

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE ENGENHARIAS, CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
CURSO DE AGRONOMIA

LILYAN BARBARA RUIVO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS NODULÍFEROS E
ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A *Lupinus* sp. EM DIFERENTES SOLOS

PONTA GROSSA

2025

LILYAN BARBARA RUIVO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS NODULÍFEROS E
ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A *Lupinus* sp. EM DIFERENTES SOLOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção
do título de Engenheira Agrônoma na Universidade Estadual
de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof.(a) Dr.(a) Silvana Ohse
Coorientadora: Prof.(a) Dr.(a) Jesiane Stefânia da Silva
Batista

PONTA GROSSA

2025



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE ENGENHARIAS, CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
COLEGIADO DO CURSO DE AGRONOMIA
COORDENAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

OTCC - Ano 2025

AVALIAÇÃO DE TCC RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA

Título da Monografia: Isolamento e caracterização de microrganismos noduli-
feros e endofíticos associados ao *Leupinus* sp. em diferentes solos.

Autor (a): Kelym Barina Ruvo

Data da defesa: 22/05/2025 Horário: 16:15 Local: Amfiteatro Black

Avaliadores:

1-Orientador (a): Leandro Ihae Assinatura: [Assinatura]

2-Avaliador (a): Rodrigo Rodrigues Matulis Assinatura: [Assinatura]

3-Avaliador (a): Caroline Julguit Galvão Assinatura: [Assinatura]

Itens a serem avaliados	Notas atribuídas		
	Orientador(a)	1º Avaliador(a)	2º Avaliador(a)
I- Apresentação oral (Até 2,0)	2,0	2,0	2,0
II- Trabalho escrito (Até 6,0)	6,0	5,8	6,0
III- Arguição (Até 2,0)	2,0	1,9	2,0
TOTAL	10,0	9,7	10,0
MÉDIA FINAL *		9,9	

* Orientador(a) nota final com uma casa após a vírgula

Atenção Professor(a) ORIENTADOR(A):

No caso de apresentação de trabalho, em evento técnico-científico, no qual o acadêmico conste como autor, poderá ser acrescentado ATÉ 10% da nota, na somatória final. Apresentar comprovante junto com os documentos entregues para a Coordenação de TCC.

FORMULÁRIO 4
OTCC
AGRONOMIA

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser o meu grande amigo, sustento a cada dia e refúgio nas adversidades. Por ter me permitido chegar à conclusão do curso que amo intensamente.

À Maria Santíssima por sua doce intercessão em cada detalhe de minha vida e profissão.

Aos meus pais, Valdeci e Janice, por serem meus grandes exemplos de amor à agricultura e meus educadores, pelo incondicional apoio e incentivo durante todos os anos de curso.

Aos meus caros irmãos, Rennan e Tais, pelo apoio, paciência e acolhimento, sobretudo nos momentos mais exigentes.

Às minhas estimadas orientadoras, Dr.(a) Silvana e Dr.(a) Jesiane, por todo o incentivo, ensinamentos, oportunidades, apoio, paciência e amizade, que foram excepcionais em minha trajetória.

Às minhas amigas Natália e Maria Caroline, por esses anos de amizade e profunda convivência, por tudo que pudemos reciprocamente aprender sobre amizade, doação, amadurecimento e conteúdos agromed.

Às minhas amigas Giovana e Isadora, minha gratidão pela amizade, convívio e aprendizados. Vocês são pessoas especiais, que têm minha admiração.

Aos membros dos laboratórios de Fisiologia Vegetal Aplicada II e de Biodiversidade, meus amigos: Vinícius, Kauane, Joyce, Thiago, Letícia e Fátima. Sou grata por tudo que pacientemente me ensinaram, por me acolherem e por partilharmos as alegrias e desafios da pesquisa.

Aos demais colegas e amigos com os quais tive a oportunidade de aprender e partilhar as alegrias e desafios do curso.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) e ao curso de Agronomia pela estrutura proporcionada, e de modo especial aos professores com os quais tive a oportunidade de aprender, e que têm minha admiração.

Nada é pequeno se feito com amor.

(Teresa de Liseux)

RESUMO

RUIVO, L. B. **ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS NODULÍFEROS E ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A *Lupinus* sp. EM DIFERENTES SOLOS**. Orientadora: Prof.(a) Dr.(a) Silvana Ohse. Coorientadora: Prof.(a) Dr.(a) Jesiane Stefânia da Silva Batista. Ponta Grossa, 2025. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2025.

