funcionalidade dos ácidos húmicos.

A presença de AH levou a variações proeminentes na composição bacteriana foliar (Figura 5 B-C) e, em menor grau, nas raízes. Quando as plantas não estão estressadas, as comunidades bacterianas são similares entre os AH e ambas, diferem do controle. Enquanto que na presença de estresse, as comunidades se tornaram distintas entre os três tratamentos. Indicando, que os grupos bacterianos enriquecidos parecem ter papéis distintos na planta mediante ao estresse da planta.

A aplicação dos distintos AH ocorreu nas sementes e em folhas de soja, e além das mudanças microbiana na parte aérea das plantas, foi observado a presença de táxons DA também nas raízes. E este efeito pode estar relacionado a mudanças no metabolismo vegetal induzidas por AH (García et al., 2019), que podem ter enriquecido grupos microbianos endofíticos já existentes. Alternativamente, mudanças anatômicas e morfológicas nas raízes, bem como, incrementos sobre a exsudação radicular vegetal induzidas por essa fração húmica (Nardi et al., 2021), podem ter favorecido a colonização nos tecidos da planta por microrganismos presentes na rizosfera.

Os Gêneros *Variovorax* e *Kosakonia* foram DA em plantas que receberam os AH. Estes grupos bacterianos já foram isolados de soja e quando avaliados *in vitro*, apresentaram atividade antagônica contra vários patógenos bacterianos e fúngicos dessa cultura (de Almeida Lopes et al., 2018). *Kosakonia* foi estimulado em tecidos estressados de plantas de soja, e trabalhos mostraram o papel de espécies deste gênero como promotores de crescimento vegetal, como também, na proteção vegetal contra estresses abióticos (Berger et al., 2017; de Almeida Lopes et al., 2018; Shahid et al., 2021).

Membros do gênero *Variovorax* e *Oxalicibacterium* foram relatados por catabolizar oxalato (Tamer et al., 2002). Em algumas plantas, a degradação desse composto proporcionou a proteção contra patógenos fúngicos (Müller et al., 2016).

Adicionalmente, microrganismos que degradam oxalato, também podem atuar no aumento da absorção de nutrientes pela planta (Morris e Allen, 1994).

Um trabalho avaliou a aplicação foliar de leonardita (composto com altas concentrações de AH) em beterrabas produzidas em hidroponia e em campo e, avaliaram o efeito deste composto sobre a comunidade bacteriana endofítica. Os autores observaram que o gênero mais responsivo a aplicação de leonardita em beterraba nas duas condições distintas, foi *Oxalicibacterium* (Della Lucia et al., 2021). E esse gênero também foi estimulado em plantas que receberam AH de vermicomposto. Além disso, Della Lucia et al. (2021) observaram em beterraba tratadas com leonardita, a regulação positiva de genes vegetais referentes ao transporte de auxina, que é um hormônio relacionado ao crescimento de plantas. É possível que os efeitos observados no tratamento com leonardita podem ser adicionais (ou mediados) aos efeitos dos endófitos bacterianos.

No tratamento com AH de gongocomposto, observou-se o aumento de *Cupriavidus pauculus*, *Sphingomonas naasensis*, *Massilia armeniaca*, que são gêneros que apresentam membros relacionados a tolerância a metais pesados, crescimentos em baixa disponibilidade hídrica, resistência a agentes microbianos e que melhoram o crescimento das plantas em condições abióticas estressantes e também, auxiliam na absorção de nutrientes pela plantas (Kim et al., 2014; Menon et al., 2019; Asaf et al., 2020; Zeng et al., 2020). Logo, estes grupos bacterianos podem estar atuando no crescimento da planta e na proteção dela contra estresses abióticos.

Actinoplane luojiashanensis também foi DA neste tratamento, um dos poucos trabalhos encontrado com essa espécie, destaca sua característica na produção de antibiótico (Jilian et al., 1995), enquanto que membros deste gênero, se destacam pelo papel no controle biológico. E por melhorarem o crescimento vegetal e a nodulação em leguminosas (El-Tarabily, 2003; Solans et al., 2009). *Chitinophaga sedimenti*, é uma espécie que já foi isolada de sedimentos. Este gênero é comumente associado ao controle biológico, uma vez que, apresentam membros com capacidade de produzir diversas enzimas que podem degradar componentes de fitopatógenos. Sendo encontrados em cisto de nematoides, como também, em fungos fitopatogênicos. (Li et al., 2017; Shaffer et al., 2017a; Hu et al., 2019).

Trabalhos encontraram *Novosphingobium ginsenosidimutans* altamente associada a rizosfera da soja (Fujimatsu et al., 2020; Liu et al., 2020b; Meier et al., 2021). Essa espécie foi DA na presença de AH e este composto pode ter favorecido sua colonização endofítica em soja. Além disso, esse grupo apresenta espécies relacionadas a proteção da planta frente estresses abióticos (Vives-Peris et al., 2018).

Já em plantas tratadas com AH de vermicomposto houve aumento de *Acinetobacter lwoffii*, essa espécie já foi descrita por melhorar o crescimento de feijão mediante a contaminação de arsênio (Das eSarkar, 2018). Este mesmo trabalho observou o efeito dessa espécie sobre a produção de reguladores vegetais em condições ambientais favoráveis como mediante a estresse. Adicionalmente, também demonstrou êxito na melhoria da resposta da planta perante o estresse oxidativo. *Sphingobium yanoikuyae*, também apresenta papel conhecido na tolerância de plantas frente metais pesados e a estresse hídrico (Arunthavasudhan et al., 2019; Zeng et al., 2020). Sabe-se que a secreção de exopolissacarídeos (EPS) por microrganismos podem contribuir para sua própria proteção contra flutuações ambientais (como seca, salinidade ou metais pesados), como também, para a proteção de suas plantas hospedeiras (Morcillo e Manzanera, 2021).

Luteibacter jiangsuensis é uma espécie bacteriana relacionada a degradação de moléculas complexas, incluindo, compostos tóxicos para o ambiente (Lin et al., 2020). Membros do gênero *Devosia* apresentam a capacidade de nodular leguminosas (Rivas et al., 2002; Mohd Nor et al.). E podem ter um papel relevante neste quesito em relação a soja, uma vez que, *Devosia elaeis* foi DA nas amostras. *Actinoplana luojishanensis*, foi DA em tratamento com AH de vermicomposto e gongocomposto.

Um trabalho demonstrou que aplicação de AH via radicular foi capaz de alterar a composição bacteriana neste órgão vegetal, proporcionando o aumento de táxons pertencente a *Sphingobacteriaceae*, *Chitinophaga* e *Actinobacteria* (da Silva et al., 2021b). Grupos similares foram encontrados no presente trabalho. Os autores destacam que o papel de AH na indução da tolerância vegetal pode estar relacionado ao estímulo dessas bactérias (da Silva et al., 2021b). Logo, é oportuno sugerir que o AH melhora a resposta fisiológica da planta para o enfrentamento de

tensões ambientais (Canellas et al., 2020), ao passo que, também seleciona microrganismos com função na promoção de crescimento vegetal e proteção da planta a estresse.

Os fungos foram afetados primordialmente por AH nas raízes das plantas estressadas. Curiosamente, alguns grupos fúngicos enriquecidos são relacionados a fitopatógenos, como *Erysiphe diffusa* (McTaggart et al., 2012), *Thanatephorus cucumeris* (Chela Fenille et al., 2002). Apesar disso, não foi observada nenhuma doença na soja.

