

**KALED OMAR**

**COINOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* E *Bradyrhizobium sp.* AUMENTA  
ABSORÇÃO DE NITROGÊNIO E PRODUTIVIDADE DE FEIJÃO-CAUPI, SEM  
ALTERAÇÃO NA RECUPERAÇÃO DE NITROGÊNIO DO FERTILIZANTE**

ILHA SOLTEIRA – SP

Junho 2023

**KALED OMAR**

**COINOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* E *Bradyrhizobium sp.* AUMENTA  
ABSORÇÃO DE NITROGÊNIO E PRODUTIVIDADE DE FEIJÃO-CAUPI, SEM  
ALTERAÇÃO NA RECUPERAÇÃO DE NITROGÊNIO DO FERTILIZANTE**

Prof. Dr. Marcelo Carvalho Minhoto Teixeira Filho  
**Orientador**

Prof. Dr. Fernando Shintate Galindo  
**Coorientador**

Trabalho de Conclusão de Curso,  
apresentada à Faculdade de Engenharia de  
Ilha Solteira – UNESP como parte dos  
requisitos para a obtenção do grau de  
Engenheiro Agrônomo.

ILHA SOLTEIRA – SP

Junho 2023

FICHA CATALOGRÁFICA  
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

O54c Omar, Kaled.  
Coinoculação com *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium sp.*: aumenta absorção de nitrogênio e produtividade de feijão-caupi, sem alteração na recuperação de nitrogênio do fertilizante / Kaled Omar. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2023

47 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Agrônômica) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2023

Orientador: Marcelo Carvalho Minhoto Teixeira Filho

Coorientador: Fernando Shintate Galindo

Inclui bibliografia

1. Rizobactérias de crescimento vegetal. 2. Fixação biológica de nitrogênio. 3. Nitrogênio-15. 4. Frações de nitrogênio. 5. *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

*Raiane da Silva Santos*  
Raiane da Silva Santos

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE ENGENHARIA - CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

CURSO DE ENGENHARIA AGRONÔMICA

ATA DA DEFESA – TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO: Coinoculação com *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium sp.* aumenta absorção de nitrogênio e produtividade de feijão-caupi, sem alteração na recuperação de fertilizante nitrogenado

ALUNO: *Kaled Omar*

RA: 161051952

ORIENTADOR: Marcelo Carvalho Minhoto Teixeira Filho

Aprovado ( X ) - Reprovado ( ) pela Comissão Examinadora com Nota: 9,9

Comissão Examinadora:

*Marcelo Carvalho Minhoto Teixeira Filho*

Prof. Dr. Marcelo Carvalho Minhoto Teixeira Filho  
Presidente (Orientador)

*Edson Cabral da Silva*

Dr. Edson Cabral da Silva

*Rodolfo de Niro Gazola*

Dr. Rodolfo de Niro Gazola

*Kaled Omar*

Kaled Omar

Ilha Solteira, 07 de julho de 2023.

## **DEDICO**

Aos meus pais Nage Omar, Rosângela Maria Dias Omar e a todos meus amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, saúde e proteção.

Agradeço à Universidade Estadual Paulista, pela minha graduação.

Agradeço aos meus pais Nage Omar e Rosângela Maria Dias Omar por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e incentivando em toda minha graduação.

Agradeço à minha namorada Julia Maschio pelo amor e companheirismo.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Carvalho Minhoto Teixeira filho pelos ensinamentos e pela orientação ao longo da graduação com disponibilidade de tempo e paciência para me auxiliar em todas as situações.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Fernando Shintate Galindo por toda ajuda e auxílio ao longo do período que trabalhamos juntos, sempre passando grandes ensinamentos.

Aos meus amigos da turma LI de Engenharia Agrônômica, pela amizade, apoio e companheirismo durante os anos de Faculdade, em especial os senhores Antônio Leonardo Biagini, Carlos Schlatter, Carlos Eduardo Carvalho, Eduardo Baratella, Gabriel Schlatter, Gabriel Rogério, Matheus Fiorentino, Pedro Henrique de Val Castro e a senhora Paula Arriero.

Agradeço a todos os funcionários do Campus II da UNESP de Ilha Solteira, pois quando requisitados sempre obtive toda atenção e ajuda dos mesmos.

Aos meus amigos de longa data que sempre estiveram do meu lado nos momentos bons e ruins, sempre me incentivando e apoiando, meus sinceros agradecimentos aos senhores: Bruno Idalgo de Souza, Caue Veroneze, Cesar Augusto Mattara, Gabriel Augusto Bregalante Calça, Guilherme Stuqui Monzani, Luciano Alex Teixeira e às senhoras Gabriela Menegazzo e Letícia Oliva Marcos.

Agradeço aos meus companheiros de trabalho, da equipe de nutrição de plantas, Antonio Leonardo, Eduardo Baratella, Castro Junior, Wilian Rodrigues, Marcos Knoll e em especial ao Guilherme Carlos Fernandes pelo grande auxílio durante a produção do trabalho.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

**COINOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* E *Bradyrhizobium* sp.  
AUMENTA ABSORÇÃO DE NITROGÊNIO E PRODUTIVIDADE DE FEIJÃO-  
CAUPI, SEM ALTERAÇÃO NA RECUPERAÇÃO DE NITROGÊNIO DO  
FERTILIZANTE**

**RESUMO**

Este estudo foi projetado para investigar os efeitos da coinoculação de *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium* sp. em conjunto com a aplicação de N, na concentração de N no solo e nas plantas (N total, N-nitrato  $\text{NO}_3^-$  e N-amônio  $\text{NH}_4^+$ ), pigmentos fotossintéticos, biomassa de plantas de feijão-caupi e rendimento de grãos. Uma técnica isotópica foi empregada para avaliar a recuperação e derivação do fertilizante  $\text{N}^{15}$ . Os ensaios de campo envolveram duas inoculações - (i) *Bradyrhizobium* sp. isoladamente e (ii) coinoculação de *Bradyrhizobium* sp. + *A. brasilense* - e quatro doses de uréia de N (0, 20, 40 e 80 kg ha<sup>-1</sup>). A coinoculação de *Bradyrhizobium* sp. + *A. brasilense* aumentou a absorção de N pelo feijão-caupi (um aumento de 10% para 14%) e a produtividade de grãos (um aumento médio de 8%) em comparação com a inoculação padrão com *Bradyrhizobium* sp. especificamente derivado do solo e de outras fontes, sem afetar a recuperação do fertilizante  $\text{N}^{15}$ . Não há necessidade de suplementação de N via fertilizantes minerais quando a coinoculação de *A. brasilense* é realizada em uma cultura de feijão-caupi. No entanto, mesmo no caso de uma adubação basal NPK, as doses de N aplicadas devem permanecer abaixo de 20 kg N ha<sup>-1</sup> quando a coinoculação com *Bradyrhizobium* sp. e *A. brasilense* é realizada.

**Palavras-chave:** rizobactérias de crescimento vegetal; fixação biológica de nitrogênio; nitrogênio-15; frações de nitrogênio; *Vigna unguiculata* (L.) Walp

**CO-INOCULATION WITH *Bradyrhizobium* spp. AND *Azospirillum brasilense* INCREASES NITROGEN ABSORPTION AND PRODUCTIVITY OF COWPEA, WITHOUT ALTERATION IN THE NITROGEN RECOVERY OF FERTILIZER**

**ABSTRACT**

This study was designed to investigate the effects of *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* sp. co-inoculation coupled with N application on soil N levels and N in plants (total N, nitrate N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and ammonium N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), photosynthetic pigments, cowpea plant biomass and grain yield. An isotopic technique was employed to evaluate N<sup>15</sup> fertilizer recovery and derivation. Field trials involved two inoculations—(i) single *Bradyrhizobium* sp. and (ii) *Bradyrhizobium* sp. + *A. brasilense* coinoculation—and four N fertilizer rates (0, 20, 40 and 80 kg ha<sup>-1</sup>). The co-inoculation of *Bradyrhizobium* sp. + *A. brasilense* increased cowpea N uptake (an increase from 10 to 14%) and grain yield (an average increase of 8%) compared to the standard inoculation with *Bradyrhizobium* sp. specifically derived from soil and other sources without affecting N<sup>15</sup> fertilizer recovery. There is no need for the supplementation of N via mineral fertilizers when *A. brasilense* co-inoculation is performed in a cowpea crop. However, even in the case of an NPK basal fertilization, applied N rates should remain below 20 kg N ha<sup>-1</sup> when co-inoculation with *Bradyrhizobium* sp. and *A. brasilense* is performed.

**Keywords:** Plant growth rhizobacteria; biological nitrogen fixation; nitrogen-15; nitrogen fractions; *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atributos químicos do solo e populações de bradirizóbios no solo na camada de 0-0,20 m antes do início do experimento.....	14
--	----

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Concentrações de amônio do solo ( $\text{N-NH}_4^+$ ) (A), nitrato do solo ( $\text{N-NO}_3^-$ ) (B) e teor total de N (C), ureídeos das raízes (D),  $\text{N-NH}_4^+$  das raízes (E),  $\text{N-NO}_3^-$  das raízes (F) e proteína solúvel das raízes (G) no feijão-caupi afetadas por inoculações e doses de N.....21
- Figura 2. Concentrações de ureídeos foliares (A), amônio ( $\text{N-NH}_4^+$ ) (B), nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ) (C), N total (D), proteína solúvel (E) e clorofila A + B (F) em feijão-caupi afetadas por inoculações e doses de N N.....23
- Figura 3. Biomassa de raízes (A), nódulos (B) e parte aérea (C) e rendimento de grãos de feijão-caupi (D) afetados por inoculações e doses de N.....24
- Figura 4. Acúmulo de N no feijão-caupi (A), N proveniente do solo e de outras fontes (SNDFFS) (B), N proveniente do fertilizante (SNDFF) (C) e recuperação do fertilizante  $\text{N}^{15}$  na parte aérea (D), acúmulo de N (E), N proveniente do solo e de outras fontes (GNDFFS) (F), N proveniente do fertilizante (GNDF) (G) e recuperação do fertilizante  $\text{N}^{15}$  (H) nos grãos afetados por inoculações e doses de N.....25

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	13
<b>2.1 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE CULTIVO NO CAMPO</b> .....	13
<b>2.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS</b> .....	14
<b>2.3. MANEJO DA CULTURA DO FEIJÃO-CAUPI</b> .....	15
<b>2.4. AMOSTRAGEM, MEDIÇÕES E ANÁLISES</b> .....	16
<b>2.4.1. Coleta de folhas, raízes, nódulos e solo</b> .....	16
<b>2.4.1. Frações de nitrogênio nos tecidos vegetais e análise de proteínas solúveis</b> .....	17
<b>2.4.2. Análise do pigmento de clorofila</b> .....	18
<b>2.4.3. Biomassa aérea e produtividade de grãos de feijão-caupi</b> .....	18
<b>2.4.4. Acúmulo total de nitrogênio e recuperação de fertilizante N<sup>15</sup> na parte aérea e grãos do feijão-caupi</b> .....	19
<b>2.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b> .....	20
<b>3. RESULTADOS</b> .....	21
<b>3.1 FRAÇÕES DE NITROGÊNIO NO SOLO E NAS RAÍZES</b> .....	21
<b>3.2. FRAÇÕES DE NITROGÊNIO FOLIAR E PIGMENTOS DE CLOROFILA</b> ..	22
<b>3.3. PRODUTIVIDADES DE BIOMASSA E DE GRÃOS</b> .....	23
<b>3.4. ACÚMULO DE NITROGÊNIO NA PARTE AÉREA E RAIZ E RECUPERAÇÃO DO FERTILIZANTE N<sup>15</sup></b> .....	25
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	27
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	32
<b>MATERIAS SUPLEMENTARES</b> .....	33
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	34

## 1. INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma cultura de leguminosa herbácea que tem considerável adaptação a climas tropicais e subtropicais e é cultivada em toda a África, América Latina, sul dos Estados Unidos e sudeste da Ásia [1]. O feijão-caupi também é cultivado em alguns países do Mediterrâneo, mas o cultivo não é generalizado na Europa [2]. Essa cultura de leguminosa é especialmente importante devido ao seu alto teor de proteínas, tolerância à seca e altas temperaturas, bem como tolerância a solos com baixa fertilidade [3]. Sendo tolerante à seca, o feijão-caupi é cultivado predominantemente em savanas secas ao redor do mundo, com uma precipitação anual de cerca de 300 mm ou até mesmo menos [4]. O feijão-caupi é cultivado principalmente para produção de grãos e é rico em proteínas, com as cultivares melhoradas contendo, em média, 23% de proteína com base na massa seca [4]. Embora os grãos sejam o foco principal da planta de feijão-caupi, tanto as folhas quanto as flores também são consideradas comestíveis [1,5]. Esses aspectos tornam o feijão-caupi uma cultura-chave no contexto das mudanças climáticas globais e da segurança alimentar.