Na atual conjuntura de diversos desafios à produção agrícola mundial, a cultura do tremoço (*Lupinus* sp.) constitui importante alternativa, pois possui características como a tolerância à escassez de fósforo e a elevados teores de alumínio no solo, alto teor de proteínas nas sementes e estabelece simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio (rizóbios). Além dos rizóbios, bactérias endofíticas integram o fitomicrobioma dos nódulos, as quais também podem exercer atividades de promoção do crescimento vegetal. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de bactérias isoladas de nódulos radiculares de duas espécies de tremoço (*Lupinus albus* e *Lupinus angustifolius*) cultivadas em diferentes tipos de solo (Almirante Tamandaré do Sul – SAT, Tibagi – ST, Área de Preservação Permanente – SAPA, Gleba B6 – SGB6, Área comercial - SAC), quanto à promoção do crescimento vegetal, obtendo-se um fatorial 5x2, com cinco repetições, em delineamento inteiramente casualizado. Avaliou-se o comprimento da parte aérea (CPA), comprimento de raízes (CR), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca de raízes (MFR), e massa seca de raízes (MSR) das plantas aos 27 dias após a semeadura. As bactérias isoladas dos nódulos foram submetidas à tipagem molecular por BOX-PCR *fingerprinting* e identificadas por sequenciamento do gene 16S. A avaliação das atividades de promoção do crescimento vegetal *in vitro* compreendeu a produção de ácido indolacético (AIA), exopolissacarídeos (EPS), sideróforos e solubilização de fosfato. O efeito da inoculação dos isolados foi verificado em testes de germinação e vigor. A análise de variância foi realizada em software RTM. As médias de todos os ensaios foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (5%). As duas espécies de tremoço apresentaram maiores médias das variáveis avaliadas quando cultivadas nos solos SC, SGB6 e SAT, assim como a espécie *L. albus* foi, de modo geral, superior à *L. angustifolius*. Os gêneros dos isolados foram *Bradyrhizobium* sp., *Bacillus* sp., *Priestia* sp., *Paenibacillus* sp., *Enterobacter* sp. e *Leifsonia* sp. Nas atividades de promoção do crescimento vegetal *in vitro*, destacaram-se as estirpes *Bradyrhizobium* sp. 21P1, *Enterobacter* sp. 27P2 e *Paenibacillus* sp. 32P1, as quais apresentaram as quatro atividades avaliadas. Não houve significância para germinação de sementes, entretanto, no teste de vigor as estirpes *Bradyrhizobium* sp. 21P1, *Enterobacter* sp. 27P2 e *Paenibacillus* sp. 32P1 estiveram entre os tratamentos que proporcionaram as maiores médias nas variáveis comprimento de raiz (CR), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento total de plântula (CT), massa fresca de raízes (MFR) e massa fresca total de plântula (MFT), o que pode decorrer de suas habilidades supracitadas. Diante disso, propõe-se que sejam feitos com a coinoculação das estirpes *Bradyrhizobium* sp. 21P1 e/ou 21P2 com as endofíticas *Enterobacter* sp. 27P2 e/ou *Paenibacillus* sp. 32P1, de forma a verificar se atuam sinergicamente.

Palavras-chave: simbiose; Fabaceae; bactérias promotoras do crescimento de plantas; inoculante; tremoço

ABSTRACT

RUIVO, L. B. **ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF NODULATING AND ENDOPHYTIC MICROORGANISMS ASSOCIATED WITH *Lupinus* sp. IN DIFFERENT SOIL TYPES.** Advisor: Prof. Dr. Silvana Ohse. Co-advisor: Prof. Dr. Jesiane Stefânia da Silva Batista. Ponta Grossa, 2025. Undergraduate Thesis – State University of Ponta Grossa, 2025.