Algo semelhante já foi observado em associações bacterianas com gramíneas. Por exemplo, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* é utilizada como bactéria promotora de crescimento vegetal em *Poaceae* como, milho, arroz, sorgo, trigo e cana-de-açúcar. No entanto, também é capaz de causar a doença na variedade B4362 de cana-de-açúcar e em algumas variedades de sorgo (Schmidt et al., 2012). Um trabalho observou que o sistema de secreção do tipo 3 (SST3) de *H rubrisubalbicans* estava relacionado a patogenicidade das estirpes em plantas suscetíveis, enquanto que em plantas assintomáticas, SST3 estava associada a colonização endofítica por *H rubrisubalbicans*. Possivelmente, respostas distintas frente a promoção de crescimento vegetal e patogenicidade estão relacionadas a mudanças no genótipo da planta e dos microrganismos. E tais mudanças podem gerar alterações sobre o reconhecimento e o tipo de interação entre eles (Schmidt et al., 2012). Ademais, a próprio microbioma pode afetar interações de microrganismos sobre a planta. Bactérias do gênero *Chitinophaga* são capazes de alterar o crescimento e o uso de substrato pelo fungo hospedeiro. E esta característica pode influenciar a capacidade do fungo de interagir com a planta, podendo afetar, sua patogenicidade (Shaffer et al., 2017b).

Trabalhos também já relataram resultados semelhantes, onde observaram a presença de espécies associadas a patógenos em plantas saudáveis de soja (Neupane et al., 2021). Contudo, não foi determinado se esses táxons são não patogênicos e benéficos para a planta ou, se são patógenos latentes. No entanto, dado que o mesmo isolado pode viver em associação benéfica e patogênica com plantas, seria de interesse definir quais características moleculares definem cada um desses estilos de vida.

Já espécies *Periconia epilithographicola* foi enriquecida na presença de AH e seu gênero apresenta membros com papel em biocontrole (Verma et al., 2011) e esta espécie foi documentada como celulolítica (Coronado-Ruiz et al., 2018). Microrganismos celulolíticos podem auxiliar a penetração do rizóbio em raízes de leguminosas e favorecer a nodulação (Sindhu e Dadarwal, 2001; Coronado-Ruiz et al., 2018). *Cercophora mirabilis*, espécies deste gênero foram encontradas associadas a raízes de soja em campo, mas sua função ainda é pouco compreendida (Bargaz et al., 2017). O gênero *Balansia* já foi relato como patógeno, promotor de crescimento e antagonistas de pragas agrícolas (Clay et al., 1985; Porter et al., 1985; Ren e Clay, 2009). *Curvularia* também apresenta papel dúbio sobre seu efeito na planta, uma vez que este gênero apresenta indivíduos que atuam na promoção de crescimento vegetal como também, são capazes de causar doenças em plantas (Michael Tilley e Lynn Walker, 2002). Por exemplo, *Curvularia hawaiiensis*, já foi documentado por causar doenças em gramíneas, como o arroz (Imran et al., 2022). E também há relatos de espécies desse gênero associadas a doenças em soja (González-Molotla et al., 2021). Já, *Curvularia intermedia*, foi identificada por auxiliar o crescimento de soja através do controle de ervas daninhas, atuando como um herbicida biológico (Michael Tilley e Lynn Walker, 2002). Membros dessa espécie também são conhecidos como patógenos de humanos (Barupal et al., 2021). *Curvularia eragrostidis*, causa doença em algumas culturas (Leite et al., 2018) e também possuem papel como agente de biocontrole (Jiang et al., 2008).

Sabe-se que quando sob estresse abiótico, patógenos oportunistas colonizam com mais facilidade plantas previamente debilitadas, reduzindo sua defesa contra a injúria (Tewari e Arora, 2014). Sendo assim, o estímulo de microrganismo relacionados ao controle biológico também é de grande relevância para o estabelecimento vegetal mesmo mediante a tensões abióticas. Na natureza, a maioria das plantas são colonizadas por uma enorme diversidade de microrganismos endofíticos e patogênicos. No entanto, ainda não está claro como a presença de múltiplos parceiros é equilibrada nas raízes das plantas a ponto de manter o crescimento vegetal (Niu et al., 2020).

Em suma, a aplicação de AH de gongocomposto e vermicomposto auxiliam o crescimento da planta e induzem a modulação da comunidade endofítica.

Mostramos também que o AH pode desencadear o enriquecimento de microrganismos com potencial para atuar tanto no crescimento vegetal quanto na defesa da planta contra patógenos e também na proteção contra estresse abiótico. Esses resultados evidenciam questões previamente em aberto, como a necessidade de abordagens para elucidar o real papel do AH na fisiologia vegetal e a participação da microbiota vegetal.

Vale destacar, que talvez a aplicação de AH tenha favorecido o estabelecimento endofíticos de microrganismos do solo, incluindo, fungos oportunistas. No entanto, é sugerido que a organização da microbiota tem um ajuste fino de forma a impedir que ocorra o desenvolvimento de doenças por meio destes grupos potencialmente patogênicos. Assim, o presente estudo representa um avanço para a compreensão de alterações induzidas por AH no microbioma em soja e reforça a potencialidade deste composto em melhorar o crescimento da planta mesmo na seca. Todavia, mais estudos devem ser desenvolvidos para compreender o efeito de AH sobre a microbiota vegetal e sua função na planta.

5. CONCLUSÃO

A aplicação de AH de vermicomposto e gongocomposto melhoraram o crescimento da soja sob restrição hídrica e estimulam o enriquecimento de microrganismos benéficos para planta.

6.REFERÊNCIAS

Abarenkov K, Henrik Nilsson R, Larsson K, Alexander IJ, Eberhardt U, Erland S, Høiland K, Kjølter R, Larsson E, Pennanen T, Sen R Taylor AFS, Tedersoo L, Ursing BM, Vrålstad T, Liimatainen K, Peintner U, Kõljalg U (2010) The unite database for molecular identification of fungi – recent updates and future perspectives. **New phytologist** 186 :281–285.

Andrews S (2010) **Fastqc: a quality control tool for high throughput sequence data.**

Armanhi JSL, De Souza RSC, Damasceno NB, De Araújo LM, Imperial J, Arruda PA (2018) Community-based culture collection for targeting novel plant growth-promoting bacteria from the sugarcane microbiome **Frontiers in Plant Science** 8:2191.

Arunthavasu R, Thangavel K, Uthandi S (2019) Impact of drought-tolerant rice apoplastic fluid endophyte (*Sphingobium yanoikuyae* mh394206) on the morphological and physiological characteristics of rice (co51) grown in moisture deficit condition **Madras agricultural journal** 106:217–224.

Asaf S, Numan M, Khan AL, Al-Harrasi A (2020) Sphingomonas: from diversity and genomics to functional role in environmental remediation and plant growth **Critical reviews in biotechnology** 40:138–152.

Bargaz A, Noyce GL, Fulthorpe R, Carlsson G, Furze JR, Jensen ES, Dhiba D, Isaac ME (2017) Species interactions enhance root allocation microbial diversity and p acquisition in intercropped wheat and Soybean under P deficiency **Applied soil ecology** 120:179–188.

Barupal T Meena M Sharma K (2021) Comparative analysis of bioformulations against *Curvularia lunata* (wakker) boedijn causing leaf spot disease of maize **Archives of phytopathology and plant protection** 54: 261–272.