De acordo com dados de 2005, aproximadamente 20% da produção total de feijão no país correspondeu ao cultivo de feijão-caupi. Observa-se que o cultivo desse tipo de feijão está se expandindo para regiões como os cerrados, Norte, Nordeste e Centro-Oeste, onde é incorporado aos sistemas produtivos como uma cultura de safrinha após a colheita da soja e do arroz, e, em alguns casos, também é cultivado como cultura principal. Especificamente nos cerrados, o feijão-caupi cultivado como safrinha apresenta um custo altamente competitivo, o que tem despertado um maior interesse por parte dos produtores. Além disso, a produção do feijão-caupi é reconhecida pela sua alta qualidade, o que resulta em uma boa aceitação por parte de comerciantes, agroindústrias, distribuidores e consumidores. A disponibilidade consistente de um produto padronizado, em grande quantidade e com regularidade tem despertado o interesse de agroindústrias de outras regiões, o que tem contribuído para a abertura de novos mercados para essa cultura. Como resultado, há também um interesse crescente por parte de empresas de exportação, com exportações já realizadas para seis países e muitos outros interessados em importar feijão-caupi do Brasil.[6]

A produção de feijão-caupi se concentra principalmente nas regiões Nordeste e Norte e está em expansão para a região Centro-Oeste, especialmente no estado de Mato Grosso. No Nordeste, a produção é tradicionalmente concentrada em áreas semiáridas, onde outras leguminosas anuais têm dificuldades de desenvolvimento devido à irregularidade das chuvas e às altas temperaturas. A produção de feijão-caupi nessas regiões é realizada tanto por empresários quanto por agricultores familiares que ainda adotam práticas tradicionais. Já na região Centro-Oeste, onde o cultivo em larga escala do feijão-caupi teve início em 2006, a produção é predominantemente realizada por médios e grandes empresários que utilizam técnicas altamente tecnificadas.[6]

O feijão-caupi pertence à família *Fabaceae* (ou *Leguminosae*), o que indica sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) [7]. As plantas de feijão-caupi podem estabelecer relações com bactérias fixadoras de N em um processo chamado fixação biológica de nitrogênio (FBN), ou seja, fixação simbiótica de  $N_2$ . Nesse processo, as bactérias que habitam as raízes das plantas formam nódulos dentro das raízes, e esses nódulos podem fixar o N atmosférico (convertendo o  $N_2$  para a forma utilizável  $NH_3$  por meio do complexo enzimático nitrogenase), que é utilizado pela planta em troca de carboidratos [8,9]. No entanto, a eficiência da atividade de fixação de N da associação simbiótica entre plantas e bactérias varia entre espécies de leguminosas e combinações leguminosa-simbionte, e o feijão-caupi é frequentemente caracterizado como um fixador de N mais fraco em comparação com outras culturas de leguminosas [10-14]. Estima-se que a quantidade de N fixado em diferentes espécies de feijão, incluindo o feijão-caupi, seja baixa, variando entre 25 e 70 kg  $N_2$  fixado  $ha^{-1}$  [7,12,13,15], o que representa uma contribuição entre 50 e 80% de sua necessidade de N [16,17]. Esses valores são consideravelmente menores do que a quantidade de N fixado na soja (*Glycine max* (L.) Merrill), que pode variar de 80 a mais de 300 kg N fixado  $ha^{-1}$  [18-23]. O feijão-caupi pode demandar até 100 kg N  $ha^{-1}$  por safra [24], portanto, a aplicação de N pode ser necessária para atender à demanda da cultura, dependendo das condições ambientais e das expectativas de rendimento. O processo de adição de fertilizantes é conhecido por levar a uma regulação descendente da FBN. As plantas não conseguem absorver todo o N aplicado, o que leva a uma eficiência de uso de N, também cognominada de aproveitamento ou recuperação prejudicada, além de preocupações ambientais crescentes. Além disso, a FBN é um processo vulnerável à

seca, uma condição ambiental comum na agricultura tropical, e diminui mesmo antes de ocorrer uma redução significativa nas doses de transpiração e fotossíntese [13].

Nesse sentido, a coinoculação com rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) pode fornecer ao feijão-caupi várias características que promovem o crescimento, melhorando assim o crescimento das plantas, aumentando a eficiência de uso de N e potencialmente aumentando a FBN [25–31]. A coinoculação pode ser definida como a combinação de pelo menos dois microrganismos que contribuem para diversos processos microbianos, melhorando o crescimento e desenvolvimento das plantas [23]. Um estudo recente de meta-análise com 42 artigos publicados concluiu que a tecnologia de coinoculação com as BPCVs mais aplicadas (*Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Serratia* spp.) resultou em um aumento significativo na biomassa das partes aéreas (7%), raízes (13%) e nódulos (6%) [32]. A coinoculação com *Bacillus* sp. e *Bradyrhizobium* sp. foi relatada como um meio de melhorar a nodulação e a eficiência da fixação de N<sub>2</sub>, produzindo nódulos maiores [33], o que resultou em um melhor rendimento das plantas [34]. Embora várias BPCVs tenham sido avaliadas quanto ao seu potencial para serem usadas em coinoculação com *Bradyrhizobium* sp. em diferentes culturas de leguminosas, o *Azospirillum brasilense* se destacou [23,35–37].

As rizobactérias de vida livre (gênero *Azospirillum*) têm a capacidade de colonizar mais de cem espécies de plantas em praticamente todos os solos vivos do planeta, proporcionando condições que melhoram o crescimento, desenvolvimento e produção das culturas [27,38,39]. As linhagens Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* são oficialmente autorizadas pelo governo brasileiro para a produção de inoculantes com o objetivo de aumentar a produtividade de trigo e milho em condições de campo [25,39]. Foi relatado que as linhagens de *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6) possuem genes fix e nif semelhantes que contribuem para a FBN [26]. Apesar disso, essas linhagens têm capacidade diferente de produção de fitohormônios [27], mas ainda compartilham genes semelhantes para a síntese de auxinas. Até o momento, a hipótese aditiva melhor explica o princípio de funcionamento do *A. brasilense*, em que múltiplos mecanismos de promoção do crescimento vegetal atuam em convergência ou sequência [31,40,41]. Por exemplo, foi relatado que *A. brasilense* promove o crescimento das plantas aumentando a produção de fito hormônios, como giberelinas, auxinas e citocininas [27]; aumentando o desenvolvimento das raízes, levando a uma maior absorção de nutrientes

e água [42]; melhorando a FBN [42]; aumentando a eficiência de uso de N proveniente de fertilizantes aplicados [29,30]; solubilizando fosfatos [44], entre outros.

Assim, estabeleceu-se a hipótese de que a coinoculação de *Bradyrhizobium* sp. e *A. brasilense* no feijão-caupi pode aumentar o acúmulo de N, resultando em uma redução na quantidade de fertilizante nitrogenado mineral necessária para uma produtividade satisfatória. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar os benefícios potenciais e os mecanismos de ação da coinoculação de *Bradyrhizobium* sp. + *A. brasilense* em combinação com doses de N -fertilizante no feijão-caupi. O estudo se concentra no potencial de aumento da absorção de N e nos parâmetros relacionados ao crescimento das plantas em condições de campo devido à coinoculação. O principal objetivo foi determinar se essa prática reduzirá a quantidade de fertilizantes à base de N necessários para a produtividade ideal do feijão-caupi. Para atingir esse objetivo, utilizou-se a técnica de isótopos estáveis para avaliar a recuperação pela planta da N derivada do fertilizante, com uso de N<sup>15</sup> -uréia, além de a fração de N proveniente do solo (N nativo) e nas plantas, visando reduzir o uso de fertilizantes minerais de nitrogenados nos sistemas de produção de feijão-caupi.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE CULTIVO NO CAMPO

O experimento foi realizado na Estação Experimental da Universidade Estadual Paulista ( $-20^{\circ}22'$ ;  $-51^{\circ}22'$ , e 335 m de altitude) no município de Selvíria (estado do Mato Grosso do Sul, Brasil) durante a safra 2017/2018, com cultivo de feijão-caupi (novembro a fevereiro). Nos últimos 30 anos, a área onde o experimento foi realizado havia sido cultivado anteriormente com culturas anuais de cereais e leguminosas. Além disso, nos últimos 15 anos não foi realizado nenhum tipo de preparo do solo na área, com cultivos sob sistema plantio direto. Antes do feijão-caupi, a área foi cultivada com milho (*Zea mays* L.).

A classificação climática é do tipo Aw de acordo com a classificação Köppen-Geiger, clima tropical com inverno seco. As médias históricas das temperaturas máximas e mínimas anuais (nos últimos 20 anos) foram de 32,4 e 20,8 °C, respectivamente, e a média da precipitação sazonal (novembro a fevereiro) foi de 833,1 mm. As medições diárias de precipitação e temperatura durante o experimento foram registradas de acordo com uma estação meteorológica localizada na Estação Experimental (temperaturas máximas e mínimas de 32,8 e 21,2 °C, respectivamente, e precipitação sazonal de 835,9 mm - Figura Suplementar S1). Portanto, o ensaio de campo foi conduzido sob condições climáticas típicas da região geográfica deste estudo. Os dados climáticos podem ser acessados no "Canal Clima da UNESP Ilha Solteira". Disponível online: <https://clima.feis.unesp.br/> (acessado em 12 de junho de 2022).

O solo foi classificado como Latossolo Vermelho distrófico ou Rhodic Haplustox [78], com 470 de areia, 90 de silte e 440 g kg<sup>-1</sup> de argila. A metodologia descrita por van Raij et al. [79] foi utilizada para determinar os atributos químicos da camada de solo de 0-0,20 m, que estão apresentados na Tabela 1. O nitrogênio (N total) foi determinado pelo método Semimicro Kjeldahl [80] (Tabela 1). As populações de bradirizóbios no solo também foram estimadas na camada de 0-0,20 m através da técnica de número mais provável (NMP) [81] (Tabela 1).

**Tabela 1.** Atributos químicos do solo e populações de bradirrízobios no solo na camada de 0-0,20 m antes do início do experimento.

Soil Chemical Attributes	0-0.20 m Layer
Total N	1.04 g kg <sup>-1</sup>
P (resin)	39.0 mg kg <sup>-1</sup>
S (SO <sub>4</sub> )	30.0 mg kg <sup>-1</sup>
Organic matter	21.0 g kg <sup>-1</sup>
pH (CaCl <sub>2</sub> )	5.1
K	2.3 mmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>
Ca	31.0 mmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>
Mg	33.0 mmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>
H + Al	34.0 mmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>
Al	0.0 mmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>
B (hot water)	0.23 mg kg <sup>-1</sup>
Cu (DTPA)	3.7 mg kg <sup>-1</sup>
Fe (DTPA)	25.0 mg kg <sup>-1</sup>
Mn (DTPA)	30.1 mg kg <sup>-1</sup>
Zn (DTPA)	1.7 mg kg <sup>-1</sup>
Cation exchange capacity (pH 7.0)	100.3 mmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>
Base saturation (%)	66
Bradyrhizobia populations in soil	3.5 × 10 <sup>4</sup> cells g <sup>-1</sup> soil

Number of repetitions (n) = 20, DTPA = diethylenetriaminepentaacetic acid.

## 2.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS

Os tratamentos experimentais testados incluíram duas inoculações e quatro doses de N na forma de uréia, dispostos em um delineamento de blocos completos casualizados em um arranjo fatorial 2 × 4, com quatro repetições. A parcela experimental foi composta por seis fileiras com 0,45 m de largura e 5 m de comprimento. A área útil consistiu nas quatro fileiras centrais, excluindo 1 m no final de cada fileira de caupi.

Os dois níveis de inoculação das sementes foram: (i) inoculação única com as linhagens SEMIA 6462 e SEMIA 6463 de *Bradyrhizobium* sp. (garantia de 5 × 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colônias [UFC] por mL) (inoculação padrão para caupi) e (ii) coinoculação com as linhagens Ab-V5 e Ab-V6 de *Bradyrhizobium* sp. e *A. brasilense* (garantia de 2 × 10<sup>8</sup> UFC por mL). As linhagens de *Bradyrhizobium* sp. e *A. brasilense* foram depositadas na "Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas da Embrapa Soja" (Coleção WFCC n° 1213, Coleção WDCM n° 1054) na cidade de Londrina (estado do Paraná, Brasil). As descrições específicas das

linhagens mencionadas estão disponíveis em estudos anteriores [25,39,82]. As inoculações foram realizadas misturando-se manualmente o inoculante com as sementes de caupi no momento da semeadura. A dose de inoculação utilizada foi de 200 mL de inoculante líquido por hectare. Amostras de solo da rizosfera foram coletadas aleatoriamente para analisar a colonização por *Azospirillum* sp. e as populações de bradirizóbios durante o florescimento do caupi. A população de bradirizóbios no solo foi determinada por contagem do número mais provável (NMP), com um método de diluição em série e infecção das plantas [83,84]. A população de *Azospirillum* sp. também foi determinada pelo método do NMP, consistindo em diluições em série e inoculações realizadas em frascos contendo meio NFb semissólido na ausência de adição de N, seguido de incubação por 48 h a 35 °C [85] (Tabela Suplementar S1).

As doses de N na forma de uréia foram: (i) controle (0 kg ha<sup>-1</sup>); (ii) baixa (20 kg ha<sup>-1</sup>); (iii) média (40 kg ha<sup>-1</sup>); e (iv) alta (80 kg ha<sup>-1</sup>) de suprimento de N, com base em estudos anteriores que recomendaram a adubação nitrogenada para o feijão-caupi [10,12,86]. A fonte de N utilizada foi uma ureia-N<sup>15</sup> isótopo (45% de N) com um enriquecimento isotópico de 10% de excesso de átomo N<sup>15</sup>, para todas as doses. Os tratamentos de referente às doses foram aplicados manualmente, sem incorporação, 10 dias após a emergência do feijão-caupi (DAE). A aplicação da ureia-N<sup>15</sup> isótopo foi realizada em microparcels compostas por três fileiras de feijão-caupi, em uma área de 1,0 m<sup>2</sup> (0,74 m de comprimento espaçados por 0,45 m: 0,74 m × 1,35 m = 1,0 m<sup>2</sup>). Essas microparcels foram cuidadosamente delimitadas com bandeiras de fibra de vidro e fita de demarcação. Para mitigar a perda de N-NH<sub>3</sub> por volatilização, foi realizada uma irrigação (14 mm de água) na área experimental algumas horas após a aplicação de N.