In the current context of various challenges to global agricultural production, the cultivation of lupin (*Lupinus* sp.) represents an important alternative due to its characteristics such as tolerance to phosphorus scarcity and high aluminum content in the soil, high protein content in seeds, and its ability to establish symbiosis with nitrogen-fixing bacteria (rhizobia). In addition to rhizobia, endophytic bacteria are part of the nodule phytomicrobiome and can also exhibit plant growth-promoting activities. The aim of this study was to evaluate the potential of bacteria isolated from root nodules of two lupin species (*Lupinus albus* and *Lupinus angustifolius*), cultivated in different soil types (Almirante Tamandaré do Sul – SAT, Tibagi – ST, Permanent Preservation Area – SAPA, Gleba B6 – SGB6, Commercial Area – SAC), regarding their plant growth-promoting capabilities. The experiment was conducted in a 5×2 factorial arrangement, with five replicates, in a completely randomized design. Plant measurements were taken 27 days after sowing, including shoot length (SL), root length (RL), fresh shoot weight (FSW), dry shoot weight (DSW), fresh root weight (FRW), and dry root weight (DRW). Bacteria isolated from the nodules were subjected to molecular typing by BOX-PCR fingerprinting and identified through 16S rRNA gene sequencing. The evaluation of *in vitro* plant growth-promoting activities included the production of indole-3-acetic acid (IAA), exopolysaccharides (EPS), siderophores, and phosphate solubilization. The effect of bacterial inoculation was verified through seed germination and seedling vigor tests. Analysis of variance was performed using R™ software. The means of all experiments were compared using the Scott-Knott test (5%). Both lupin species exhibited higher average values for the evaluated variables when cultivated in SC, SGB6, and SAT soils, with *L. albus* generally outperforming *L. angustifolius*. The isolated genera were *Bradyrhizobium* sp., *Bacillus* sp., *Priestia* sp., *Paenibacillus* sp., *Enterobacter* sp., and *Leifsonia* sp. Among the *in vitro* plant growth-promoting activities, the strains *Bradyrhizobium* sp. 21P1, *Enterobacter* sp. 27P2, and *Paenibacillus* sp. 32P1 stood out for exhibiting all four evaluated activities. There was no significant effect on seed germination; however, in the seedling vigor test, the strains *Bradyrhizobium* sp. 21P1, *Enterobacter* sp. 27P2, and *Paenibacillus* sp. 32P1 were among the treatments that resulted in the highest average values for root length (RL), shoot length (SL), total seedling length (TSL), fresh root weight (FRW), and total fresh seedling weight (TFSW). This may be due to their aforementioned abilities. Therefore, it is proposed that co-inoculation studies be conducted with *Bradyrhizobium* sp. 21P1 and/or 21P2 together with the endophytic strains *Enterobacter* sp. 27P2 and/or *Paenibacillus* sp. 32P1 to verify whether they act synergistically.

Keywords: symbiosis; Fabaceae; plant growth-promoting bacteria; inoculant; lupin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração das etapas do processo de nodulação via infecção do pelo radicular.....	16
Figura 2 – Foto dos recipientes após a semeadura, expressando a diversidade, inclusive de coloração, dos solos de diferentes origens.....	24
Figura 3 – Plantas representativas de cada tratamento, coletadas aos 27 DAS.....	36
Figura 4 – Comparação de médias da massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raízes (MSR) entre as espécies de tremoço (A); do comprimento de raiz (CR) (B) independentemente do solo onde foram cultivados; e da massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raízes (MSR) entre os solos de diferentes origens (C) independentemente da espécie de tremoço	37
Figura 5 – Comprimento da parte aérea de plantas (CPA) de duas espécies de tremoço cultivadas em solos de diferentes origens.....	39
Figura 6 – Massa fresca da parte aérea (MFPA) de duas espécies de tremoço cultivadas em solos de diferentes origens.....	40
Figura 7 – Massa fresca de raízes (MFR) de plantas de duas espécies de tremoço cultivadas em solos de diferentes origens.....	41
Figura 8 – Dendrograma baseado nos perfis de BOX-PCR de isolados bacterianos de nódulos de <i>L. angustifolius</i> (verde) e <i>L. albus</i> (azul) algoritmo UPGMA, coeficiente de Jaccard e 2% de tolerância, utilizando o software Bionumerics 7.6 (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium).....	43
Figura 9 – Resultados das análises de promoção do crescimento de plantas <i>in vitro</i> . Resultado positivo para a solubilização de fosfato em meio de cultivo NBRIP, verificado por meio do halo transparente ao redor dos pontos de inoculação das estirpes 21P1 (A), 32P1 (B) e 27P2 (C); resultado negativo para a produção de sideróforos pelo método O-CAS da estirpe 21P2 (D); resultado positivo para a produção de sideróforos pelo método O-CAS da estirpe 32P1 (E); resultado positivo para a produção de exopolissacarídeos (F)	48
Figura 10 – Comparação de médias da produção de compostos indólicos (AIA), em $\mu\text{g mL}^{-1}$ (A); Comparação de médias dos diâmetros dos halos de produção de exopolissacarídeos (EPS) (B).....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Origem e coordenadas geográficas dos solos empregados no experimento de plantaisca com sementes de <i>Lupinus albus</i> L. e <i>Lupinus angustifolius</i> L.....	23
Tabela 2 – Massa dos solos utilizada em cada vaso e volume de água necessário para atingir a capacidade de campo.....	24
Tabela 3 – Volume dos reagentes utilizados na composição dos pontos da curva-padrão para quantificação dos compostos indólicos pelo método de Salkowski.....	30
Tabela 4 – Análise química dos solos empregados no experimento realizado em casa de vegetação, na etapa de prospecção de microrganismos nodulíferos e endofíticos por meio de duas espécies de tremoço.....	34
Tabela 5 – Classes texturais dos solos empregados no experimento, na etapa de prospecção em casa de vegetação, conforme Santos <i>et al.</i> (2018).....	35
Tabela 6 – Análise de variância para as variáveis comprimento da parte aérea (CPA), comprimento de raízes (CR), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca de raízes (MFR), e massa seca de raízes (MSR), em função da espécie de tremoço e da origem do solo.....	35
Tabela 7 – Número de plantas de <i>Lupinus</i> sp. contendo nódulos, coletadas aos 27 DAS, provenientes dos solos de diferentes origens empregados na etapa de prospecção em casa de vegetação.....	42
Tabela 8 – Estirpes bacterianas isoladas de nódulos de plantas de <i>Lupinus</i> sp., de quatro dos cinco solos utilizados na etapa de prospecção em casa de vegetação, aos 27 DAS.....	43
Tabela 9 – Identificação molecular baseada em sequências parciais do gene 16S rDNA de bactérias provenientes de nódulos de <i>Lupinus</i> sp. cultivados em solos de diferentes origens.....	45
Tabela 10 – Resumo dos resultados das análises in vitro quanto à habilidade das estirpes de bactérias como promotoras do crescimento de plantas: solubilização de fosfato, produção de sideróforos, produção de exopolissacarídeos (EPS) e produção de ácido indolacético (AIA).....	47
Tabela 11 – Resumo da análise de variância do percentual de germinação de sementes de tremoço branco <i>Lupinus albus</i> L. submetido à inoculação via sementes de 12 estirpes de bactérias e o controle sem inoculação.....	50
Tabela 12 – Resumo da análise da variância para as variáveis comprimento da raiz (CR), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento total de plântula (CT), massa fresca da parte aérea (MFA), massa fresca de raízes (MFR), massa fresca total de plântula (MFT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raízes (MSR), massa seca total de plântula (MST) e porcentagem de massa seca de plântula (PMS), de tremoço branco <i>Lupinus albus</i> L. submetido ao tratamento de sementes com 12 estirpes distintas de bactérias.....	51