Berger B, Baldermann S, Ruppel S (2017) The plant growth-promoting bacterium *Kosakonia radicincitans* improves fruit yield and quality of *Solanum lycopersicum*. **Journal of the science of food and agriculture** 97:4865–4871.

Breedveld MW, Miller KJ (1994) Cyclic beta-glucans of members of the family *Rhizobiaceae*. **Microbiological reviews** 58:45–161.

Callahan BJ, Mcmurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP (2016) Dada2: high-resolution sample inference from illumina amplicon data. **Nature methods** 13:581–583.

Canellas LP, Canellas NOAS, Irineu LES, Olivares FL, Piccolo A (2020) Plant chemical priming by humic acids, **Chemical and biological technologies in agriculture** 7:2020

Canellas LP, Piccolo A, Dobbss LB, Spaccini R, Olivares FL, Zandonadi DB, Façanha AR (2010) Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. **Chemosphere** 78 :457–466.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R (2011) Global patterns of 16s rna diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the national academy of sciences** 108: 4516–4522.

Carrión VJ, Perez-Jaramillo J, Cordovez V, Tracanna V, De Hollander M, Ruiz-Buck D, Mendes LW, Van Ijcken WFJ, Gomez-Exposito R, Elsayed SS, Mohanraju P, Arifah A, Van Der Oost J, Paulson JN, Mendes R, Van Wezel GP, Medema MH, Raaijmakers JM (2019) Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome. **Science** 366:606–612.

Chela Fenille R, Luiz De Souza N, Eurya Kuramae E (2002) Characterization of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil. **European journal of plant pathology** 108:783–792 2002

Clay K, Hardy TN, Hammond AM (1985) Fungal endophytes of grasses and their effects on an insect herbivore. **Oecologia** 66: 1–5.

Coronado-Ruiz C, Avendaño R, Escudero-Leyva E, Conejo-Barboza G, Chaverri P, Chavarría M (2018) Two new cellulolytic fungal species isolated from a 19th-century art collection. **Scientific reports** 8:7492.

da Silva MSRA et al. (2021a) K-humate as an agricultural alternative to increase nodulation of soybeans inoculated with *Bradyrhizobium*. **Biocatalysis and agricultural biotechnology** 36:102-129.

da Silva MSRA, Huertas TOC, Ribeiro TG, da Silva CSRA, da Silva CSRA, García-Mina JM, Baldani VLD, Calderín GA, Berbara RLL, Jesus EC (2021b) Humic acids enrich the plant microbiota with bacterial candidates for the suppression of pathogens. **Applied Soil Ecology** 168:104-146.

Das J, Sarkar P (2018) Remediation of arsenic in mung bean (*Vigna radiata*) with growth enhancement by unique arsenic-resistant bacterium *Acinetobacter lwoffii* **Science of the total environment** 624:1106–1118.

de Almeida LKB, Carpentieri-Pipolo V, Fira D, Balatti PA, López SMY, Oro TH, Stefani PE, Degrassi G (2018) Screening of bacterial endophytes as potential biocontrol agents against soybean diseases. **Journal of applied microbiology** 125:1466–1481.

de Souza RSC, Okura VK, Armanhi JSL, Jorrín B, Lozano NSMJ, González-Guerrero M Araújo LM, Verza NC, Bagheri HC (2016) Imperial J Arruda p Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Scientific Reports** 6:28774.

Della Lucia MC, Bertoldo G, Broccanello C, Maretto L, Ravi S, Marinello F, Sartori L, Marsilio G, Baglieri A, Romano A, Colombo M, Magro F, Campagna G, Concheri G, Squartini A, Stevanato P (2021) Novel effects of leonardite-based applications on sugar beet. **Frontiers in Plant Science** 12 :290.

Didion JP, Martin M, Collins FS (2017) Atropos: specific sensitive and speedy trimming of sequencing reads. **Peerj** 5:3720.

Edgar R (2010) **Usearch**: Lawrence Berkeley National Lab (Lbnl) Berkeley Ca (United States). Disponível em: <<https://www.osti.gov/science/cinema/biblio/1137186>> Acesso em: 7 abr 2022

El-Tarabily KA (2003) An Endophytic Chitinase-Producing Isolate Of Actinoplanes Missouriensis With Potential For Biological Control Of Root Rot Of Lupin Caused By *Plectosporium tabacinum*. **Australian Journal Of Botany** 51:257–266.

Freitas VF, Cerezini P, Hungria M, Nogueira MA (2022) Strategies To Deal With Drought-Stress In Biological Nitrogen Fixation In Soybean. **Applied Soil Ecology** 172:104352.

Fujimatsu T, Endo K, Yazaki K, Sugiyama A (2020) Secretion dynamics of soyasaponins in Soybean roots and effects to modify the bacterial composition. **Plant Direct** 4:9Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pld3259>> Acesso em: 27 mar 2022

García AC, Tavares OCH, Balmori DM, Santos AV, Canellas LP, García-Mina JM, Louro BRL (2018) Structure-Function Relationship Of Vermicompost Humic Fractions For Use In Agriculture **Journal Of Soils And Sediments** 18: 1365–1375.

García AC, Van Tol CTA, Santos LA, Tavares OCH, Castro RN, Berbara RLL, García-Mina JM (2019) Structure–Property–Function Relationship Of Humic Substances In Modulating The Root Growth Of Plants: A Review **Journal Of Environmental Quality** 48 :1622–1632.

González-Molotla IA, Félix-Gastélum R, Leyva-Madrugal KY, Quiroz-Figueroa FR, Maldonado-Mendoza IE, González-Molotla IA, Félix-Gastélum R, Leyva-Madrugal KY, Quiroz-Figueroa FR, Maldonado-Mendoza IE (2021) Etiology of soybean (*Glycine max*) leaf spot in sinaloa México. **Revista mexicana de Fitopatología** 39:371–390.

Guo G, Yuan XY, Jiang F, Zhen LB, Shui YJ, Tao WE, Li YH (2015) Nodulation characterization and proteomic profiling of *Bradyrhizobium liaoningense* ccbau05525 in response to water-soluble humic materials. **Scientific Reports** 5:10836.

Hu W, Strom NB, Haarith D, Chen S, Bushley KE (2019) Seasonal variation and crop sequences shape the structure of bacterial communities in cysts of soybean cyst nematode. **Frontiers in Microbiology** 10: 2671.

Hungria M, Mendes IC (2015) Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? Em: de Bruijn F J (ed). **Biological Nitrogen Fixation** Hoboken NJ USA: John Wiley & Sons 1009–1024.

Imran M, Khanal S, Zhou X-G, Antony-Babu S, Atiq M (2022) First report of brown leaf spot of rice caused by *Curvularia hawaiiensis* in the United States. **Plant disease**

Jiang SJ, Qiang S, Zhu YZ, Dong YF (2008) Isolation and phytotoxicity of a metabolite from *Curvularia eragrostidis* and Characterisation of Its modes of action. **Annals of Applied Biology** 152:103–111.

Jilian H, Qiwei Y, Zhixian L (1995) A producer of new antitumor antibiotics actinoplanes luojiashanensis n.sp. **Zhongguo Kang Sheng su za zhi= Chinese Journal of Antibiotics**, 20: 241-245.