### 2.3. MANEJO DA CULTURA DO FEIJÃO-CAUPI

Ao cultivar de feijão-caupi "BRS Tumucumaque" foi semeada com uma densidade de 26,7 sementes viáveis m<sup>2</sup> utilizando uma semeadora de plantio direto. De acordo com as características químicas do solo e os requisitos do feijão-caupi [87], durante a semeadura, foi realizada a aplicação de fertilização basal para todos os tratamentos com 40 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup> e 40 kg K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup> (superfosfato triplo, 46% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>;

cloreto de potássio, 60% de  $K_2O$ ). Nenhuma aplicação de N foi realizada na fertilização de semeadura. Além disso, as doses de N foram aplicadas manualmente apenas aos 10 DAE. As plantas daninhas foram controladas usando herbicidas pré e pós-emergentes, e os insetos foram controlados usando as melhores práticas de manejo no feijão-caupi. O feijão-caupi foi cultivado de 10 de novembro de 2017 a 30 de janeiro de 2018 (colhido com 76 DAE).

## **2.4. AMOSTRAGEM, MEDIÇÕES E ANÁLISES**

### **2.4.1. Coleta de folhas, raízes, nódulos e solo**

Foram coletadas 40 folhas trifoliadas durante a floração (estágio fenológico R1) do terço superior das plantas de feijão-caupi (folha diagnóstica) para análise foliar (frações de N, proteínas solúveis e pigmentos fotossintéticos). No total, 20 folhas trifoliadas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  em um ultracongelador para análise de ureídos e proteínas solúveis. No total, 10 folhas trifoliadas foram armazenadas em acetona a 80% para a extração de clorofila A + B. As outras 10 folhas trifoliadas foram secas em estufa com circulação de ar a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 90 horas, peneiradas (2 mm) e guardadas para determinação de N total e inorgânico ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ). Ao mesmo tempo (estágio fenológico R1), uma trincheira lateral com aproximadamente 0,50 m de profundidade  $\times$  1,0 m de comprimento foi escavada cuidadosamente para coleta de raízes e nódulos, totalizando 10 plantas coletadas (equivalente a 1 m  $\times$  0,45 m - espaço entre fileiras de feijão-caupi, excluindo a primeira e a última planta), e em seguida, foram rapidamente lavadas com água deionizada para remover o excesso de solo. Cinco raízes com nódulos foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  em um ultracongelador para análise de ureídos e proteínas solúveis. As outras cinco raízes com nódulos coletadas foram secas em estufa com circulação de ar a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 90 horas, e a biomassa de raízes e nódulos foi determinada usando uma balança de alta precisão (precisão de 0,01 g). Após a pesagem da biomassa de raízes e nódulos, essas amostras foram peneiradas (2 mm) e armazenadas para a determinação de N inorgânico. Foram coletadas dez amostras de solo por parcela, nas profundidades de 0,00 a 0,20 m, com um amostrador tipo trado holandês, com 0,40 m de comprimento e 0,10 m de diâmetro, quando o feijão-caupi estava no estágio R1. Essas amostras foram então misturadas, e duas subamostras foram

obtidas. Uma subamostra foi seca ao ar, peneirada (2 mm) e armazenada em temperatura ambiente (cerca de 25 °C) [79] até a análise do teor de N total. A outra subamostra foi armazenada em uma câmara fria abaixo de 4 °C até que fossem analisados os teores de  $\text{N-NO}_3^-$  e  $\text{N-NH}_4^+$ .

#### **2.4.1. Frações de nitrogênio nos tecidos vegetais e análise de proteínas solúveis**

A concentração total de N no solo foi determinada seguindo os métodos de Malavolta et al. (1997), com digestão sulfúrica e método de análise de Kjeldahl semimicro. Os nitratos e amônio ( $\text{N-NO}_3^-$  e  $\text{N-NH}_4^+$ ) no solo foram determinados seguindo os métodos de Cantarella e Trivelin [88]. Resumidamente, 10 g de solo foram extraídos com 1 mol de  $\text{KCl L}^{-1}$  (1:15 p/v), destilados com MgO ( $\text{N-NH}_4^+$ ) e liga de Devarda, e titulados com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2,5 mM ( $\text{N-NO}_3^-$ ).

As mesmas metodologias acima mencionadas de Malavolta et al. [89] e Cantarella e Trivelin [88] foram utilizadas para determinar a concentração total de N e  $\text{N-NO}_3^-$  e  $\text{N-NH}_4^+$  nos tecidos vegetais (digestão sulfúrica e método de análise de Kjeldahl semimicro). Aqui, utilizamos 1 g de tecido vegetal que foi extraído com 1 mol de  $\text{KCl L}^{-1}$  (1:15 p/v) em frascos de Erlenmeyer selados e agitados por 1 hora em um agitador de mesa (200 rpm). Após a agitação, os frascos foram deixados em repouso por alguns minutos, em seguida as amostras foram filtradas, destiladas com MgO calcinado e liga de Devarda ( $\text{N-NO}_3^-$ ) e tituladas com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2,5 mM.

A determinação dos ureídeos foi realizada pesando folhas + caules e 1 g de raízes + nódulos, previamente armazenados em 10 mL de solução de 60% metanol, 25% clorofórmio e 15% água. Essa solução foi preparada seguindo os métodos descritos por Bielek e Turner [90]. Os extratos das amostras foram centrifugados por 10 min a 4 °C e 10.000 rpm, e 5 mL do sobrenadante do extrato, 1,25 mL de clorofórmio e 1,875 mL de água foram misturados em um tubo limpo. O material foi armazenado por 48 horas até a separação de fases, e os ureídeos foram analisados utilizando os extratos preparados. A análise do ácido alantóico e alantoína, que correspondem aos ureídeos totais, foram utilizados como indicadores de fixação biológica de nitrogênio (FBN) e quantificados de acordo com Vogels e Van der Drift [91]. Uma alíquota de 250  $\mu\text{L}$  da porção hidrofílica do extrato MCW foi adicionada a 20  $\mu\text{L}$  de fenilhidrazina (0,33%) e 250  $\mu\text{L}$  de NaOH (0,5 M). As amostras foram então agitadas e aquecidas em estufa a 100 °C

por 8 minutos. Em seguida, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente, momento em que 250  $\mu$ L de HCl (0,65 N) foram adicionados, e o material foi agitado e aquecido em estufa a 100 °C por mais 4 minutos. Após este segundo aquecimento, a mistura foi deixada em temperatura ambiente e adicionou-se 250  $\mu$ L de tampão fosfato (0,4 M; pH 7,0) + 250  $\mu$ L de fenilhidrazina (0,33%). As amostras foram agitadas novamente, deixadas em repouso em temperatura ambiente por 5 minutos e resfriadas em gelo por mais 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,25 mL de HCl (37%) + 250  $\mu$ L de ferrocianeto de potássio (1,65%). Após esta última etapa, a mistura foi agitada e analisada em um espectrofotômetro utilizando a absorvância a 535 nm em temperatura ambiente.

A extração e avaliação de proteínas solúveis foram realizadas de acordo com Bradford [92], adicionando-se 5 mL de tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,5 + 3 mM de ditioneitol + 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético) nas amostras, após o que o material foi centrifugado por 30 minutos a 4 °C e 10.000 rpm. O sobrenadante fornecido pelo extrato foi armazenado a -80 °C em um freezer. As amostras foram analisadas coletando leituras de absorvância a 595 nm usando um espectrofotômetro. Os valores de proteína foram determinados de acordo com uma curva de calibração de albumina sérica bovina.

#### **2.4.2. Análise do pigmento de clorofila**

A concentração de pigmentos clorofila A + B foi determinada de acordo com Lichtenthaler [93]. O material vegetal foi coletado fresco e armazenado em acetona 80%. Para a análise, 200  $\mu$ L do extrato foram diluídos em 1,8 mL de acetona 80% e centrifugados. A análise foi realizada em absorvância nos comprimentos de onda de 647 e 663 nm.

#### **2.4.3. Biomassa aérea e produtividade de grãos de feijão-caupi**

No momento da colheita (76 DAE - maturidade fisiológica do feijão-caupi), a biomassa da parte aérea foi determinada colhendo-se 12 plantas em 0,45 m<sup>2</sup> (1,0 m  $\times$  0,45 m - espaço entre fileiras do feijão-caupi) ao nível do solo. O material vegetal foi seco em estufa (60 °C) por 90 horas em uma estufa de circulação forçada de ar. Em

seguida, as amostras foram pesadas e a biomassa da parte aérea ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) foi determinada. A produtividade de grãos de feijão-caupi foi determinado colhendo-se as vagens nas quatro fileiras centrais, cada uma com 5 metros de comprimento. Após a colheita, a massa seca dos grãos foi determinada, ajustada para 13% de umidade (base úmida) e extrapolada para  $\text{kg ha}^{-1}$ .

#### **2.4.4. Acúmulo total de nitrogênio e recuperação de fertilizante $\text{N}^{15}$ na parte aérea e grãos do feijão-caupi**

Consideramos como parte aérea: folhas, caule e vagens sem grãos; e grãos: apenas os grãos de feijão-caupi. No momento da colheita, foram amostradas quatro plantas de feijão-caupi da linha central das microparcelas. As subamostras separadas (partes aéreas e grãos) foram secas em estufa a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 90 horas, moídas (peneira de 2 mm) e pesadas. A concentração de nitrogênio e a abundância de  $\text{N}^{15}$  (% em átomos) foram determinadas de acordo com Barrie e Prosser [94], utilizando um espectrômetro de massa acoplado a um analisador elemental para N (Espectrometria de Massa de Razão Isotópica (IRMS) - modelo HYDRA 20-20 ANCA-GLS, Sercon, Cheshire, Reino Unido). Conforme o padrão para análises de  $\text{N}^{15}$ , uma amostra de controle com variação natural do isótopo estável  $\text{N}^{15}$  (0,366%) foi utilizada a cada dez amostras analisadas. Para evitar a contaminação dos gases atmosféricos, as análises das amostras foram realizadas em condições de alto vácuo. Portanto, a abundância isotópica da ureia- $\text{N}^{15}$  aplicada e a variação natural do isótopo estável  $\text{N}^{15}$  (0,366%) foram consideradas no cálculo das recuperações. Além disso, plantas não enriquecidas foram amostradas para determinar a abundância de  $\text{N}^{15}$  de fundo nos solos fertilizados e não fertilizados, a fim de considerar possíveis pequenas variações nos valores padrão da abundância natural de  $\text{N}^{15}$  [95,96]. A sequência de procedimentos e equações também foi avaliada por Paulo et al. [71]. Assim, o nitrogênio acumulado nas partes aéreas e nos grãos foi obtido pelo produto da concentração total de N no tecido e da biomassa produzida.

A porcentagem de N na planta e/ou solo proveniente do fertilizante marcado com  $\text{N}^{15}$  (NPdff, %) foi calculada seguindo a Equação (1):

$$\text{NPdff} = \frac{a}{b} \times 100 \quad (1)$$

Onde: "a" representa a porcentagem de átomos de  $N^{15}$  em excesso na planta e/ou solo; "b" representa a porcentagem de átomos de  $N^{15}$  em excesso no fertilizante marcado com  $N^{15}$  [97]. A quantidade de N derivado do fertilizante (parte aérea, SNDF; e grãos, GNDF), em  $\text{kg ha}^{-1}$ , foi calculada considerando o NPDF e o N acumulado na parte aérea e nos grãos do feijão-caupi. A quantidade de N nas plantas derivado do solo e de outras fontes (por exemplo, FBN) na parte aérea e nos grãos do feijão-caupi (SNDFS e GNDFS,  $\text{kg ha}^{-1}$ ) foi calculada seguindo a Equação (2)

$$\text{NDFS} = \text{NA} - \text{NDF} \quad (2)$$

Onde NA representa o N acumulado na parte aérea e nos grãos do feijão-caupi (SNDFS e GNDFS, respectivamente) e NDF é a quantidade de N na parte aérea ou nos grãos derivada do fertilizante. A recuperação do fertilizante  $N^{15}$  na parte aérea e nos grãos (%) foi calculada seguindo a Equação (3):

$${}^{15}\text{N fertilizer recovery} = \frac{\text{NPDF} \times \text{N shoot or N grain}}{\text{N level}} \times 100 \quad (3)$$

Em que NPDF representa a porcentagem de N derivado do fertilizante; N parte aérea e N grãos representam a quantidade total de N na parte aérea e nos grãos do feijão-caupi, respectivamente; N dose representa a quantidade de uréia aplicada (isótopo  $N^{15}$ ) [98].