Tabela 13 – Comparação de médias do comprimento da raiz primária (CR), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento total de plântula (CT), massa fresca da parte aérea (MFA), massa fresca de raízes (MFR), massa fresca tota de plântula (MFT) e matéria seca de plântula (MS), de tremço branco *Lupinus albus* L. submetido ao tratamento de sementes com 12 estirpes distintas de bactérias.....52

Tabela 14 – Comparação de médias do comprimento de raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raízes (MSR) entre as espécies de tremço ou entre os solos de diferentes origens.....66

Tabela 15 – Comprimento da parte aérea de plantas (CPA) de duas espécies de tremço cultivadas em solos de diferentes origens.....66

Tabela 16 – Massa fresca da parte aérea de duas espécies de tremço cultivadas em solos de diferentes origens.....67

Tabela 17 – Massa fresca de raízes de plantas de duas espécies de tremço cultivadas em solos de diferentes origens.....67

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 A CULTURA DO TREMOÇO	13
2.2 POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Lupinus</i> sp.....	14
2.3 O TREMOÇO COMO FATOR DE INCREMENTO DE BIODIVERSIDADE NOS AGROECOSSISTEMAS	15
2.4 A NODULAÇÃO E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN) EM <i>Lupinus</i> sp. 15	
2.4.1 Como a simbiose rizóbio-leguminosa é estabelecida?	16
2.4.2 Diversidade de rizóbios associados a <i>L. albus</i> e <i>L. angustifolius</i>	18
2.4.3 O nódulo como micro-habitat.....	19
2.5 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS (BPCP).....	19
2.5.1 Solubilização de fosfato	20
2.5.2 Síntese de ácido indolacético (AIA).....	20
2.5.3 Produção de exopolissacarídeos (EPS)	20
2.5.4 Produção de sideróforos.....	20
3. OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GERAL.....	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 DELINEAMENTO, INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO DE PLANTA-ISCA EM CASA DE VEGETAÇÃO	23
4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOMÉTRICOS	25
4.3 AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS SIMBIOTES	26
4.3.1 Desinfestação dos nódulos e isolamento de bactérias	26
4.3.2 Identificação molecular das estirpes bacterianas.....	26
4.4 AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DAS ATIVIDADES PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS.....	28
4.4.1 Habilidade de solubilização de fosfato inorgânico	28
4.4.2 Quantificação de compostos indólicos pelo método de Salkowski.....	29
4.4.3 Avaliação da produção de sideróforos por meio da estratégia de O-CAS ou “overlaid CAS”	30
4.4.4 Avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS)	31
4.5 EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS RADICULARES DE <i>Lupinus</i> sp. NA GERMINAÇÃO E VIGOR DE <i>L. albus</i> L.....	31
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SOLOS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	34
5.2 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS DE <i>L. albus</i> e <i>L. angustifolius</i> CULTIVADOS EM CINCO SOLOS DISTINTOS	35
5.3 NODULAÇÃO DE <i>Lupinus</i> sp. CULTIVADOS EM DIFERENTES SOLOS.....	42
5.4 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS ESTIRPES SELECIONADAS	46
5.5 DESEMPENHO DAS ESTIRPES DE BACTÉRIAS SOBRE A GERMINAÇÃO E O VIGOR DE SEMENTES DE <i>Lupinus albus</i> L.	50
6 CONCLUSões	55
REFERÊNCIAS	56