Kim SJ, Moon JY, Lim JM, Ahn JH, Weon HY, Ahn TY, Kwon SW (2014) *Sphingomonas aerophila* sp nov and *Sphingomonas naasensis* sp nov isolated from air and soil respectively **International journal of systematic and evolutionary microbiology** 64: 926–932. 2014

Lahti L, Shetty S, Blake T, Salojarvi J (2017). Microbiome R package. **Tools Microbiome Anal R**.

Lamar RT, Monda H, Sleighter R (2021) Use of Ore-Derived Humic Acids With Diverse Chemistries to Elucidate Structure-Activity Relationships (SAR) of Humic Acids in Plant Phenotypic Expression. **Frontiers in plant Science** 12:758424-758424.

Leite RP, Nascimento LC, Oliveira MDM (2018) Inoculação de *Curvularia eragrostidis* em inhame (*dioscorea alata*) cv São tomé **Summa phytopathologica** 44:281–282.

Li N, Chen T, Cheng D, Xu X-J, He J (2017) *Chitinophaga sedimenti* sp Nov isolated from sediment. **International journal of systematic and evolutionary microbiology** 67: 3485–3489.

Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in enzymology** 148:350–382

Lin Z, Pang S, Zhang W, Mishra S, Bhatt P, Chen S (2020) Degradation of acephate and its intermediate methamidophos: mechanisms and biochemical pathways **Frontiers in microbiology** 2045.

Liu H, Brettell LE, Qiu Z, Singh BK (2020 a) Microbiome-mediated stress resistance in plants. **Trends in plant science** 25:733–743.

Liu QM, Lee BH, Lee KE, Kim SY, Wee JH, Im WT. (2020 b) Complete genome sequence of *Novosphingobium ginsenosidimutans* fw-6^t a ginsenoside-converting bacterium isolated from fresh water **The Microbiological Society of Korea** 56:101–102.

Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with Deseq2. **Genome biology** 15 : 550.

Lundberg DS, Yourstone, Mieczkowski P, Jones CD, Dangl JL (2013) Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. **Nature methods** 10: 999–1002.

Mcmurdie PJ, Holmes S (2013) Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **Plos one** 8: E61217.

Mctaggart AR, Ryley MJ, Shivas RG (2012) First report of the powdery mildew *Erysiphe diffusa* on soybean in Australia. **Australasian plant disease notes** 127–129 2012

Meier M A Lopez-Guerrero M G Guo M Schmer M R Herr J R Schnable J C Alfano J R Yang J (2021) Rhizosphere microbiomes in a historical maize-soybean rotation system respond to host species and nitrogen fertilization at the genus and subgenus levels. **Applied and Environmental Microbiology** 87:E03132-20.

Menon RR, Kumari S, Kumar P, Verma A, Krishnamurthi S, Rameshkumar N(2019) *Sphingomonas pokkali* sp Nov a novel plant associated rhizobacterium isolated from a saline tolerant pokkali rice and its draft genome analysis **Systematic and applied microbiology** 42:334–342.

Michael TA, Lynn WH (2002) Evaluation of *curvularia intermedia* (*Cochliobolus intermedius*) as a potential microbial herbicide for large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*). **Biological control** 25:12–21.

Mikryukov V (2019) **Metagmisc: miscellaneous functions for metagenomic analysis.**

Mohd NMN, Sabaratnam V, Tan GYA (2017) *Devosia elaeis* sp nov isolated from oil palm rhizospheric soil **International journal of systematic and evolutionary microbiology** 67: 851–855.

Morcillo RJL, Manzanera M (2021) The effects of plant-associated bacterial exopolysaccharides on plant abiotic stress tolerance. **Metabolites** 11:337 2021.

Morris SJ, Allen MF (1994) Oxalate-metabolizing microorganisms in sagebrush steppe soil. **Biology and fertility of soils** 18:255–259.

Müller DB, Vogel C, Bai Y, Vorholt JÁ (2016) The plant microbiota: systems-level insights and perspectives **Annual review of genetics** 50:211–234.

Nardi S, Concheri G, Pizzeghello D, Sturaro A, Rella R, Parvoli G (2000) Soil organic matter mobilization by root exudates. **Chemosphere** 41:653–658.

Nardi S, Pizzeghello D, Ertani A (2018) Hormone-like activity of the soil organic matter **Applied soil ecology** 123:517–520.

Nardi S, Schiavon M, Francioso O (2021) Chemical structure and biological activity of humic substances define their role as plant growth promoters. **Molecules** 26:2256.

Neupane A, Bulbul I, Wang Z, Lehman RM, Nafziger E, Marzano SYL (2021) Long term crop rotation effect on subsequent soybean yield explained by soil and root-associated microbiomes and soil health indicators. **Scientific reports** 11: 9200.

Niu B, Wang W, Yuan Z, Sederoff RR, Sederoff H, Chiang VL, Borriss R (2020) Microbial interactions within multiple-strain biological control agents impact soil-borne plant disease. **Frontiers in microbiology** 11:58540.

Porter JK, Bacon CW, Cutler HG, Arrendale RF, Robbins JD (1985) In vitro auxin production by *Balansia epichloë*. **Phytochemistry** 24:1429–1431.

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2012) The silva ribosomal rna gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research** 41:590–596.

R core team (2021) **R: language and environment for statistical computing R foundation for statistical computing vienna austria** Disponível em: <url <https://www.r-project.org/>>

Ramanathan B, Alagesan P (2012) Evaluation of millicompost versus vermicomposto. **Current science** 103:140–143.

Ren A, Clay K (2009) Impact of a horizontally transmitted endophyte *Balansia henningsiana* on growth and drought tolerance of *Panicum rigidulum*. **International journal of plant sciences** 170:599–608.

Rivas R., Velázquez E Willems A, Vizcaíno N, Subba-Rao NS, Mateos PF, Gillis M, Dazzo FB, Martínez-Molina E (2002) A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (lf) Druce. **Applied and environmental microbiology** 68:5217–5222.

Scaglia B, Nunes RR, Rezende MOO, Tambone F, Adani F (2016) Investigating organic molecules responsible of auxin-like activity of humic acid fraction extracted from vermicompost. **Science of the total environment** 562:289–295.

Schmidt MA, Balsanelli E, Faoro H, Cruz LM, Wasseem R, De Baura VA, Weiss V, Yates MG, Madeira HMF, Pereira-Ferrari L, Fungaro MHP, De Paula FM, Pereira LF P, Vieira LGE, Olivares FL, Pedrosa FO, De Souza EM, Monteiro RA (2012) The type III secretion system is necessary for the development of a pathogenic and endophytic interaction between *Herbaspirillum rubrisubalbicans* and Poaceae. **Bmc microbiology** 12: 98.

Schmieder R, Edwards R (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets **Bioinformatics** 27:863–864.

Shaffer JP, U'ren JM, Gallery RE, Baltrus DA, Arnold AE (2017) An endohyphal bacterium (*Chitinophaga bacteroidetes*) alters carbon source use by *Fusarium keratoplasticum* (f *Solani* species complex nectriaceae) **Frontiers in microbiology** 8:350.

Shahid M, Ameen F, Maheshwari HS, Ahmed B, Alnadhari S, Khan MS (2021) Colonization of *Vigna radiata* by a halotolerant bacterium *Kosakonia sacchari* improves the ionic balance stressor metabolites antioxidant status and yield under nacl stress. **Applied soil ecology** 158:103809.

Sindhu SS, Dadarwal KR (2001) Chitinolytic and cellulolytic pseudomonas sp Antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp cicer in chickpea **Microbiological research** 156:353–358.