## 2.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

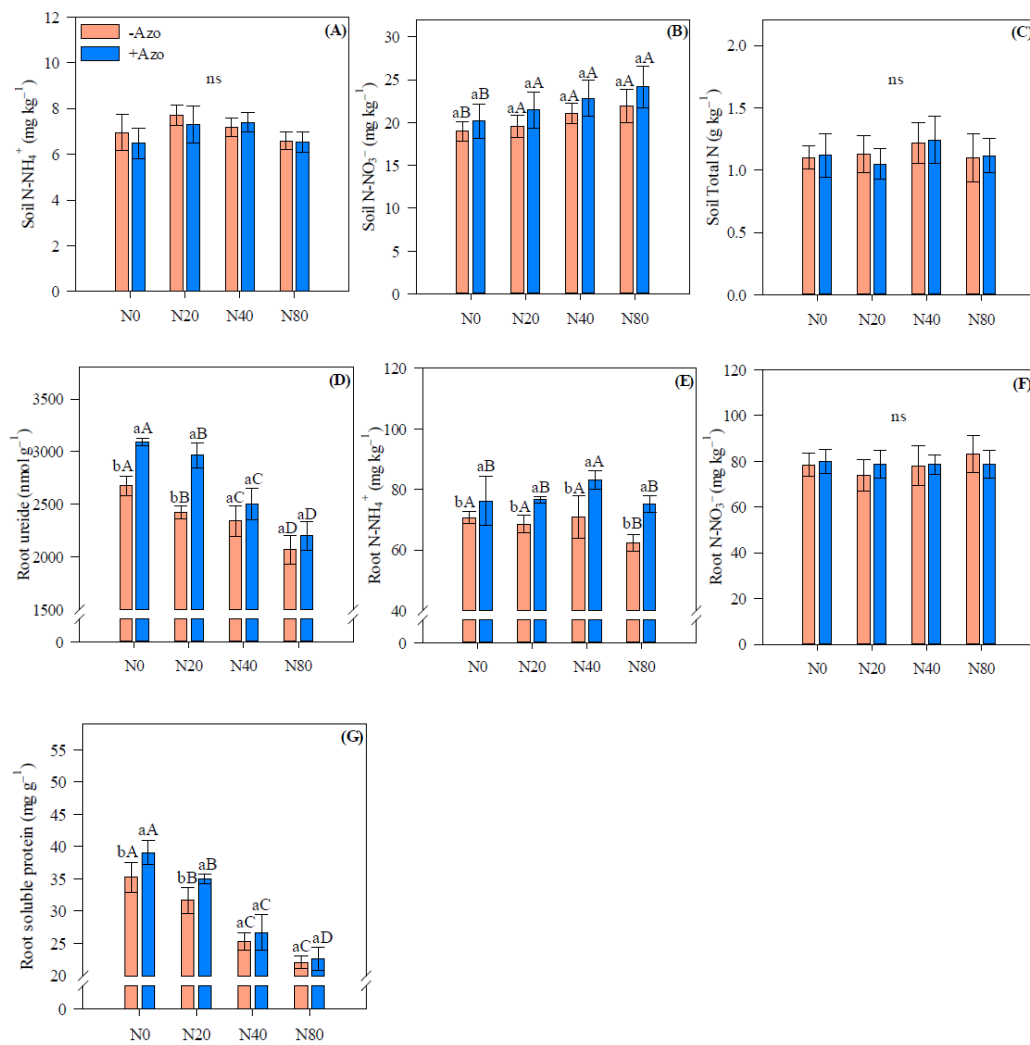
Todos os dados foram inicialmente testados quanto à homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene ( $p \leq 0,05$ ) e normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, que indicou que os dados estavam distribuídos de forma normal ( $W \geq 0,90$ ). Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F). Quando foi observado um efeito principal ou interação significativa pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), foi utilizado o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para comparação das médias das inoculações, doses de N proveniente de fertilizante e suas interações, utilizando o pacote ExpDes no software R [98].

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 FRAÇÕES DE NITROGÊNIO NO SOLO E NAS RAÍZES

Os teores de N inorgânico ( $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_3^-$ ) e N total no solo, bem como o  $\text{N-NO}_3^-$  nas raízes, não foram muito influenciados pela coinoculação de *A. brasilense* e pelas doses de aplicação de N, exceto pelo  $\text{N-NO}_3^-$  no solo, que foi maior com alta entrada de N ( $80 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) em relação ao controle (sem aplicação de N) tanto nos tratamentos coinoculados com *A. brasilense* quanto nos tratamentos inoculados apenas com *Bradyrhizobium* sp. (Figura 1A-C, F).

**Figura 1:** Concentrações de amônio do solo ( $\text{N-NH}_4^+$ ) (A), nitrato do solo ( $\text{N-NO}_3^-$ ) (B) e teor total de N (C), ureídeos das raízes (D),  $\text{N-NH}_4^+$  das raízes (E),  $\text{N-NO}_3^-$  das raízes (F) e proteína solúvel das raízes (G) no feijão-caupi afetadas por inoculações e doses de N.

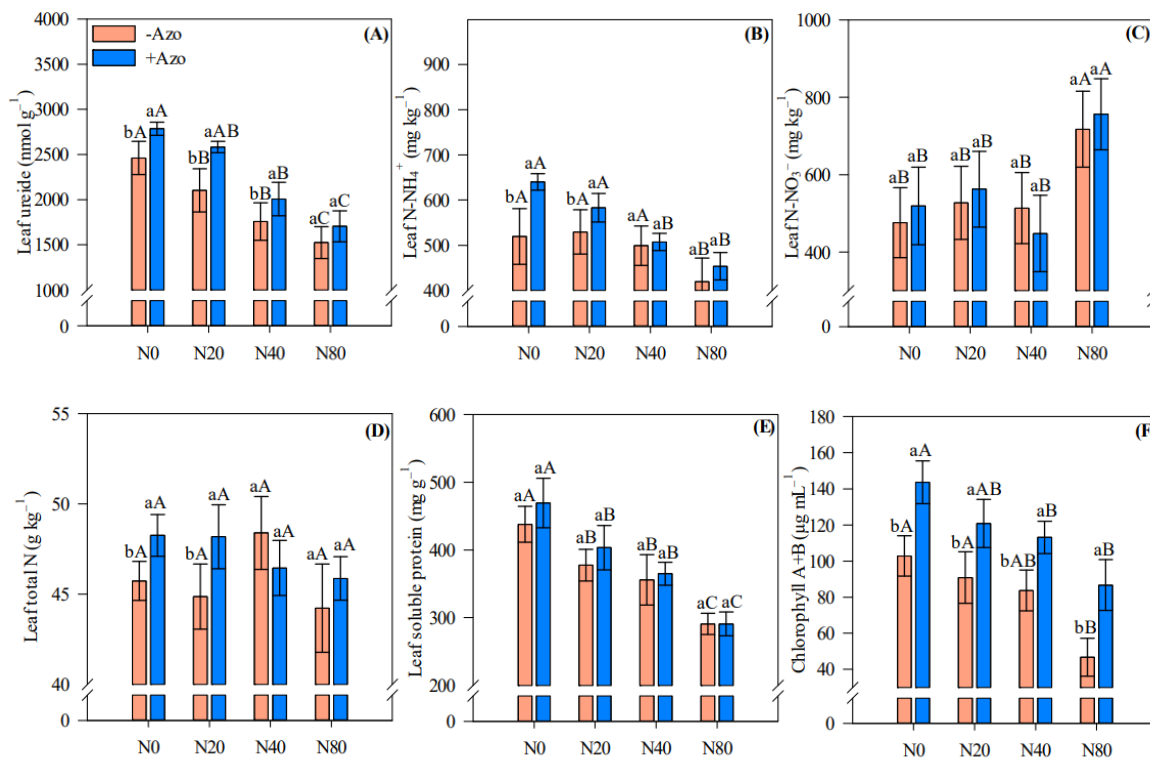


Na ausência de aplicação de N e com baixo fornecimento de N (20 kg N ha<sup>-1</sup>), a coinoculação de *A. brasilense* proporcionou maiores concentrações de ureídeos e proteínas nas raízes em comparação com a inoculação única de *Bradyrhizobium* sp. (Figura 1D, G). Para ambos os tratamentos de coinoculação e inoculação única de *Bradyrhizobium* sp., o aumento das doses de N tendeu a reduzir as concentrações de N das raízes e de proteínas solúveis (Figura 1D, G). Em relação à concentração de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nas raízes, a coinoculação de *A. brasilense* proporcionou maior teor de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em comparação com a inoculação única de *Bradyrhizobium* sp., independentemente da dose de N aplicada (Figura 1E). O teor de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nas raízes apresentou os maiores valores com uma entrada média de N (40 kg N ha<sup>-1</sup>) quando a coinoculação foi realizada, enquanto o teor de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nas raízes foi maior com uma entrada média de N (40 kg N ha<sup>-1</sup>) em comparação com alta dose de N na inoculação única de *Bradyrhizobium* sp. (Figura 1E).

### 3.2. FRAÇÕES DE NITROGÊNIO FOLIAR E PIGMENTOS DE CLOROFILA

As concentrações de ureídeos foliares, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N total e clorofila A + B foram influenciadas pela coinoculação de *A. brasilense* (Figura 2A, B, D, F). Na ausência de aplicação de N e sob baixas doses de N, a coinoculação de *A. brasilense* proporcionou maior concentração de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N total nas folhas em comparação com a inoculação única de *Bradyrhizobium* sp. (Figura 2B, D). Em relação à concentração de ureídeos foliares, nas condições de controle e baixa e média dose de N, a coinoculação de *A. brasilense* apresentou maior concentração de ureídeos em comparação com a inoculação única de *Bradyrhizobium* sp. (Figura 2A). A concentração de clorofila A + B foi maior com a coinoculação de *A. brasilense*, independentemente da dose de N aplicada (Figura 2F). As concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foliar e proteína solúvel não foram muito afetadas pela coinoculação das bactérias (Figura 2C, E).

**Figura 2.** Concentrações de ureídeos foliares (A), amônio ( $\text{N-NH}_4^+$ ) (B), nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ) (C), N total (D), proteína solúvel (E) e clorofila A + B (F) em feijão-caupi afetadas por inoculações e doses de N.



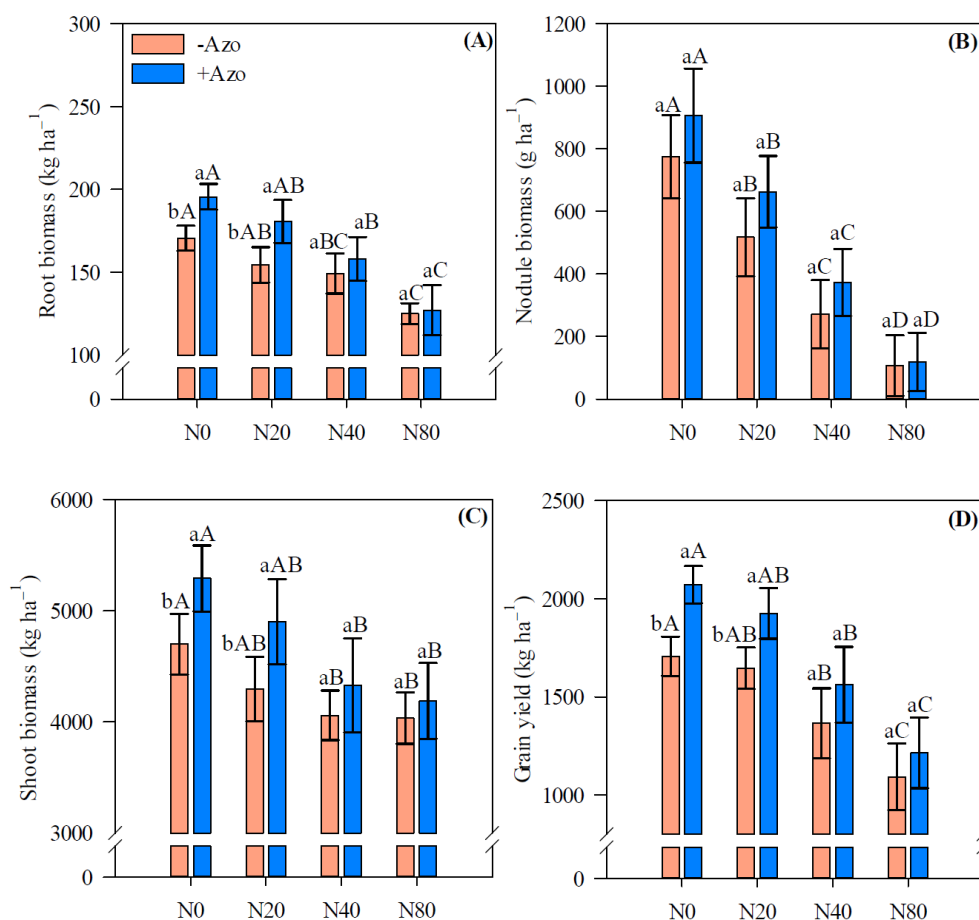
O aumento das doses de N diminuiu as concentrações de ureídeos foliares,  $\text{N-NH}_4^+$ , proteína solúvel e clorofila A + B (Figura 2A, B, E, F). A proteína solúvel diminuiu 33,6% na inoculação única de *Bradyrhizobium* sp. (de 438 para 291  $\text{mg g}^{-1}$ ) e 38,1% com a coinoculação de *A. brasilense* (de 469 para 291  $\text{mg g}^{-1}$ ) (Figura 2E). Em contraste, o  $\text{N-NO}_3^-$  foliar foi maior com alta dose de N em comparação com o controle e as doses de N baixa e média (Figura 2C), enquanto o N total foliar não foi influenciado pelas doses de N (Figura 2D).

### 3.3. PRODUTIVIDADES DE BIOMASSA E DE GRÃOS

As raízes, a biomassa da parte aérea e a produtividade de grãos responderam positivamente à coinoculação de *A. brasilense*, especialmente na ausência de N ou com

baixa dose de N (Figura 3A, C, D). Verificou-se aumento de 15%, 13% e 21% (raízes, biomassa da parte aérea e produtividade de grãos, respectivamente) nas parcelas coinoculadas em comparação com as parcelas inoculadas apenas com *Bradyrhizobium* sp. na ausência de aplicação de N (Raízes: -Azo = 171 vs. +Azo = 196 kg ha<sup>-1</sup>; Biomassa da parte aérea: -Azo = 4700 vs. +Azo = 5290 kg ha<sup>-1</sup>; Produtividade de grãos: -Azo = 1707 vs. +Azo = 2072 kg ha<sup>-1</sup>) (Figura 3A, C, D).

**Figura 3.** Biomassas de raízes (A), nódulos (B) e parte aérea (C) e produtividade de grãos de feijão-caupi (D) afetados por inoculações e doses de N.