ANEXO A – TABELAS REFERENTES AOS TESTES DE COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DO EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO	66
--	-----------

1. INTRODUÇÃO

As projeções de crescimento da população mundial da Organização das Nações Unidas (ONU) projetam que até 2037 atinja-se 9 bilhões de pessoas, e 10 bilhões até 2058, o que implica no aumento da demanda por suprimentos, especialmente alimentos e energia, em um cenário de múltiplas adversidades à produção agrícola (Roser; Ritchie, 2023).

Esses obstáculos compreendem as perdas de solo: 24 bilhões de toneladas de solo fértil, correspondentes a 12 milhões de hectares, são perdidas a cada ano, e 25% dos solos agrícolas encontram-se degradados; as consequências das emergências climáticas instauradas e a finitude de recursos como os fertilizantes minerais, altamente demandados. Em conjunto, esses fatores intensificam os estresses bióticos e abióticos aos quais as culturas são expostas (Schwarzer, 2019).

As Fabaceae exercem elevada importância para a alimentação (humana e animal), produção de combustíveis, utilização como pastagens, e como contribuintes à fertilidade do solo na rotação de culturas, sendo as mais cultivadas depois dos cereais (Howieson *et al.*, 2016; Palmero *et al.*, 2022). A intensificação do cultivo de soja (*Glycine max* L. Merr.), entretanto, tem implicado na redução da diversificação dos sistemas produtivos, a qual é indispensável para a estabilidade da produção de alimentos a longo prazo, pois atua na mitigação da pegada ambiental decorrente da fertilização nitrogenada, redução da pressão de doenças e pragas, e melhoria da rentabilidade nos sistemas de produção agrícola (Musco *et al.*, 2017; Palmero *et al.*, 2022).

Nessa conjuntura, o tremço (*Lupinus* sp.), da família Fabaceae, Subfamília Faboideae, apresenta-se como importante alternativa para os sistemas agrícolas (Abraham *et al.*, 2019). É tolerante à deficiência de fósforo (P) e à toxicidade do alumínio (Al), condições frequentes e limitantes à maioria dos cultivos, em virtude da elevada intemperização dos solos brasileiros (Pueyo *et al.*, 2021; Quiñones; Lucas; Pueyo, 2022; Yamada; Nishida; Wasaki, 2022).

As sementes de *Lupinus* possuem diversas características de interesse e versatilidade de uso, por apresentarem alto teor de proteínas, elevados teores de fibras alimentares, presença de polifenóis, lipídeos (contendo ácidos graxos insaturados) e peptídeos bioativos; além de compostos com função medicinal e/ou nutracêutica (Hellal *et al.*, 2021; Pereira; Ramos; Sanches, 2022).

A utilização do tremço como planta de cobertura proporciona benefícios agronômicos, ambientais e econômicos, em vista do estabelecimento de simbiose com bactérias

fixadoras de nitrogênio, viabilizando a redução dos custos de produção, em razão da diminuição da fertilização mineral, e atenuando a acidificação do solo ocasionada por tal prática (Maia *et al.*, 2023; Musco *et al.*, 2017; Valente *et al.*, 2024).

A introdução do tremoço na rotação de culturas pode contribuir com a diversificação dos agroecossistemas, fomentando a sustentabilidade, e promover incrementos de produtividade às culturas subsequentes, de modo especial o milho, devido ao seu elevado requerimento por nitrogênio (De Lima *et al.*, 2013; Palmero *et al.*, 2022). Outro fator de destaque é sua adaptação ampla a diferentes condições ambientais, sobretudo ao se considerar o contexto atual de emergências climáticas (Pereira; Ramos; Sanches, 2022).

Ainda nessa perspectiva, os rizóbios e outras bactérias endofíticas não rizobiais que integram o microbioma dos nódulos radiculares da cultura promovem a saúde e a sobrevivência vegetal, principalmente em condições de estresse ambiental (Martínez-Hidalgo; Hirsch, 2017). Esses microrganismos podem desempenhar diferentes atividades como promotoras do crescimento de plantas, por exemplo a solubilização de fosfato, produção de sideróforos, produção de exopolissacarídeos e de compostos indólicos (Yu *et al.*, 2025). Neste contexto, a prospecção de microrganismos nodulíferos e endofíticos na cultura do tremoço em função do tipo de solo, pode elucidar, tanto os efeitos proporcionados às culturas, bem como fornecer embasamento para a melhoria do manejo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CULTURA DO TREMOÇO

O tremoço (*Lupinus* sp.) pertence à família Fabaceae, Subfamília Faboideae, tribo Genisteae, assim como o feijão, a soja e o grão-de-bico (Abraham *et al.*, 2019). O maior produtor mundial da cultura é a Austrália, responsável por 64% do total produzido, enquanto a Europa produziu outros 29% (Kouris-Blazos; Belski, 2016).