Smith DP, Peay KG (2014) Sequence depth not pcr replication improves ecological inference from next generation dna sequencing. **Plos one** 9:E90234.

Solans M, Vobis G, Wall LG (2009) Saprophytic actinomycetes promote nodulation in medicago sativa-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis in the presence of high N. **Journal of plant growth regulation** 28:106–114.

Stevenson FJ (1994) **Humus chemistry: genesis composition reactions**: John Wiley & Sons.

Suñer L, García R, Galantini JÁ, Forján H, Paz González A (2018) Edaphic forms of phosphorus in no-tillage cropping sequences in the argentine southern central pampas. **Geoderma** 323:107–115.

Tamer A Ü Aragno M Şahin N (2002) Isolation and characterization of a new type of aerobic oxalic acid utilizing bacteria and proposal of *Oxalicibacterium flavum* gen nov sp nov. **Systematic and applied microbiology** 25:13–519.

Tewari S, Arora NK (2014) Multifunctional exopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* pf23 involved in plant growth stimulation biocontrol and stress amelioration in sunflower under saline conditions. **Current microbiology** 69: 484–494.

Timm CM, Carter KR, Carrell AA, Jun SR, Jawdy SS, Vélez JM, Gunter LE, Yang Z, Nookaew I, Engle NL, Lu TYS, Schadt CW, Tschaplinski TJ, Doktycz MJ, Tuskan GA, Pelletier DA, Weston DJ (2018) Abiotic stresses shift belowground populus-associated bacteria toward a core stress microbiome. **Msystems** 3:E00070-17.

Vandenkoornhuyse P, Quaiser A, Duhamel M, Le Van A, Dufresne A (2015) The importance of the microbiome of the plant holobiont. **The new phytologist** 206:1196–1206.

Verma VC, Lobkovsky E, Gange AC, Singh SK, Prakash S (2011) Piperine production by endophytic fungus *Periconia* sp Isolated from piper longum l. **The journal of antibiotics** 64:427–431.

Vives-Peris V, Gómez-Cadenas A, Pérez-Clemente RM Salt stress alleviation in citrus plants by plant growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas putida* and *Novosphingobium* sp **Plant cell reports** [s L] v 37 n 11 p 1557–1569 2018

Wickham H (2011) Ggplot2 **Wires computational statistics** 3 :180–185.

Zeng W, Zhang S, Xia M, Wu X, Qiu G, Shen L (2020) Insights into the production of extracellular polymeric substances of *Cupriavidus pauculus* 1490 under the stimulation of heavy metal ions. **Rsc advances** 10: 20385–20394.

Zhang J, Kobert K Flouri T, Stamatakis A (2014) Pear: a fast and accurate illumina paired-end read merger **Bioinformatics** 30: 614–620

CAPÍTULO 4- Considerações finais

O presente estudo abordou o potencial da utilização de ácidos húmicos (AH) de diferentes origens em combinação com *Bradyrhizobium* frente a promoção de crescimento e maior aporte de N em soja, bem como, o crescimento desta cultura em condições de déficit hídrico. Vale destacar que o efeito positivo sobre o crescimento vegetal foi conseguido em baixas doses de AH, o que demonstra, a grande viabilidade deste produto.

E a partir desses resultados é destacado a grande potencialidade da combinação de inoculante e AH, sendo interessante que tais experimentações sejam realizadas em áreas agrícolas com diferentes condições edafoclimáticas. Além disso, o modo de aplicação de AH é muito importante e rende respostas distintas as plantas, principalmente, quando aplicado junto ao inoculante. Sendo assim, os resultados são promissores e novos estudos devem ser desenvolvidos nesta área de conhecimento que está em ascensão. A utilização de AH em sementes tem fornecido resultados positivos frente a nodulação, todavia, neste trabalho não foram utilizadas sementes tratadas com fungicida e inseticida, como é a realidade agrícola. E seria interessante testes que avaliem a compatibilidade de AH com o tratamento de semente.

Adicionalmente, muitos aspectos sobre os mecanismos relativos ao efeito positivo de AH no crescimento vegetal continuam inexplorados e um deles está relacionado a implicação do uso deste composto sobre o microbiota endofítica. Sabe-se que o microbioma endofítico oferece funções adicionais ao hospedeiro vegetal, melhorando inclusive, as respostas das plantas a mudanças ambientais. Logo, os microrganismos enriquecidos em soja na presença de AH podem possuir papéis de destaque frente a promoção direta e indireta de crescimento vegetal, e nesta tese, encontramos microrganismos enriquecidos com múltiplas funções para o desenvolvimento vegetal. Entender os aspectos que transpassam a relação planta-microrganismo-AH é relevante para utilização de forma racional e eficiente dos recursos naturais em processo biotecnológicos, principalmente, quando se obtém conhecimentos sobre os microrganismos mais intimamente relacionados a espécie de interesse.

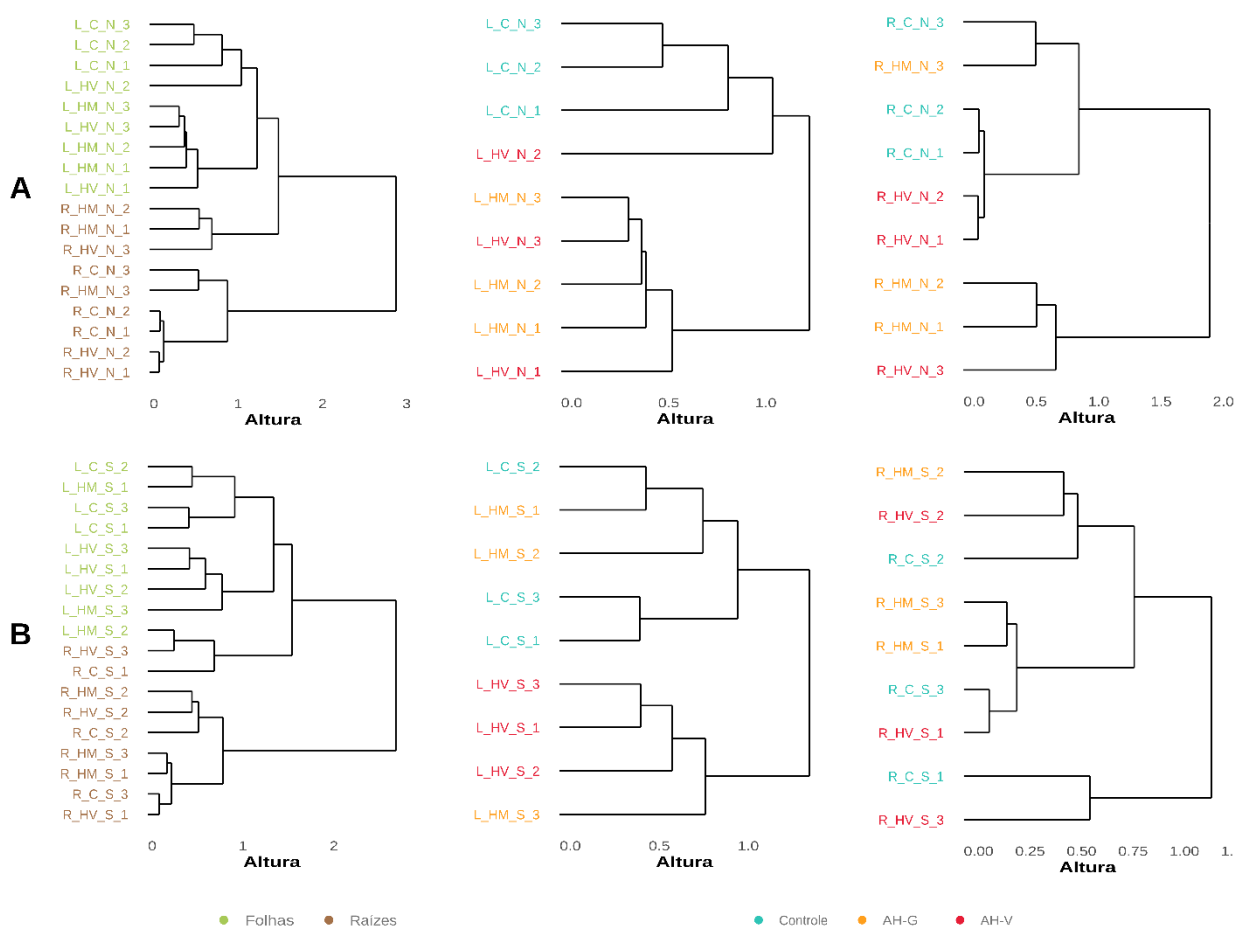
Pesquisas desenvolvidas que avaliam interações microbianas, tem propiciado o aumento do conhecimento acerca das associações entre microrganismos, ambiente e a planta. E esses trabalhos podem contribuir tanto para aumento dos rendimentos das culturas- sem que haja a necessidade da utilização de novas áreas de cultivo - como também, contribuir de forma sustentável para o aumento da resiliência vegetal durante a produção agrícola, tendo em vista, os desafios impostos pelas mudanças climáticas em face a rendimentos na agricultura.