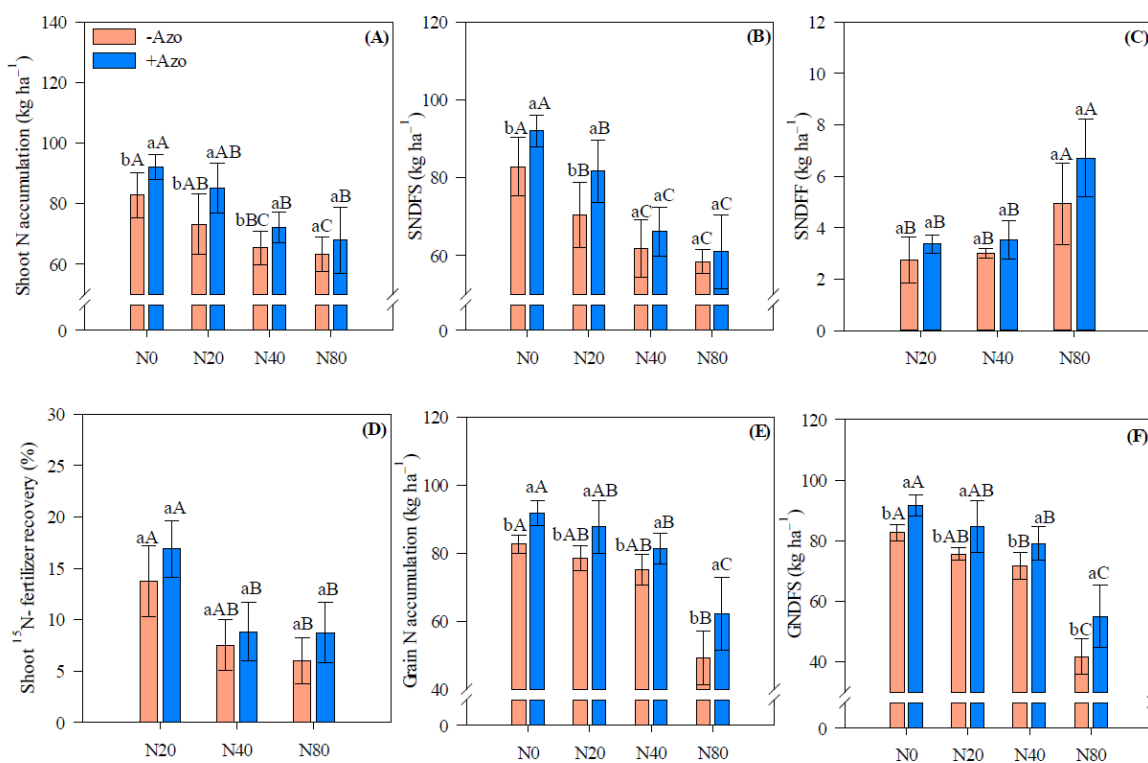
Com uma baixa dose de N, verificou-se aumento de 17%, 14% e 17% (raízes, biomassa da parte aérea e produtividade de grãos, respectivamente) nas parcelas coinoculadas em comparação com as parcelas inoculadas apenas com *Bradyrhizobium* sp. (Raízes: -Azo = 154 vs. +Azo = 181 kg ha<sup>-1</sup>; Biomassa da parte aérea: -Azo = 4297 vs. +Azo = 4902 kg ha<sup>-1</sup>; Produtividade de grãos: -Azo = 1647 vs. +Azo = 1925 kg ha<sup>-1</sup>) (Figura 3A, C, D).

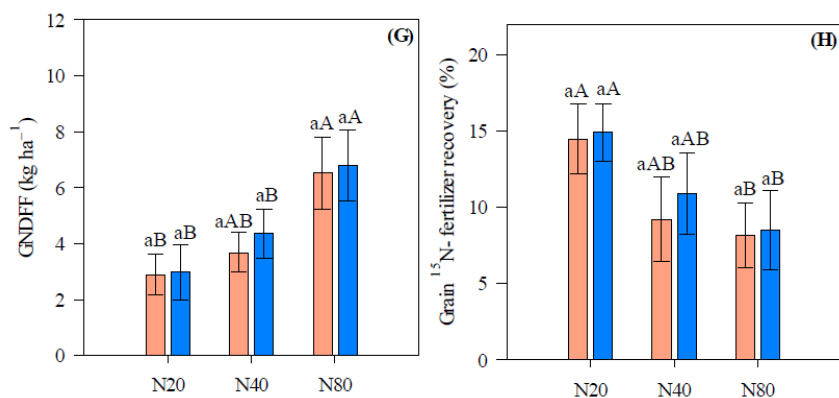
A biomassa de nódulos não foi significativamente influenciada pela coinoculação de *A. brasilense* (Figura 3B). Em geral, todos os componentes produtivos avaliados (biomassa de raízes, nódulos, parte aérea e produtividade de grãos) tenderam a reduzir com o aumento das doses de N (Figura 3).

### 3.4. ACÚMULO DE NITROGÊNIO NA PARTE AÉREA E RAIZ E RECUPERAÇÃO DO FERTILIZANTE N<sup>15</sup>

O acúmulo de N na parte aérea e a proporção de N proveniente do solo e de outras fontes (SNDFS) foram maiores quando ocorreu a coinoculação de *A. brasilense* em comparação com a inoculação única de *Bradyrhizobium* sp., tanto na ausência de aplicação de N (aumento de 11%) quanto com baixa dose de N (aumento de 16%) (Figura 4A,B). Além disso, o acúmulo de N na parte aérea foi 10% maior com a coinoculação de *A. brasilense* em conjunto com a dose média de N em relação à inoculação única de *Bradyrhizobium* sp. (Figura 4A).

**Figura 4.** Acúmulo de N no feijão-caupi (A), N proveniente do solo e de outras fontes (SNDFS) (B), N proveniente do fertilizante (SNDF) (C) e recuperação do fertilizante N<sup>15</sup> na parte aérea (D), acúmulo de N (E), N proveniente do solo e de outras fontes (GNDFS) (F), N proveniente do fertilizante (GNDF) (G) e recuperação do fertilizante N<sup>15</sup> (H) nos grãos afetados por inoculações e doses de N.





Da mesma forma, o acúmulo de N nos grãos e a proporção de N proveniente do solo e de outras fontes (GNDFS) foram maiores quando ocorreu a coinoculação de *A. brasilense* em comparação com a inoculação única de *Bradyrhizobium* sp., independentemente da dose de N aplicada (Figura 4E,F). Verificou-se aumento médio de 13 e 14% (N nos grãos e GNDFS, respectivamente) nos tratamentos coinoculados em comparação com os tratamentos inoculados apenas com *Bradyrhizobium* sp. (Figura 4E,F). O nitrogênio proveniente do fertilizante (SNDFFF e GNDFFF) e a recuperação do fertilizante N<sup>15</sup> tanto na parte aérea quanto nos grãos não foram amplamente influenciados pela coinoculação de *A. brasilense* (Figura 4C,D,G,H). O acúmulo de nitrogênio na parte aérea e nos grãos, SNDFS, GNDFS e recuperação do fertilizante N<sup>15</sup> tanto na parte aérea quanto nos grãos tenderam a diminuir com o aumento das doses de N (Figura 4A,B,D-F,H). Em contraste, SNDFFF e GNDFFF foram maiores com a dose alta de N em comparação com baixas e médias doses de N (Figura 4C,G).

#### 4. DISCUSSÃO

Com base nos resultados, a coinoculação de *A. brasilense* com *Bradyrhizobium* sp. pode ser considerada uma prática de manejo mais eficaz para aumentar a absorção de N pela cultura do feijão-caupi, o metabolismo do N e a produtividade de grãos em comparação com a inoculação única de *Bradyrhizobium* sp. Observou-se aumentos na absorção de N pelo feijão-caupi, no metabolismo do N e na produtividade de grãos em plantas coinoculadas. Além disso, o aumento no teor de N nas raízes (principalmente como ureídeos e  $\text{N-NH}_4^+$ ) e o acúmulo de biomassa radicular observados em parcelas coinoculadas podem ser os principais mecanismos para o aumento das proteínas solúveis nas raízes e folhas, bem como para o melhor crescimento e produtividade do feijão-caupi.

A avaliação do sistema radicular tem sido o foco de diversos estudos de coinoculação com *A. brasilense* em diferentes culturas de leguminosas. A maioria desses estudos relataram aumento no crescimento dos pelos radiculares e das raízes laterais [23,45,46]. Curiosamente, embora a biomassa dos nódulos não tenha sido afetada pela coinoculação, verificou-se um aumento numérico de 17% na biomassa dos nódulos quando a coinoculação de *A. brasilense* foi realizada (476 vs. 557 g ha<sup>-1</sup> quando inoculadas apenas com *Bradyrhizobium* e coinoculadas, respectivamente). Vale ressaltar que a falta de significância pode ser devido à alta variabilidade dessa variável; no entanto, há alguma evidência de um aumento numérico na nodulação (biomassa dos nódulos).

As concentrações aumentadas de ureídeos e  $\text{N-NH}_4^+$  e as concentrações não afetadas de  $\text{N-NO}_3^-$  sugerem que a fixação biológica de nitrogênio (FBN) foi aprimorada pela coinoculação de *A. brasilense*. Ureídeos e  $\text{N-NH}_4^+$  são as principais formas de nitrogênio transportadas pelo xilema após a FBN simbiótica (ureídeos) e associativa ( $\text{N-NH}_4^+$ ) [47,48]. Além disso, a análise isotópica demonstrou que a coinoculação proporcionou maior acúmulo de nitrogênio na parte aérea e nos grãos, especificamente provenientes do solo e de outras fontes (destacando a FBN), e não teve efeito na recuperação do fertilizante  $\text{N}^{15}$ . Embora não tenhamos avaliado especificamente o nitrogênio derivado da atmosfera (Ndfa), foi relatado que entre 50 e 90% da captação total de nitrogênio em leguminosas anuais é proveniente da FBN

[9,16,17,49,50]. Em condições de estufa, Brito et al. [51] verificaram que aproximadamente 93% do nitrogênio acumulado no feijão-caupi provinha da fixação simbiótica, 1,2% da adubação nitrogenada (dose de N: 27 kg N ha<sup>-1</sup>) e 5,8% do solo (um solo típico tropical). A fixação biológica de nitrogênio é um processo que demanda alta energia da planta hospedeira para fornecer energia ao microssimbionte e esqueletos de carbono (C) para os processos de assimilação de nitrogênio [52,53]. O investimento energético na aquisição de nitrogênio via FBN é maior do que sua absorção do solo na forma de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> [13]. No entanto, de acordo com Kaschuk et al. [54], o aumento da taxa fotossintética em até 28% devido à simbiose (*Bradyrhizobium* sp.) pode compensar quaisquer perdas. Como o nitrogênio está envolvido na síntese de clorofila e Rubisco, a FBN também aumenta a eficiência fotossintética ao fornecer nitrogênio à planta hospedeira [13,52,53,55].

Embora tenha sido relatado que a fixação de N<sub>2</sub> contribui para o balanço de N das plantas, muitos estudos mostraram que a contribuição da fixação de N<sub>2</sub> pelo *Azospirillum* sp. nas plantas (um aumento médio de 12% no N total das plantas inoculadas) não é o principal papel do *Azospirillum* sp. na promoção do crescimento das plantas [31]. Mecanismos adicionais de promoção do crescimento das plantas foram propostos, como a produção e liberação de fitormônios (por exemplo, auxinas, citocininas e giberelinas) e óxido nítrico, sendo considerado o principal fator que afeta a arquitetura das raízes [23,27,31]. Um maior desenvolvimento das raízes pode melhorar a absorção de água e nutrientes do solo [56-58]. No entanto, um sistema radicular mais vigoroso apresenta uma maior rizodeposição de formas orgânicas de N e C, o que pode favorecer as interações tróficas e a biodiversidade na rizosfera, beneficiando as plantas de maneira geral [23,36]. Portanto, a hipótese aditiva é a que melhor aborda o princípio de funcionamento do *A. brasilense*, em que múltiplos mecanismos atuam em convergência ou em uma sequência determinada pelas interações planta-solo-meio ambiente-bactérias [31,40].

Os benefícios da coinoculação no desenvolvimento das raízes favoreceram o desenvolvimento da parte aérea do feijão-caupi, provavelmente devido à maior acumulação de N observada. Um maior suprimento de N pode aumentar o aparato fotossintético, aumentando o teor de clorofila, a quantidade e atividade de enzimas de carboxilação, proteínas totais, teor de açúcar, N total e metabólitos relacionados à

fotossíntese [59,60]. A clorofila é o principal pigmento fotossintético no ciclo de Calvin [61,62]. O aumento do teor de clorofila leva a uma maior absorção de energia luminosa e capacidade de utilização da luz pelas plantas, resultando em uma maior capacidade de assimilação de CO<sub>2</sub> fotossintético nas folhas e maior rendimento quântico fotossintético [59,60,61]. Portanto, o aumento verificado nos teores de clorofila A + B e proteínas solúveis nas folhas indica que provavelmente ocorreu um aumento na assimilação de CO<sub>2</sub> fotossintético, levando a um maior crescimento da parte aérea e rendimento de grãos. Resultados semelhantes foram relatados em outros estudos quando a coinoculação (*Bradyrhizobium* sp. + *A. brasilense* e *Rhizobium* sp. + *A. brasilense*) foi encontrada para melhorar o rendimento da soja, feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e feijão-caupi entre 3% e 25% em comparação com a inoculação única (*Bradyrhizobium* sp. ou *Rhizobium* sp.) [23,35-37,64,65]. Garcia et al. [66] verificaram um aumento médio de 14,7% na produtividade de grãos de soja e 16,4% no N total acumulado nos grãos com a coinoculação de *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *A. brasilense* em comparação com a inoculação única de *Bradyrhizobium*. Além disso, de acordo com esses autores, o desempenho da coinoculação foi semelhante ou maior do que o do controle não inoculado que recebeu uma alta dose de uréia (200 kg N ha<sup>-1</sup>).