O gênero *Lupinus* é um dos mais importantes da família Fabaceae, visto que possui vasta diversidade de espécies (aproximadamente 275 espécies), classificadas em mediterrâneas ou do “Velho Mundo” e americanas ou do “Novo Mundo”. Os tremoços selvagens encontram-se por climas contrastantes, desde frios a quentes e de secos a úmidos, no entanto, os centros de diversidade compreendem as Américas, a região do Mediterrâneo e as regiões Leste e Norte africanas (Lamrabet *et al.*, 2022; Mellal *et al.*, 2019; Susek *et al.*, 2016). No Brasil, as espécies mais conhecidas são o tremoço-branco (*Lupinus albus* L.), o tremoço-azul (*Lupinus angustifolius* L.) e o tremoço-amarelo (*Lupinus luteus* L.), sendo que os dois últimos são mais adaptados à Região Sul do país.

As plantas de *L. albus* caracterizam-se como anuais, herbáceas e eretas, adaptadas a temperaturas entre 15 e 25 °C, apresentando ciclo de 50 a 120 dias até o florescimento e 180 dias até a colheita. As produtividades de fitomassas fresca e seca correspondem a 40 e 5 t ha⁻¹, respectivamente. O sistema radicular é do tipo pivotante e profundo (≥ 1 m), propiciando a melhoria das condições físicas do solo, bem como a fixação de em média 130 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de nitrogênio (De Lima Filho *et al.*, 2023).

O tremoço tolera a deficiência de fósforo (P) e a toxicidade por alumínio (Al), condições frequentes e limitantes à maioria dos cultivos, em virtude da elevada intemperização dos solos brasileiros. Para *Lupinus albus* L., essa tolerância ocorre em razão da morfologia ímpar de suas raízes, denominadas raízes de *cluster* (raízes em cachos), semelhantes a escovas de garrafa, as quais favorecem a absorção de P por apresentarem maior área superficial específica de raízes e, conseqüentemente, superior atividade de mobilização de P por meio da secreção de ácidos orgânicos, fosfatases, compostos fenólicos e prótons. A detoxificação ocorre mediante a formação de quelatos de ácidos orgânicos (málico e cítrico) com o Al³⁺ (Pueyo *et al.*, 2021; Quiñones; Lucas; Pueyo, 2022; Yamada; Nishida; Wasaki, 2022).

O *Lupinus angustifolius* L., sob deficiência de P, aumenta o número de raízes para elevar a capacidade de absorção do nutriente (Funayama-Noguchi; Noguchi; Terashima, 2015).

O tremço branco é suscetível à *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Erwinia* spp., *Colletotrichum gloeosporioides*, e à broca-das-axilas (*Crociosema aporema*) (De Lima Filho *et al.*, 2023).

2.2 POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DAS SEMENTES DE *Lupinus* sp.

As sementes de *Lupinus*, além de apresentarem alto teor de proteínas (35% de *L. angustifolius* e 38% de *L. albus*), possuem outros constituintes que motivam o seu uso, como os elevados teores de fibras alimentares, presença de polifenóis, lipídeos (contendo ácidos graxos insaturados) e peptídeos bioativos. Compostos com função medicinal e/ou nutracêutica foram identificados, atuando, por exemplo, na eliminação de radicais livres (antioxidante), como hipoglicemiante, metabólitos possuindo prolina, caprato, asparagina, lupinoisolona C, hidroxiisolupalbigenina, entre outros compostos (Hellal *et al.*, 2021; Johnson *et al.*, 2017; Lemus-Conejo *et al.*, 2023; Pereira; Ramos; Sanches, 2022).

Outras pesquisas têm demonstrado contribuições ao metabolismo energético, redução de doenças cardiovasculares, hipertensão, dislipidemia, anticonvulsivante e melhoria da função intestinal (Okagu *et al.*, 2021; Pereira; Ramos; Sanches, 2022).

Somado a todos os benefícios supramencionados do cultivo do tremço está o interesse crescente por alimentos *plant-based*, os quais são compostos por plantas em vez de derivados de origem animal, um movimento mundial fomentado por questões de saúde (limitações alimentares), opção alimentar e por serem ambientalmente mais sustentáveis (Abe-Inge *et al.*, 2024; Shen *et al.*, 2024). Nesse caso, pode ser utilizado na composição de farinhas isentas de glúten (Albuja-Vaca *et al.*, 2019) e no enriquecimento nutricional de outros alimentos (Curti *et al.*, 2022).