APÊNDICES

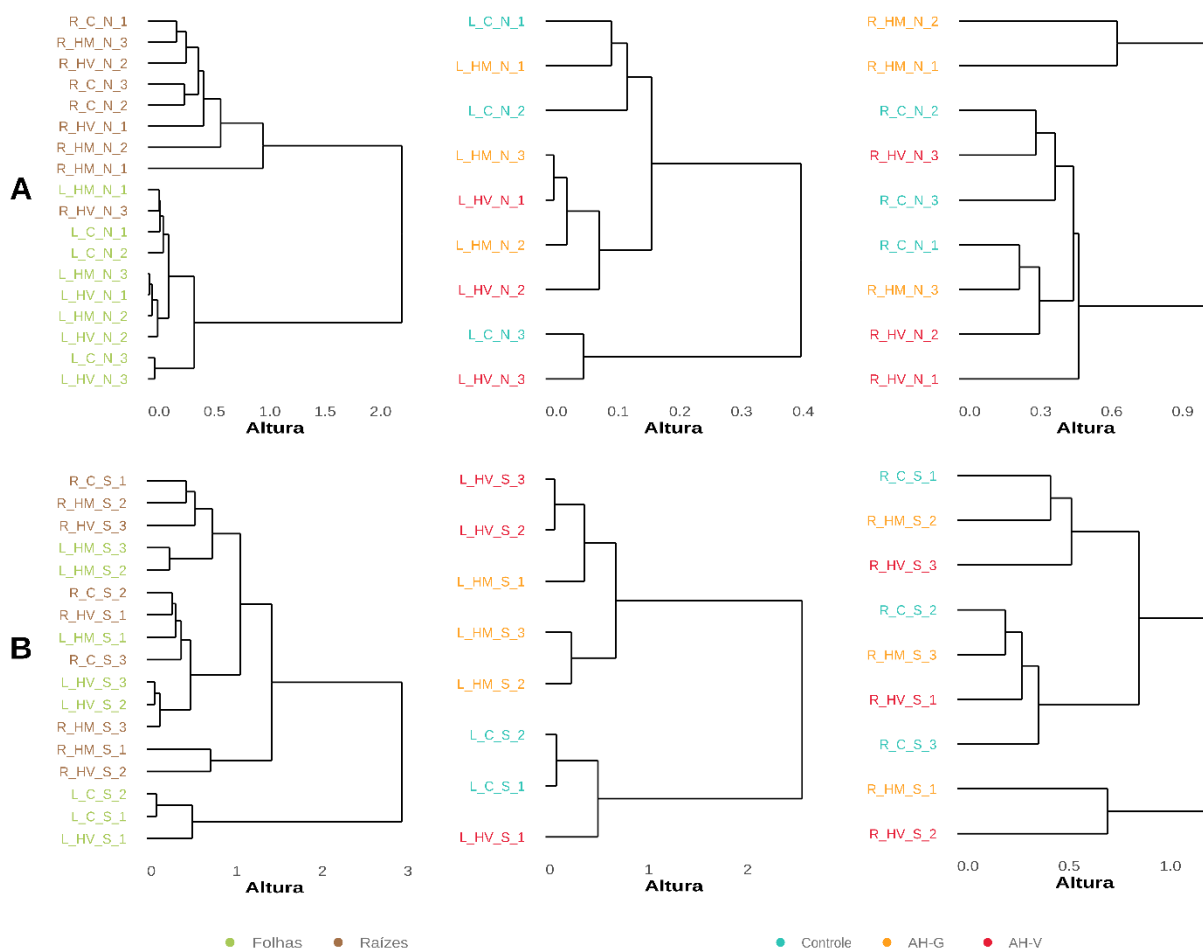
Apêndice A. Médias das métricas de alfa diversidade das frações bacterianas e fúngicas presentes na parte aérea e raiz de plantas de soja que receberam a aplicação de AH de vermicomposto (AH-V), gongocomposto (AH-G) ou que não receberam aplicação (Controle), na presença e ausência de estresse.

Amostras	Sem estresse			Com estresse			
	Chao1	Shannon	Gini-Simpson	Chao1	Shannon	Gini-Simpson	
Bactérias (16S rRNA)	Folhas (AH-V)	43,33	2,35	0,79	151,33	3,29	0,91
	Raízes (AH-V)	109,33	2,04	0,54	148,33	2,24	0,58
	Folhas (AH-G)	59,33	3,44	0,95	106,67	3,25	0,86
	Raízes (AH-G)	200,67	3,39	0,87	127,67	1,85	0,54
	Folhas (Controle)	68,67	3,11	0,90	112,33	3,63	0,93
	Raízes (Controle)	104,67	1,38	0,46	123	2,39	0,65
	Folhas (AH-V)	40	0,56	0,20	73,33	0,97	0,34
Fungos (ITS)	Raízes (AH-V)	105	1,61	0,56	84,33	1,83	0,65
	Folhas (AH-G)	57,67	0,40	0,12	79,33	1,60	0,62
	Raízes (AH-G)	103	2,35	0,78	85	1,52	0,58
	Folhas (Controle)	53	0,74	0,28	56	0,82	0,24
	Raízes (Controle)	115,33	2,01	0,69	93	1,55	0,60

AH-V.: Amostras tratadas com AH de vermicomposto; AH-G: Amostras tratadas com AH de gongocomposto. Controle se refere a amostras sem adição de AH.



Apêndice B. Dendrogramas do agrupamento hierárquico das amostras bacterianas, na ausência (A) e presença (B) de estresse, baseadas nas distâncias de Bray-Curtis. Ao primeiro nível (à esquerda) observa-se os dendrogramas de todas as amostras, testadas em função da separação por material vegetal. Em seguida (centro e à direita), observa-se o agrupamento das amostras de folhas e raízes, respectivamente, testadas em função dos tratamentos recebidos. Os tratamentos se referem a aplicação de AH de vermicomposto (HA-V), gongocomposto (HA-G) e que não receberam aplicação (controle).