Além disso, os resultados indicaram claramente que a aplicação de fertilizantes de N influenciou de forma semelhante tanto os tratamentos de inoculação única quanto a coinoculação com *A. brasilense*. No presente estudo, a aplicação de fertilizantes de N acima de 20 kg N ha<sup>-1</sup> (40 e 80 kg N ha<sup>-1</sup>) reduziu a absorção de N pelo feijão-caupi e seu crescimento, principalmente pelo comprometimento da fixação biológica de N verificado por uma diminuição nas concentrações de ureídeos e N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> na parte aérea e raiz, e NDFS na parte aérea e grãos, resultando em uma redução na concentração de proteínas solúveis nos tecidos vegetais. O efeito inibitório da aplicação de fertilizantes de N na fixação biológica de N tem sido amplamente relatado na maioria das culturas leguminosas [22,67]. Por exemplo, um estudo de meta-análise realizado por Santachiara et al. [68] relatou que a adição de N pode reduzir a eficiência de fixação biológica de N na soja em cerca de 57% (70% em condições de estufa e 44% em condições de campo). A magnitude do efeito depende da dose de fertilizante nitrogenado [69]. Em altas doses de fertilização de N e exposição prolongada [67] a nitratos (mais de três dias), o efeito inibitório é grande e possivelmente associado a um aumento na resistência à difusão de O<sub>2</sub> dentro do bacteroide [70]. Embora a ureia seja uma fonte de N amídica, após a

hidrólise inicial de  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ , ocorre naturalmente a oxidação de  $\text{N-NH}_4^+$  a  $\text{N-NO}_3^-$ , que é um processo central fundamental no ciclo global de N biogeoquímico [71]. Também existe uma complexa sinalização hormonal entre raízes e *Bradyrhizobium* sp. para controlar todas essas regulamentações específicas [72]. Um estudo recente de meta-análise com 60 artigos publicados sobre inoculação de *A. brasilense* na cultura do milho (cepas Ab-V5 e Ab-V6) concluiu que as respostas de rendimento tendem a aumentar mais em doses de N mais baixas ( $\leq 50 \text{ kg ha}^{-1}$ , +8%) do que em doses mais altas ( $> 200 \text{ kg ha}^{-1}$ , +3,8%), indicando que essas cepas não são incompatíveis com fertilizantes de N, embora altas doses de N mineral acabem impactando negativamente a produtividade da cultura [73]. Nesse sentido, estudos adicionais sobre a aplicação de fertilizantes de N associada à coinoculação de PGPB em diferentes sistemas agrícolas devem ser realizados para que se possa desenvolver uma compreensão mais aprofundada.

Estudos anteriores realizados em condições semelhantes (solos tropicais) comparando (i) tratamentos não inoculados com aplicação de fertilizante nitrogenado ( $50$  a  $100 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) e (ii) inoculação de *Bradyrhizobium* sp. sem fertilização N em feijão-caupi proporcionaram resultados semelhantes no crescimento e na produtividade das plantas [12,74,75]. Por exemplo, Martins et al. [12] concluíram que o feijão-caupi inoculado com as linhagens SEMIA 6462 apresentou produtividade de grãos similar ao das plantas que receberam  $50 \text{ kg N ha}^{-1}$ . Já Soares et al. [74] constataram que a adubação do caupi com  $70 \text{ kg N ha}^{-1}$  proporcionou uma biomassa de parte aérea, acúmulo de N na parte aérea e produtividade de grãos semelhantes à inoculação com SEMIA 6463. No entanto, segundo esses autores, a adubação com N reduziu a massa seca e o número de nódulos. Resultados semelhantes foram observados por Ulzen et al. [75], que verificaram redução da massa seca, do número de nódulos, da biomassa de parte aérea e da produtividade de grãos similares com a aplicação de  $100 \text{ kg N ha}^{-1}$  ou inoculação única com as linhagens SEMIA 6462. Esses estudos sugerem que a adubação com N acima de  $50 \text{ kg N ha}^{-1}$  no feijão-caupi teria um impacto negativo na FBN, levando a uma redução da nodulação. No entanto, na ausência de inoculação, a aplicação de fertilizante N não afetaria a absorção de N e a resposta às doses de N, pelo menos até  $100 \text{ kg N ha}^{-1}$ . Além disso, Brito et al. [76], ao estudar doses de N ( $5,3$ ;  $40$ ,  $80$ ,  $120$  e  $160 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) associadas à linhagem BR 2001 de *Bradyrhizobium* sp. em caupi, concluíram que a FBN diminuiu entre  $55,6\%$  e  $81,5\%$  à medida que as doses de

N aumentaram. Além disso, de acordo com esses autores, a fixação simbiótica de  $N_2$  poderia substituir 100% da adubação nitrogenada no caupi. Talvez um controle absoluto (sem qualquer inoculação) associado às doses de N testadas mostrasse uma resposta positiva às doses de N neste estudo, uma vez que a FBN não seria comprometida sem a inoculação única com *Bradyrhizobium* sp. e a coinoculação com *Bradyrhizobium* sp. e *A. brasilense*.

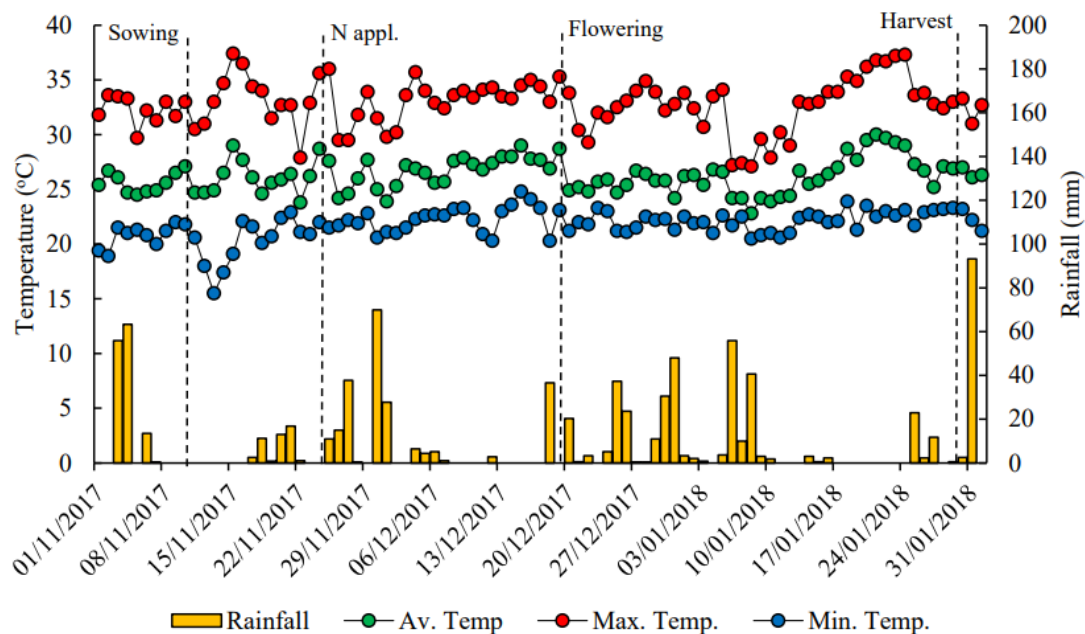
A análise química do solo indicou que o teor de matéria orgânica (MO) foi de  $21 \text{ g kg}^{-1}$  (2%). Embora o teor de MO em solos agrícolas típicos possa variar de 1 a 6%, os solos tropicais, que são altamente intemperizados, são conhecidos por ter baixo teor de MO, geralmente entre 1 e 2% [77]. Portanto, o teor de MO verificado na análise química do solo pode ser considerado baixo em relação a solos subtropicais e temperados, mas normal para condições de solo tropical, que abrange o local de realização do presente estudo. No entanto, os resultados deste estudo demonstraram claramente que não há necessidade de fornecer N por meio de fertilizantes minerais quando a coinoculação com *A. brasilense* é realizada em uma cultura de feijão-caupi. No caso da adubação de semeadura com NPK, uma prática comum em sistemas agrícolas em todo o mundo, o suprimento de N por meio de fertilizantes usando baixas doses de N ( $<20 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) não prejudicaria o crescimento e desenvolvimento do feijão-caupi.

## 5. CONCLUSÕES

A coinoculação de *Bradyrhizobium* sp. + *Azospirillum brasilense* teve uma influência significativamente positiva no desenvolvimento das raízes, aumento da biomassa radicular e aumento do teor de N nas raízes (principalmente como ureídeos e  $\text{N-NH}_4^+$ ). Esse efeito positivo significativo provavelmente foi o mecanismo chave para o aumento observado nas proteínas solúveis das raízes e folhas, no maior crescimento do feijão-caupi e no aumento da produtividade de grãos desta leguminosa

Os resultados deste estudo demonstraram claramente que não há necessidade de suplementação de N por meio de fertilizantes minerais quando a coinoculação de *A. brasilense* é realizada em uma cultura de feijão-caupi. No entanto, mesmo no caso de uma fertilização de semeadura com NPK, as doses de N aplicadas devem permanecer abaixo de  $20 \text{ kg N ha}^{-1}$ . Doses de N aplicadas acima de  $20 \text{ kg N ha}^{-1}$  provavelmente prejudicarão o crescimento e desenvolvimento do feijão-caupi. Novos estudos precisam ser projetados para avaliar os efeitos de práticas agronômicas, mudanças climáticas e coinoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal em diferentes sistemas agrícolas. A combinação de algumas técnicas científicas refinadas (por exemplo, metabolômica, técnicas isotópicas e moleculares, entre outras) faz-se necessária para aprofundar a compreensão da teoria dos mecanismos múltiplos e dos benefícios das bactérias promotoras de crescimento vegetal para o microbioma solo-planta-ambiente.

## MATERIAS SUPLEMENTARES

**Figura S1:** Precipitação diária (barra) e temperatura (linhas) durante a época de cultivo de feijão-caupi.

Av. Temp., Max. Temp. e Min. Temp. refere-se às temperaturas média, máxima e mínima, respectivamente.

**Tabela S1:** Populações de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* sp. número mais provável (NMP) no solo a granel ao redor das raízes em plena floração do feijão-caupi.

<b>Bradyrhizobia populations</b>	<b>MPN (cells g<sup>-1</sup> soil)</b>
Single <i>Bradyrhizobium</i> sp. inoculation	10.1 × 10 <sup>6</sup>
Co-inoculation with <i>Bradyrhizobium</i> sp. + <i>A. brasilense</i>	12.4 × 10 <sup>6</sup>
<b>Azospirillum sp.</b>	<b>MPN (cells g<sup>-1</sup> soil)</b>
Single <i>Bradyrhizobium</i> sp. inoculation	4.3 × 10 <sup>4</sup>
Co-inoculation with <i>Bradyrhizobium</i> sp. + <i>A. brasilense</i>	6.8 × 10 <sup>6</sup>

Number of repetitions (n) = 10.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. JAYATHILAKE, Chathuni et al. Cowpea: an overview on its nutritional facts and health benefits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 13, p. 4793-4806, 2018.
2. DOMÍNGUEZ-PERLES, Raúl et al. Chemometric analysis on free amino acids and proximate compositional data for selecting cowpea (*Vigna unguiculata* L.) diversity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 53, p. 69-76, 2016.
3. CARVALHO, Marcia et al. Evaluating stress responses in cowpea under drought stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 241, p. 153001, 2019.
4. BOUKAR, Ousmane et al. Cowpea (*Vigna unguiculata*): Genetics, genomics and breeding. **Plant Breeding**, v. 138, n. 4, p. 415-424, 2019.
5. OWADE, Joshua O. et al. A review of the contribution of cowpea leaves to food and nutrition security in East Africa. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 36-47, 2020.
6. FREIRE FILHO, Francisco Rodrigues et al. Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. 2011.
7. WILKER, Jennifer et al. Agronomic performance and nitrogen fixation of heirloom and conventional dry bean varieties under low-nitrogen field conditions. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 952, 2019.
8. ADAMS, Mark Andrew et al. Legumes are different: Leaf nitrogen, photosynthesis, and water use efficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 15, p. 4098-4103, 2016.
9. REINPRECHT, Yarmilla et al. Effects of nitrogen application on nitrogen fixation in common bean production. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 1172, 2020.
10. ELOWAD, Hassan OA; HALL, Anthony E. Influences of early and late nitrogen fertilization on yield and nitrogen fixation of cowpea under well-watered and dry field conditions. **Field Crops Research**, v. 15, n. 3-4, p. 229-244, 1987.
11. AWONAIKE, K. O.; KUMARASINGHE, K. S.; DANSO, S. K. A. Nitrogen fixation and yield of cowpea (*Vigna unguiculata*) as influenced by cultivar and *Bradyrhizobium* strain. **Field Crops Research**, v. 24, n. 3-4, p. 163-171, 1990.

12. MARTINS, L. M. V. et al. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and fertility of soils**, v. 38, p. 333-339, 2003.
13. DE FREITAS, Vanessa Fogaça et al. Strategies to deal with drought-stress in biological nitrogen fixation in soybean. **Applied Soil Ecology**, v. 172, p. 104352, 2022.
14. NGUYEN, Trung Thanh et al. Does inoculation with native rhizobia enhance nitrogen fixation and yield of cowpea through legume-based intercropping in the northern mountainous areas of Vietnam?. **Experimental Agriculture**, v. 56, n. 6, p. 825-836, 2020.
15. GRAHAM, P. H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: a review. **Field crops research**, v. 4, p. 93-112, 1981.
16. NAAB, Jesse B.; CHIMPHANGO, Samson MB; DAKORA, Felix D. N<sub>2</sub> fixation in cowpea plants grown in farmers' fields in the Upper West Region of Ghana, measured using <sup>15</sup>N natural abundance. **Symbiosis**, v. 48, p. 37-46, 2009..
17. AMORIM, Marineide Rodrigues et al. Cowpea nodules host a similar bacterial community regardless of soil properties. **Applied Soil Ecology**, v. 172, p. 104354, 2022.
18. MULDOON, J. F.; HUME, D. J.; BEVERSDORF, W. D. Effects of seed-and soil-applied *Rhizobium japonicum* inoculants on soybeans in Ontario. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 60, n. 2, p. 399-409, 1980.
19. RAVURI, V.; HUME, D. J. Performance of a superior *Bradyrhizobium japonicum* and a selected *Sinorhizobium fredii* strain with soybean cultivars. **Agronomy Journal**, v. 84, n. 6, p. 1051-1056, 1992.
20. PEOPLES, M. B. et al. Nitrogen fixation by soybean in commercial irrigated crops of central and southern New South Wales. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 4-5, p. 553-561, 1995.
21. GOSS, M. J. et al. N<sub>2</sub> fixation by soybeans grown with different levels of mineral nitrogen, and the fertilizer replacement value for a following crop. **Canadian journal of soil science**, v. 82, n. 2, p. 139-145, 2002.
22. CIAMPITTI, Ignacio A.; SALVAGIOTTI, Fernando. New insights into soybean biological nitrogen fixation. **Agronomy Journal**, v. 110, n. 4, p. 1185-1196, 2018.