Embora existam diversos benefícios de seu uso como alimento, algumas desvantagens foram observadas em estudos, como o reduzido teor de aminoácidos enxofrados, e fatores antinutricionais, sobretudo, alcaloides quinolizidínicos (esparteína e lupanina), os quais podem ser prejudiciais aos animais e humanos, a depender da cultivar empregada e do modo de processamento (Musco *et al.*, 2017).

2.3 O TREMOÇO COMO FATOR DE INCREMENTO DE BIODIVERSIDADE NOS AGROECOSSISTEMAS

As espécies da família Fabaceae são de notável interesse para a alimentação humana e animal, em virtude do elevado teor de proteínas em suas sementes, o que justifica seu cultivo ser difundido mundialmente, sendo as mais cultivadas depois dos cereais (Palmero *et al.*, 2022). No entanto, a intensificação do cultivo de soja (*Glycine max* L. Merr.) tem ocasionado a redução da diversificação dos sistemas produtivos, algo indesejável, visto que a diversificação é condição *sine qua non* para assegurar a estabilidade da produção de alimentos a longo prazo, mitigando a pegada ambiental decorrente da fertilização nitrogenada, reduzindo a pressão de doenças e pragas e melhorando a rentabilidade nos sistemas de produção agrícola (Musco *et al.*, 2017; Palmero *et al.*, 2022).

A introdução do tremoço na rotação de culturas pode contribuir com a diversificação dos agroecossistemas, fomentando a sustentabilidade, concomitantemente, pode proporcionar incrementos em produtividade às culturas subsequentes, de modo especial o milho (De Lima *et al.*, 2013); Palmero *et al.*, 2022). Outro fator pertinente é sua adaptação ampla a diferentes condições ambientais, sobretudo ao se considerar o contexto atual de emergências climáticas (Pereira; Ramos; Sanches, 2022).

A utilização do tremoço como planta de cobertura oferece diversos benefícios agrônômicos e ambientais, especialmente por estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, propiciando a diminuição dos custos de produção, em razão da redução da fertilização mineral, e atenuando a acidificação do solo ocasionada por tal prática (Maia *et al.*, 2023; Musco *et al.*, 2017; Valente *et al.*, 2024).

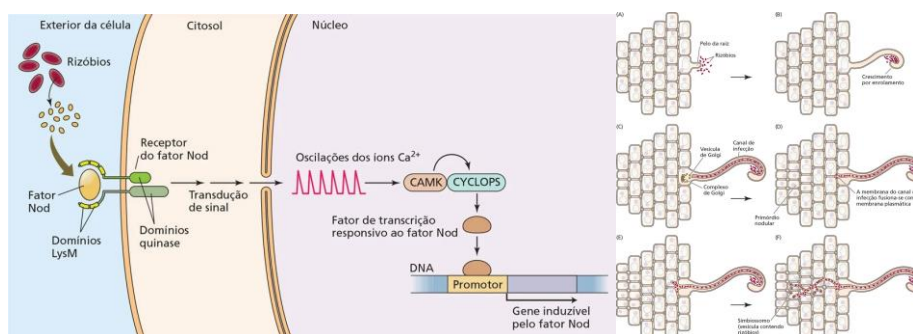
2.4 A NODULAÇÃO E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN) EM *Lupinus* sp.

As Fabaceae são capazes de estabelecer simbiose com bactérias diazotróficas, tais como rizóbios, as quais fixam nitrogênio atmosférico mediante infecção do córtex radicular e organogênese dos nódulos. Nesse processo endossimbiótico, o procarioto fornece o nitrogênio em forma assimilável para a planta, recebendo, em contrapartida, carboidratos e outros nutrientes (Taiz *et al.*, 2021). Essa atividade possui elevada importância nos agroecossistemas, pois 90% do nitrogênio fixado naturalmente é oriundo da FBN, propiciando a redução dos custos com insumos e melhorando as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (Jha *et al.*, 2022).

2.4.1 Como a simbiose rizóbio-leguminosa é estabelecida?

O processo de nodulação é iniciado em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio, quando a planta secreta exsudatos ricos em flavonoides e betaínas, com ação quimiotática para bactérias cognatas, que migram em direção à superfície radicular. Esses sinalizadores também ativam a proteína NodD de rizóbios compatíveis; essa proteína é um ativador transcricional de genes de nodulação (genes *nod*) bacterianos (Figura 1) (Luo; Liu; Xie, 2023; Taiz *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2022).