Apêndice C. Dendrogramas do agrupamento hierárquico das amostras fúngicas, na ausência (A) e presença (B) de estresse, baseadas nas distâncias de Bray-Curtis. Ao primeiro nível (à esquerda) observa-se os dendrogramas de todas as amostras, testadas em função da separação por material vegetal. Em seguida (centro e à direita), observa-se o agrupamento das amostras de folhas e raízes, respectivamente, testadas em função dos tratamentos recebidos. Os tratamentos se referem a aplicação de AH de vermicomposto (HA-V), gongocomposto (HA-G) e que não receberam aplicação (controle).

Apêndice D. Táxons bacterianos diferencialmente abundantes (p-valor < 0.05). Prefixos indicam o nível taxonômico, sendo estes: Reino (k), Filo (p), Classe (c), Ordem (o), Família (f), Gênero (g) e Espécie (s). Os tratamentos (Trat.) se referem a aplicação de AH de vermicomposto (AH-V), gongocomposto (AH-G) ou que não receberam aplicação (Controle). Os valores de Log2FC indicam o número de vezes em que um táxon é mais abundante em uma dada condição. Valores de Log2FC positivos indicam maior abundância para os materiais tratados (AH-V ou AH-G) e os negativos indicam maior abundância para o controle.

Táxon	Mat. Veg.	Trat.	Log2FC
p: <i>Bacteroidota</i>	Folhas	Controle	-5,01
p: <i>Firmicutes</i>	Folhas	Controle	-3,73
c: <i>Bacilli</i>	Folhas	Controle	-3,26
c: <i>Bacteroidia</i>	Folhas	Controle	-4,17
o: <i>Bacteroidales</i>	Folhas	Controle	-26,63
o: <i>Flavobacteriales</i>	Folhas	Controle	-8,36
o: <i>Lachnospirales</i>	Folhas	Controle	-23,62
o: <i>Oscillospirales</i>	Folhas	Controle	-26,08
f: <i>[Eubacterium] coprostanoligenes group</i>	Folhas	Controle	-23,39
f: <i>Bacillaceae</i>	Folhas	Controle	-7,32
f: <i>Bacteroidaceae</i>	Folhas	Controle	-28,28
f: <i>Beijerinckiaceae</i>	Folhas	Controle	-4,60
f: <i>Erysipelotrichaceae</i>	Folhas	Controle	-22,44
f: <i>Flavobacteriaceae</i>	Folhas	Controle	-7,65
f: <i>Labraceae</i>	Folhas	Controle	-24,52
f: <i>Lachnospiraceae</i>	Folhas	Controle	-24,61
f: <i>Oscillospiraceae</i>	Folhas	Controle	-25,30
f: <i>Rikenellaceae</i>	Folhas	Controle	-24,19
f: <i>Ruminococcaceae</i>	Folhas	Controle	-26,27
f: <i>Weeksellaceae</i>	Folhas	Controle	-8,69
g: <i>[Ruminococcus] torques group</i>	Folhas	Controle	-24,52
g: <i>Acinetobacter</i>	Folhas	Controle	-4,67
g: <i>Afipia</i>	Folhas	Controle	-25,55
g: <i>Alistipes</i>	Folhas	Controle	-24,87
g: <i>Bacillus</i>	Folhas	Controle	-8,45
g: <i>Bacteroides</i>	Folhas	Controle	-29,31
g: <i>Bosea</i>	Folhas	Controle	-9,22
g: <i>Brevundimonas</i>	Folhas	Controle	-6,47
g: <i>Chryseobacterium</i>	Folhas	Controle	-9,59
g: <i>Citricoccus</i>	Folhas	Controle	-22,91
g: <i>Faecalibacterium</i>	Folhas	Controle	-27,54
g: <i>Flavobacterium</i>	Folhas	Controle	-8,49
g: <i>Incertae Sedis</i>	Folhas	Controle	-22,68
g: <i>Labrys</i>	Folhas	Controle	-25,37
g: <i>Lachnospiraceae UCG-010</i>	Folhas	Controle	-22,95
g: <i>Ligilactobacillus</i>	Folhas	Controle	-26,10
g: <i>Lysinibacillus</i>	Folhas	Controle	-22,66
g: <i>Sellimonas</i>	Folhas	Controle	-24,36
g: <i>UCG-007</i>	Folhas	Controle	-26,33
s: <i>Acinetobacter_lwoffii</i>	Folhas	Controle	-4,71
s: <i>Brevundimonas_kwangchunensis</i>	Folhas	Controle	-7,92
s: <i>Flavobacterium_ummariense</i>	Folhas	Controle	-7,85
s: <i>Labrys_wisconsinensis</i>	Folhas	Controle	-25,36
o: <i>Pseudonocardiales</i>	Folhas	AH-G	22,30
f: <i>Pseudonocardaceae</i>	Folhas	AH-G	22,02
g: <i>Amycolatopsis</i>	Folhas	AH-G	21,67
g: <i>Variovorax</i>	Folhas	AH-G	8,20
o: <i>Rickettsiales</i>	Folhas	AH-V	9,49
f: <i>Halomonadaceae</i>	Folhas	AH-V	10,27
f: <i>Morganellaceae</i>	Folhas	AH-V	24,38
f: <i>Rickettsiaceae</i>	Folhas	AH-V	9,45
g: <i>Candidatus Hamiltonella</i>	Folhas	AH-V	24,41
g: <i>Candidatus Portiera</i>	Folhas	AH-V	10,16
g: <i>Rickettsia</i>	Folhas	AH-V	9,34
g: <i>Variovorax</i>	Folhas	AH-V	8,39
p: <i>Firmicutes</i>	Raízes	Controle	-4,00
c: <i>Bacilli</i>	Raízes	Controle	-4,14
o: <i>Bacillales</i>	Raízes	Controle	-5,20
f: <i>Bacillaceae</i>	Raízes	Controle	-5,47
g: <i>Afipia</i>	Raízes	Controle	-23,37
g: <i>Bacillus</i>	Raízes	Controle	-5,63
p: <i>Chloroflexi</i>	Raízes	AH-G	5,30
c: <i>Ktedonobacteria</i>	Raízes	AH-G	9,60