23. BARBOSA, Julierme Zimmer et al. Meta-analysis reveals benefits of co-inoculation of soybean with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* spp. in Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 163, p. 103913, 2021.
24. JEMO, Martin et al. Comparative analysis of the combined effects of different water and phosphate levels on growth and biological nitrogen fixation of nine cowpea varieties. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 2111, 2017.
25. HUNGRIA, Mariangela et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and soil**, v. 331, p. 413-425, 2010.
26. HUNGRIA, Mariangela; RIBEIRO, Renan Augusto; NOGUEIRA, Marco Antonio. Draft genome sequences of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6, commercially used in inoculants for grasses and legumes in Brazil. **Genome Announcements**, v. 6, n. 20, p. e00393-18, 2018.
27. FUKAMI, Josiane; CEREZINI, Paula; HUNGRIA, Mariangela. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **Amb Express**, v. 8, n. 1, p. 73, 2018.
29. GALINDO, Fernando Shintate et al. Inoculation of *Azospirillum brasilense* associated with silicon as a liming source to improve nitrogen fertilization in wheat crops. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 6160, 2020.
30. GALINDO, Fernando Shintate et al. Can silicon applied to correct soil acidity in combination with *Azospirillum brasilense* inoculation improve nitrogen use efficiency in maize?. **PLoS One**, v. 15, n. 4, p. e0230954, 2020.
31. CASSÁN, Fabricio et al. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, p. 461-479, 2020.
32. ZEFFA, Douglas M. et al. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on co-inoculation with *Bradyrhizobium* in soybean crop: a meta-analysis of studies from 1987 to 2018. **PeerJ**, v. 8, p. e7905, 2020.
33. SIBPONKRUNG, Surachat et al. Co-inoculation of *Bacillus velezensis* strain S141 and *Bradyrhizobium* strains promotes nodule growth and nitrogen fixation. **Microorganisms**, v. 8, n. 5, p. 678, 2020.
34. PRAKAMHANG, Janpen et al. Proposed some interactions at molecular level of BPCV coinoculated with *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 and *B. japonicum*

THA6 on soybean symbiosis and its potential of field application. **Applied Soil Ecology**, v. 85, p. 38-49, 2015.

35. HUNGRIA, Mariangela; NOGUEIRA, Marco Antonio; ARAUJO, Ricardo Silva. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, p. 791-801, 2013.

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

37. GALINDO, Fernando Shintate et al. Nitrogen recovery from fertilizer and use efficiency response to *Bradyrhizobium* sp. and *Azospirillum brasilense* combined with N rates in cowpea-wheat crop sequence. **Applied Soil Ecology**, v. 157, p. 103764, 2021.

38. PEDROSA, F. O. et al. The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053: a new alternative inoculant for maize. **Plant and Soil**, v. 451, p. 45-56, 2020.

39. SANTOS, Mariana Sanches; NOGUEIRA, Marco Antonio; HUNGRIA, Mariangela. Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 45, 2021.

40. BASHAN, Yoav; DE-BASHAN, Luz E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. **Advances in agronomy**, v. 108, p. 77-136, 2010.

41. CASSÁN, Fabricio; DIAZ-ZORITA, Martín. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117-130, 2016.

42. CAIRES, Eduardo Fávero et al. Seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization for no-till cereal production. **Agronomy Journal**, v. 113, n. 1, p. 560-576, 2021.

43. PANKIEVICZ, Vânia et al. Are we there yet? The long walk towards the development of efficient symbiotic associations between nitrogen-fixing bacteria and non-leguminous crops. **BMC biology**, v. 17, n. 1, p. 1-17, 2019.

44. RAFI, Mokula Mohammed; KRISHNAVENI, M. S.; CHARYULU, P. B. B. N. Phosphate-solubilizing microorganisms and their emerging role in sustainable

agriculture. **Recent developments in applied microbiology and biochemistry**, p. 223-233, 2019.

45. CHIBEBA, Amaral Machaculeha et al. Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. 2015.

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

47. YONEYAMA, Tadakatsu et al. Occurrence of Ureide Accumulation in Soybean Plants: Effect of Nitrogen Fertilization and N<sub>2</sub> Fixation. **Soil science and plant nutrition**, v. 31, n. 1, p. 133-140, 1985.

48. BOSSE, Marco Antônio et al. Physiological impact of flavonoids on nodulation and ureide metabolism in legume plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 166, p. 512-521, 2021.

49. DHANAPAL, Arun Prabhu et al. Genome-wide association analysis of diverse soybean genotypes reveals novel markers for nitrogen traits. **The Plant Genome**, v. 8, n. 3, p. plantgenome2014.11.0086, 2015.

50. SANTACHIARA, Gabriel et al. Relative importance of biological nitrogen fixation and mineral uptake in high yielding soybean cultivars. **Plant and Soil**, v. 418, p. 191-203, 2017.

51. BRITO, Marciano de Medeiros Pereira; MURAOKA, Takashi; SILVA, Edson Cabral da. Uptake rate of nitrogen from soil and fertilizer, and n derived from symbiotic fixation in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) walp.) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) determined using the N<sup>15</sup> isotope. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 895-905, 2009.

52. BELANE, A. K.; DAKORA, F. D. Assessing the relationship between photosynthetic C accumulation and symbiotic N nutrition in leaves of field-grown nodulated cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) genotypes. **Photosynthetica**, v. 53, n. 4, p. 562-571, 2015.

53. MAPOPE, Nyamande; DAKORA, Felix D. N<sub>2</sub> fixation, carbon accumulation, and plant water relations in soybean (*Glycine max* L. Merrill) varieties sampled from farmers' fields in South Africa, measured using N<sup>15</sup> and <sup>13</sup>C natural abundance. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 221, p. 174-186, 2016.

54. KASCHUK, Glaciela et al. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses?. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1233-1244, 2009.
55. CEREZINI, Paula et al. Soybean tolerance to drought depends on the associated *Bradyrhizobium* strain. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1977-1986, 2020.
56. HELLIWELL, J. R. et al. The emergent rhizosphere: imaging the development of the porous architecture at the root-soil interface. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.
57. JIN, Kemo et al. Shaping an optimal soil by root–soil interaction. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 10, p. 823-829, 2017.
58. ERKTAN, Amandine; MCCORMACK, M. Luke; ROUMET, Catherine. Frontiers in root ecology: recent advances and future challenges. **Plant and Soil**, v. 424, p. 1-9, 2018.
59. JIN, Xiuliang et al. Effects of nitrogen stress on the photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation, chlorophyll fluorescence and sugar-nitrogen ratio in corn. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 9311, 2015.
60. BASSI, Denis; MENOSSI, Marcelo; MATTIELLO, Lucia. Nitrogen supply influences photosynthesis establishment along the sugarcane leaf. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2327, 2018.
61. CROFT, Holly et al. Leaf chlorophyll content as a proxy for leaf photosynthetic capacity. **Global Change Biology**, v. 23, n. 9, p. 3513-3524, 2017.
62. BUSCH, Florian A. Photorespiration in the context of Rubisco biochemistry, CO<sub>2</sub> diffusion and metabolism. **The Plant Journal**, v. 101, n. 4, p. 919-939, 2020.
63. ANSARI, Firoz Ahmad; AHMAD, Iqbal; PICHTEL, John. Growth stimulation and alleviation of salinity stress to wheat by the biofilm forming *Bacillus pumilus* strain FAB10. **Applied soil ecology**, v. 143, p. 45-54, 2019.
64. GALINDO, Fernando S. et al. Modes of application of cobalt, molybdenum and *Azospirillum brasilense* on soybean yield and profitability. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, p. 180-185, 2017.
65. GALINDO, Fernando S. et al. Technical and economic viability of co-inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean cultivars in the Cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 22, p. 51-56, 2018.

66. GARCIA, Marcos Vinícios Conceição; NOGUEIRA, Marco Antonio; HUNGRIA, Mariangela. Combining microorganisms in inoculants is agronomically important but industrially challenging: case study of a composite inoculant containing *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* for the soybean crop. **AMB Express**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2021.
67. SALVAGIOTTI, Fernando et al. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. **Field Crops Research**, v. 108, n. 1, p. 1-13, 2008.
68. SANTACHIARA, Gabriel; SALVAGIOTTI, Fernando; ROTUNDO, José L. Nutritional and environmental effects on biological nitrogen fixation in soybean: A meta-analysis. **Field Crops Research**, v. 240, p. 106-115, 2019.
69. STREETER, John; WONG, Peter P. Inhibition of legume nodule formation and N<sup>2</sup> fixation by nitrate. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 7, n. 1, p. 1-23, 1988.
70. VESSEY, J. Kevin; WATERER, John. In search of the mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in legume nodules: recent developments. **Physiologia Plantarum**, v. 84, n. 1, p. 171-176, 1992.
71. DE PAULO, Ezio Nalin et al. Nitrification inhibitor 3, 4-Dimethylpyrazole phosphate improves nitrogen recovery and accumulation in cotton plants by reducing NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leaching under N<sup>15</sup>-urea fertilization. **Plant and Soil**, v. 469, p. 259-272, 2021.
72. STOUGAARD, Jens. Regulators and regulation of legume root nodule development. **Plant Physiology**, v. 124, n. 2, p. 531-540, 2000.
73. BARBOSA, Julierme Zimmer et al. Meta-analysis of maize responses to *Azospirillum brasilense* inoculation in Brazil: Benefits and lessons to improve inoculation efficiency. **Applied Soil Ecology**, v. 170, p. 104276, 2022.
74. SOARES, André Luis de Lima et al. Agronomic efficiency of selected rhizobia strains and diversity of native nodulating populations in Perdões (MG-Brazil): I-cowpea. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 795-802, 2006.
75. ULZEN, Jacob et al. *Bradyrhizobium* inoculants enhance grain yields of soybean and cowpea in Northern Ghana. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1770, 2016.
76. GALINDO, Fernando Shintate et al. Co-Inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* sp. Enhances Nitrogen Uptake and Yield in Field-Grown Cowpea and Did Not Change N-Fertilizer Recovery. **Plants**, v. 11, n. 14, p. 1847, 2022.
77. CRASWELL, E. T.; LEFROY, R. D. B. The role and function of organic matter in tropical soils. In: **Managing Organic Matter in Tropical Soils: Scope and**

**Limitations: Proceedings of a Workshop organized by the Center for Development Research at the University of Bonn (ZEF Bonn)—Germany, 7–10 June, 1999.**

Springer Netherlands, 2001. p. 7-18.

78. STAFF, Soil Survery. Keys to Soil Taxonomy, ed. **Washington (DC): Natural Resources Conservation Service**, 2014.

79. VAN RAIJ, Bernardo et al. Os métodos de análise química do sistema IAC de análise de solo no contexto nacional. **Análise química para avaliação da Fertil solos Trop**, p. 5-39, 2001.

80. BREMNER, J. M. Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. **The Journal of Agricultural Science**, v. 55, n. 1, p. 11-33, 1960.

81. ANDRADE, D. de S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**, 1994.

82. ZILLI, Jerri Édson et al. Cowpea response to inoculation with *Bradyrhizobium* strains recommended for soybean. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 739-742, 2011.

83. VINCENT, James Matthew et al. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.**, 1970.

84. MENDES, Írda Carvalho; HUNGRIA, Mariangela; VARGAS, Milton Alexandre Teixeira. Establishment of *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains in a Brazilian Cerrado oxisol. **Biology and Fertility of Soils**, v. 40, p. 28-35, 200.

85. DÖBEREINER, Johanna; BALDANI, Vera Lúcia Divan; BALDANI, José Ivo. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Embrapa SPI, 1995.

86. ABDUL RAHMAN, Nurudeen et al. Does nitrogen matter for legumes? Starter nitrogen effects on biological and economic benefits of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) in Guinea and Sudan Savanna of West Africa. **Agronomy**, v. 8, n. 7, p. 120, 2018.

87. De Andrade Júnior, A.S.; Santos, A.A.; Sobrinhos, C.A.; Bastos, E.A.; De Melo, F.B.; Pinto Viana, F.M.; Freire Filho, F.R.; Da Carneiro, J.S.; Rocha, M.M.; Cardoso, M.J.; et al. Cowpea Cultivation Teresina: Embrapa Meio-Norte; Embrapa Meio-Norte, Sistemas de Produção, 2: Teresina, Brazil, 2002; 102p.

88. CANTARELLA, Heitor; TRIVELIN, Paulo Cesar Ocheuze. Determinação de nitrogênio total em solo. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**, 2001.
89. MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Evaluation of the Nutritional Status of Plants: Principles and Applications; Potafos: Piracicaba, Brazil, 1997. **Google Scholar**, p. 319.
89. BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical biochemistry**, v. 17, n. 2, p. 278-293, 1966.
91. VOGELS, G. D.; VAN DER DRIFT, C. Differential analyses of glyoxylate derivatives. **Analytical biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 143-157, 1970.
92. BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
93. LICHTENTHALER, Hartmut K. [34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1987. p. 350-382.
94. BARRIE, ANDREW; PROSSER, S. J. Automated analysis of light-element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. **Mass spectrometry of soils**. New York, **Marcel Dekker**, p. 1-46, 1996.
95. CABRERA, M. L.; KISSEL, D. E. Review and simplification of calculations in  $^{15}\text{N}$  tracer studies. **Fertilizer Research**, v. 20, p. 11-15, 1989.
96. HÖGBERG, P.  $^{15}\text{N}$  natural abundance in soil-plant systems. **New Phytologist**, v. 137, n. 2, p. 179-204, 1997.
97. TRIVELIN, Paulo Cesar Ocheuze et al. Evaluation of a  $^{15}\text{N}$  plot design for estimating plant recovery of fertilizer nitrogen applied to sugar cane. **Scientia Agricola**, v. 51, p. 226-234, 1994.
98. R CORE TEAM et al. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [http://www. R-project. org/](http://www.R-project.org/), 2016. (acesso em 12 Junho 2022)

1 *Type of the Paper (Article, Review, Communication, etc.)*

## 2 **Title**

3 **Firstname Lastname <sup>1</sup>, Firstname Lastname <sup>2</sup> and Firstname Lastname <sup>2,\*</sup>**

4 <sup>1</sup> Affiliation 1; e-mail@e-mail.com

5 <sup>2</sup> Affiliation 2; e-mail@e-mail.com

6 \* Correspondence: e-mail@e-mail.com; Tel.: (optional; include country code; if there are multiple corre-  
7 sponding authors, add author initials)

8 **Abstract:** A single paragraph of about 200 words maximum. For research articles, abstracts should  
9 give a pertinent overview of the work. We strongly encourage authors to use the following style of  
10 structured abstracts, but without headings: (1) Background: Place the question addressed in a  
11 broad context and highlight the purpose of the study; (2) Methods: briefly describe the main  
12 methods or treatments applied; (3) Results: summarize the article’s main findings; (4) Conclusions:  
13 indicate the main conclusions or interpretations. The abstract should be an objective representation  
14 of the article and it must not contain results that are not presented and substantiated in the main  
15 text and should not exaggerate the main conclusions.

16 **Keywords:** keyword 1; keyword 2; keyword 3 (List three to ten pertinent keywords specific to the  
17 article yet reasonably common within the subject discipline.)  
18

## 19 **0. How to Use This Template**

20 The template details the sections that can be used in a manuscript. Note that each  
21 section has a corresponding style, which can be found in the “Styles” menu of Word.  
22 Sections that are not mandatory are listed as such. The section titles given are for articles.  
23 Review papers and other article types have a more flexible structure.

24 Remove this paragraph and start section numbering with 1. For any questions,  
25 please contact the editorial office of the journal or support@mdpi.com.

## 26 **1. Introduction**

27 The introduction should briefly place the study in a broad context and highlight  
28 why it is important. It should define the purpose of the work and its significance. The  
29 current state of the research field should be carefully reviewed and key publications  
30 cited. Please highlight controversial and diverging hypotheses when necessary. Finally,  
31 briefly mention the main aim of the work and highlight the principal conclusions. As far  
32 as possible, please keep the introduction comprehensible to scientists outside your par-  
33 ticular field of research. References should be numbered in order of appearance and  
34 indicated by a numeral or numerals in square brackets—e.g., [1] or [2,3], or [4–6]. See the  
35 end of the document for further details on references.

## 36 **2. Results**

37 This section may be divided by subheadings. It should provide a concise and precise  
38 description of the experimental results, their interpretation, as well as the experimental  
39 conclusions that can be drawn.

40 **Citation:** To be added by editorial  
41 staff during production.

42 Academic Editor: Firstname  
43 Lastname

44 Received: date

45 Revised: date

46 Accepted: date

47 Published: date



48 **Copyright:** © 2023 by the authors.

49 Submitted for possible open access

50 publication under the terms and

51 conditions of the Creative Commons

52 Attribution (CC BY) license

53 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

41 2.1. Subsection

42 2.1.1. Subsubsection

43 Bulleted lists look like this:

- 44 • First bullet;
- 45 • Second bullet;
- 46 • Third bullet.

47 Numbered lists can be added as follows:

- 48 1. First item;
- 49 2. Second item;
- 50 3. Third item.

51 The text continues here.

52 2.2. Figures, Tables and Schemes

53 All figures and tables should be cited in the main text as Figure 1, Table 1, etc.



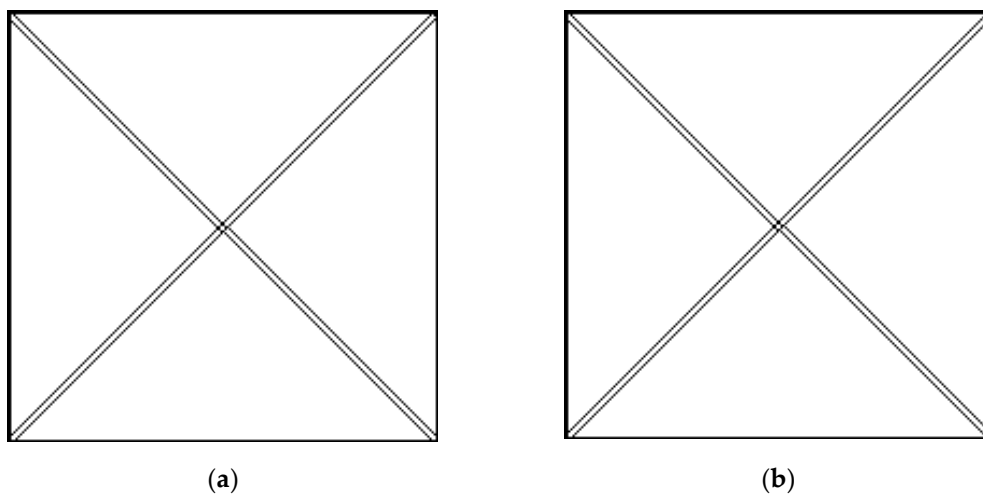
54 **Figure 1.** This is a figure. Schemes follow the same formatting.

55 **Table 1.** This is a table. Tables should be placed in the main text near to the first time they are cited.

Title 1	Title 2	Title 3
entry 1	data	data
entry 2	data	data <sup>1</sup>

56 <sup>1</sup> Tables may have a footer.

57 The text continues here (Figure 2 and Table 2).



58 **Figure 2.** This is a figure. Schemes follow another format. If there are multiple panels, they should be listed as: (a) Description of what is contained in the first panel; (b) Description of what is contained in the second panel. Figures should be placed in the main text near to the first time they are cited.

59

60

61

62

**Table 2.** This is a table. Tables should be placed in the main text near to the first time they are cited.

Title 1	Title 2	Title 3	Title 4
entry 1 *	data	data	data
	data	data	data
	data	data	data
entry 2	data	data	data
	data	data	data
entry 3	data	data	data
	data	data	data
	data	data	data
	data	data	data
entry 4	data	data	data
	data	data	data

\* Tables may have a footer.

### 2.3. Formatting of Mathematical Components

This is example 1 of an equation:

$$a = 1, \tag{1}$$

the text following an equation need not be a new paragraph. Please punctuate equations as regular text.

This is example 2 of an equation:

$$a = b + c + d + e + f + g + h + i + j + k + l + m + n + o + p + q + r + s + t + u + v + w + x + y + z \tag{2}$$

the text following an equation need not be a new paragraph. Please punctuate equations as regular text.

Theorem-type environments (including propositions, lemmas, corollaries etc.) can be formatted as follows:

**Theorem 1.** *Example text of a theorem. Theorems, propositions, lemmas, etc. should be numbered sequentially (i.e., Proposition 2 follows Theorem 1). Examples or Remarks use the same formatting, but should be numbered separately, so a document may contain Theorem 1, Remark 1 and Example 1.*

The text continues here. Proofs must be formatted as follows:

**Proof of Theorem 1.** Text of the proof. Note that the phrase “of Theorem 1” is optional if it is clear which theorem is being referred to. Always finish a proof with the following symbol. □

The text continues here.

### 3. Discussion

Authors should discuss the results and how they can be interpreted from the perspective of previous studies and of the working hypotheses. The findings and their implications should be discussed in the broadest context possible. Future research directions may also be highlighted.

### 4. Materials and Methods

The Materials and Methods should be described with sufficient details to allow others to replicate and build on the published results. Please note that the publication of your manuscript implicates that you must make all materials, data, computer code, and protocols associated with the publication available to readers. Please disclose at the

92 submission stage any restrictions on the availability of materials or information. New  
93 methods and protocols should be described in detail while well-established methods can  
94 be briefly described and appropriately cited.

95 Research manuscripts reporting large datasets that are deposited in a publicly  
96 available database should specify where the data have been deposited and provide the  
97 relevant accession numbers. If the accession numbers have not yet been obtained at the  
98 time of submission, please state that they will be provided during review. They must be  
99 provided prior to publication.

100 Interventionary studies involving animals or humans, and other studies that require  
101 ethical approval, must list the authority that provided approval and the corresponding  
102 ethical approval code.

## 103 5. Conclusions

104 This section is not mandatory but can be added to the manuscript if the discussion is  
105 unusually long or complex.

## 106 6. Patents

107 This section is not mandatory but may be added if there are patents resulting from  
108 the work reported in this manuscript.

109 **Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at:  
110 [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1), Figure S1: title; Table S1: title; Video S1: title.

111 **Author Contributions:** For research articles with several authors, a short paragraph specifying  
112 their individual contributions must be provided. The following statements should be used “Con-  
113 ceptualization, X.X. and Y.Y.; methodology, X.X.; software, X.X.; validation, X.X., Y.Y. and Z.Z.;  
114 formal analysis, X.X.; investigation, X.X.; resources, X.X.; data curation, X.X.; writing—original  
115 draft preparation, X.X.; writing—review and editing, X.X.; visualization, X.X.; supervision, X.X.;  
116 project administration, X.X.; funding acquisition, Y.Y. All authors have read and agreed to the  
117 published version of the manuscript.” Please turn to the [CRediT taxonomy](#) for the term explana-  
118 tion. Authorship must be limited to those who have contributed substantially to the work reported.

119 **Funding:** Please add: “This research received no external funding” or “This research was funded  
120 by NAME OF FUNDER, grant number XXX” and “The APC was funded by XXX”. Check carefully  
121 that the details given are accurate and use the standard spelling of funding agency names at  
122 <https://search.crossref.org/funding>. Any errors may affect your future funding.

123 **Data Availability Statement:** We encourage all authors of articles published in MDPI journals to  
124 share their research data. In this section, please provide details regarding where data supporting  
125 reported results can be found, including links to publicly archived datasets analyzed or generated  
126 during the study. Where no new data were created, or where data is unavailable due to privacy or  
127 ethical restrictions, a statement is still required. Suggested Data Availability Statements are availa-  
128 ble in section “MDPI Research Data Policies” at <https://www.mdpi.com/ethics>.

129 **Acknowledgments:** In this section, you can acknowledge any support given which is not covered  
130 by the author contribution or funding sections. This may include administrative and technical  
131 support, or donations in kind (e.g., materials used for experiments).

132 **Conflicts of Interest:** Declare conflicts of interest or state “The authors declare no conflict of inter-  
133 est.” Authors must identify and declare any personal circumstances or interest that may be per-  
134 ceived as inappropriately influencing the representation or interpretation of reported research re-  
135 sults. Any role of the funders in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation  
136 of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results must be declared  
137 in this section. If there is no role, please state “The funders had no role in the design of the study; in  
138 the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision  
139 to publish the results”.

## Appendix A

The appendix is an optional section that can contain details and data supplemental to the main text—for example, explanations of experimental details that would disrupt the flow of the main text but nonetheless remain crucial to understanding and reproducing the research shown; figures of replicates for experiments of which representative data is shown in the main text can be added here if brief, or as Supplementary data. Mathematical proofs of results not central to the paper can be added as an appendix.

## Appendix B

All appendix sections must be cited in the main text. In the appendices, Figures, Tables, etc. should be labeled starting with “A”—e.g., Figure A1, Figure A2, etc.

## References

References must be numbered in order of appearance in the text (including citations in tables and legends) and listed individually at the end of the manuscript. We recommend preparing the references with a bibliography software package, such as EndNote, ReferenceManager or Zotero to avoid typing mistakes and duplicated references. Include the digital object identifier (DOI) for all references where available.

Citations and references in the Supplementary Materials are permitted provided that they also appear in the reference list here.

In the text, reference numbers should be placed in square brackets [ ] and placed before the punctuation; for example [1], [1–3] or [1,3]. For embedded citations in the text with pagination, use both parentheses and brackets to indicate the reference number and page numbers; for example [5] (p. 10), or [6] (pp. 101–105).

1. Author 1, A.B.; Author 2, C.D. Title of the article. *Abbreviated Journal Name* **Year**, *Volume*, page range.
2. Author 1, A.; Author 2, B. Title of the chapter. In *Book Title*, 2nd ed.; Editor 1, A., Editor 2, B., Eds.; Publisher: Publisher Location, Country, 2007; Volume 3, pp. 154–196.
3. Author 1, A.; Author 2, B. *Book Title*, 3rd ed.; Publisher: Publisher Location, Country, 2008; pp. 154–196.
4. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work. *Abbreviated Journal Name* year, *phrase indicating stage of publication (submitted; accepted; in press)*.
5. Author 1, A.B. (University, City, State, Country); Author 2, C. (Institute, City, State, Country). Personal communication, 2012.
6. Author 1, A.B.; Author 2, C.D.; Author 3, E.F. Title of Presentation. In Proceedings of the Name of the Conference, Location of Conference, Country, Date of Conference (Day Month Year).
7. Author 1, A.B. Title of Thesis. Level of Thesis, Degree-Granting University, Location of University, Date of Completion.
8. Title of Site. Available online: URL (accessed on Day Month Year).

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.