<i>o: Flavobacteriales</i>	Raízes	AH-G	4,97
<i>o: Ktedonobacterales</i>	Raízes	AH-G	8,34
<i>f: Cellvibrionaceae</i>	Raízes	AH-G	20,60
<i>f: Ktedonobacteraceae</i>	Raízes	AH-G	8,28
<i>g: Cellvibrio</i>	Raízes	AH-G	20,51
<i>g: Citricoccus</i>	Raízes	AH-G	20,72
Apêndice D (continuação)			
<i>g: Curvibacter</i>	Raízes	AH-G	20,87
<i>g: Delftia</i>	Raízes	AH-G	22,07
<i>g: Hydrogenophaga</i>	Raízes	AH-G	20,62
<i>g: Knoellia</i>	Raízes	AH-G	19,77
<i>g: Methylothera</i>	Raízes	AH-G	21,29
<i>g: MM2</i>	Raízes	AH-G	20,53
<i>g: Pseudoduganella</i>	Raízes	AH-G	10,74
<i>s: Sphingomonas_naasensis</i>	Raízes	AH-G	10,45
<i>f: Sutterellaceae</i>	Raízes	AH-V	8,84
<i>f: Thermomonosporaceae</i>	Raízes	AH-V	9,06
<i>g: Actinomadura</i>	Raízes	AH-V	22,36
<i>g: Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	Raízes	AH-V	20,16
<i>g: Methylobacillus</i>	Raízes	AH-V	8,28
<i>g: Spirillospora</i>	Folhas (Estresse)	Controle	-8,51
<i>g: Actinoplanes</i>	Folhas (Estresse)	AH-G	21,54
<i>g: Aureimonas</i>	Folhas (Estresse)	AH-G	24,83
<i>g: Candidatus Portiera</i>	Folhas (Estresse)	AH-G	21,35
<i>g: Variovorax</i>	Folhas (Estresse)	AH-G	10,35
<i>s: Actinoplanes_luojiashanensis</i>	Folhas (Estresse)	AH-G	21,73
<i>s: Cupriavidus_pauculus</i>	Folhas (Estresse)	AH-G	22,27
<i>s: Massilia_armeniaca</i>	Folhas (Estresse)	AH-G	21,67
<i>s: Sphingomonas_naasensis</i>	Folhas (Estresse)	AH-G	21,99
<i>g: Acinetobacter</i>	Folhas (Estresse)	AH-V	6,97
<i>g: Adhaeribacter</i>	Folhas (Estresse)	AH-V	8,54
<i>g: Bacillus</i>	Folhas (Estresse)	AH-V	5,57
<i>g: Brevibacillus</i>	Folhas (Estresse)	AH-V	9,33
<i>g: Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	Folhas (Estresse)	AH-V	8,58
<i>g: Candidatus Hamiltonella</i>	Folhas (Estresse)	AH-V	9,33
<i>g: Candidatus Portiera</i>	Folhas (Estresse)	AH-V	26,08
<i>g: Delftia</i>	Folhas (Estresse)	AH-V	7,14
<i>g: Desulfonauticus</i>	Folhas (Estresse)	AH-V	20,89
<i>g: Knoellia</i>	Folhas (Estresse)	AH-V	8,81
<i>g: Kosakonia</i>	Folhas (Estresse)	AH-V	25,37
<i>g: Neorhizobium</i>	Folhas (Estresse)	AH-V	8,17
<i>g: Oxalicibacterium</i>	Folhas (Estresse)	AH-V	9,33
<i>g: Paracoccus</i>	Folhas (Estresse)	AH-V	10,93
<i>g: Solibacillus</i>	Folhas (Estresse)	AH-V	8,10
<i>g: Stenotrophomonas</i>	Folhas (Estresse)	AH-V	6,27
<i>g: Variovorax</i>	Folhas (Estresse)	AH-V	9,67
<i>s: Acinetobacter_lwoffii</i>	Folhas (Estresse)	AH-V	8,54
<i>s: Devosia_elaeis</i>	Folhas (Estresse)	AH-V	8,41
<i>s: Sphingobium_anoikuyae</i>	Folhas (Estresse)	AH-V	8,10
<i>g: Citricoccus</i>	Raízes (Estresse)	Controle	-9,73
<i>g: Kibdelosporangium</i>	Raízes (Estresse)	Controle	-24,47
<i>s: Brevundimonas_kwangchunensis</i>	Raízes (Estresse)	Controle	-7,89
<i>s: Sphingobium_herbicidovorans</i>	Raízes (Estresse)	Controle	-8,40
<i>g: FFCH7168</i>	Raízes (Estresse)	AH-G	21,56
<i>g: Kosakonia</i>	Raízes (Estresse)	AH-G	21,15
<i>g: MN 122.2a</i>	Raízes (Estresse)	AH-G	21,27
<i>g: Pseudoxanthomonas</i>	Raízes (Estresse)	AH-G	23,08
<i>s: Chitinophaga_sedimenti</i>	Raízes (Estresse)	AH-G	20,90
<i>s: Novosphingobium_ginsenosidimutans</i>	Raízes (Estresse)	AH-G	21,80
<i>g: Actinoplanes</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	23,48
<i>g: Azohydromonas</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	21,52
<i>g: Hephaestia</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	24,19
<i>g: Luteibacter</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	21,63
<i>g: Subgroup 10</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	22,74
<i>s: Actinoplanes_luojiashanensis</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	22,93
<i>s: Luteibacter_jiangsuensis</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	21,02

Apêndice E. Táxons fúngicos diferencialmente abundantes (p -valor < 0.05). Prefixos indicam o nível taxonômico, sendo estes: Filo (p), Classe (c), Ordem (o), Família (f), Gênero (g) e Espécie (s). Os tratamentos (Trat.) se referem a aplicação de AH de vermicomposto (AH-V), gongocomposto (AH-G) ou que não receberam aplicação (Controle). Os valores de Log2FC indicam o número de vezes em que um táxon é mais abundante em uma dada condição. Valores de Log2FC positivos indicam maior abundância para os materiais tratados (AH-V ou AH-G) e os negativos indicam maior abundância para o controle.

Taxón	Mat. Veg.	Trat.	Log2FC
c: <i>Dothideomycetes</i>	Folhas	Controle	-3,27
o: <i>Pleosporales</i>	Folhas	Controle	-4,28
f: <i>Erythrobasidiaceae</i>	Raízes	Controle	-9,52
o: <i>Trichosphaeriales</i>	Raízes (Estresse)	Controle	-5,94
f: <i>Trichosphaeriaceae</i>	Raízes (Estresse)	Controle	-6,23
g: <i>Nigrospora</i>	Raízes (Estresse)	Controle	-6,01
s: <i>Nigrospora_oryzae</i>	Raízes (Estresse)	Controle	-7,12
f: <i>Clavicipitaceae</i>	Raízes (Estresse)	AH-G	11,05
g: <i>Balansia</i>	Raízes (Estresse)	AH-G	24,83
g: <i>Cercophora</i>	Raízes (Estresse)	AH-G	21,99
s: <i>Balansia_obtecta</i>	Raízes (Estresse)	AH-G	24,35
s: <i>Cercophora_mirabilis</i>	Raízes (Estresse)	AH-G	22,58
s: <i>Curvularia_intermedia</i>	Raízes (Estresse)	AH-G	23,71
f: <i>Clavicipitaceae</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	25,89
f: <i>Erysiphaceae</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	26,49
f: <i>Magnaporthaceae</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	21,54
f: <i>Periconiaceae</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	7,77
g: <i>Balansia</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	24,99
g: <i>Bipolaris</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	24,40
g: <i>Cercophora</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	24,97
g: <i>Cladorrhinum</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	22,17
g: <i>Erysiphe</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	26,37
g: <i>Periconia</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	7,68
g: <i>Pseudophialophora</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	21,47
g: <i>Taifanglania</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	22,83
g: <i>Thanatephorus</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	23,76
s: <i>Balansia_obtecta</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	25,32
s: <i>Cercophora_mirabilis</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	21,54
s: <i>Curvularia_eragrostidis</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	22,38
s: <i>Curvularia_hawaiiensis</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	9,67
s: <i>Curvularia_intermedia</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	21,68
s: <i>Erysiphe_diffusa</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	26,33
s: <i>Periconia_epilithographicola</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	24,24
s: <i>Thanatephorus_cucumeris</i>	Raízes (Estresse)	AH-V	21,31