Figura 1 – Ilustração das etapas do processo de nodulação via infecção do pelo radicular



Fonte: Taiz *et al.* (2021)

A proteína NodD ativada se liga aos *nod boxes* (regiões promotoras de um operon), induzindo a transcrição de outros genes *nod*. Os genes *nod* são responsáveis pela codificação de proteínas de nodulação, que estão, majoritariamente, relacionadas à biossíntese de fatores Nod (sinalizadores compostos por oligossacarídeos lipoquitínicos) (Luo; Liu; Xie, 2023; Taiz *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2022).

Os receptores dos fatores Nod das Fabaceae são proteínas quinases que possuem um domínio extracelular LysM (motivo lisina). Após serem ativados pelos fatores Nod, ocorre a indução de oscilações nas concentrações de cálcio próximo ao núcleo das células epidérmicas das raízes; essa dinâmica é reconhecida por uma proteína quinase dependente de calmodulina/ Ca^{2+} . Depois disso, ocorre a associação do regulador de transcrição responsivo ao fator Nod a promotores de genes induzidos por este fator. Dentre as várias respostas elicítadas, estão o curvamento dos pelos radiculares, abertura lítica da parede celular e formação do cordão de infecção (Luo; Liu; Xie, 2023; Taiz *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2022).

Inicialmente, os fatores Nod induzem um acentuado enrolamento das células ao redor desses microrganismos. Também ocorre a degradação da parede celular nesse local,

viabilizando o acesso das células bacterianas externas à membrana plasmática (Luo; Liu; Xie, 2023; Taiz *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2022).

A formação do canal de infecção ocorre mediante a fusão de vesículas derivadas do Golgi no canal de infecção formando uma extensão tubular interna da membrana plasmática. Na região próxima ao xilema, ocorre a desdiferenciação das células corticais e o início da divisão delas, originando os primórdios nodulares, a partir dos quais os nódulos irão se desenvolver (Luo; Liu; Xie, 2023; Taiz *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2022).

A morfogênese do nódulo se dá pela divisão celular estimulada por uma sinalização localizada de citocinina (ativada pelos fatores Nod) na região do córtex e periciclo da raiz, que suprime, de modo localizado, o transporte polar de auxina. O canal de infecção, contendo os rizóbios em intensa multiplicação, alonga-se no interior do pelo radicular até o primórdio nodular, onde se funde à plasmalema de uma célula hospedeira, adentrando o citoplasma. As células bacterianas entram no citoplasma por meio de uma invaginação na membrana plasmática, formando os simbiossomos. No interior dos simbiossomos, cessa a divisão bacteriana e ocorre a diferenciação nas formas fixadoras de nitrogênio denominadas bacteroides (Luo; Liu; Xie, 2023; Taiz *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2022).

O nódulo passa a funcionar de modo similar a um sistema vascular, facilitando as trocas de nitrogênio fixado e fotoassimilados entre os bacteroides e a plantas. Ainda, a leghemoglobina é expressa em elevadas concentrações no citosol das células vegetais dos nódulos radiculares, conferindo-lhes a coloração vermelha característica. Essa proteína desempenha um papel essencial no transporte controlado de oxigênio (O_2) para os bacteroides em atividade respiratória, ao mesmo tempo em que mantém um ambiente microaeróbio no interior do nódulo. Esse equilíbrio é essencial visto que a FBN é um processo metabolicamente dispendioso, demandando elevados níveis de respiração para geração de ATP (Luo; Liu; Xie, 2023; Taiz *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021). Contudo, as nitrogenases – enzimas responsáveis pela redução do N_2 atmosférico – são altamente sensíveis à presença de O_2 . Dessa forma, a leghemoglobina atua como um regulador crítico, garantindo o equilíbrio entre o suprimento de O_2 para a respiração bacteriana e a proteção das nitrogenases contra a inibição oxidativa (Ong; O'Brian, 2024).

O complexo enzimático da nitrogenase é o responsável pela redução do N_2 a amônia, e é unicamente encontrado em procariotos. Ele é composto por uma Fe-proteína (ferro-proteína) e por uma MoFe-proteína (molibdênio, ferro- proteína). No processo, a ferredoxina doa elétrons para a Fe-proteína, a qual processa a hidrólise de ATP e a redução da MoFe-proteína. Na MoFe-

proteína é produzida NH_3 (amônia) a partir de N_2 e H^+ (Luo; Liu; Xie, 2023; Taiz *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2022).

A amônia precisa ser convertida em formas orgânicas ainda nos nódulos, para evitar a toxicidade. As Fabaceae podem exportar amidas (asparagina ou glutamina), como ocorre para as de clima temperado, a exemplo do tremoço-branco, da ervilha e da lentilha; ou ureídas (alantoína, ácido alantoico e citrulina), para as tropicais como a soja e o feijoeiro (Taiz *et al.*, 2021).

Foram constatadas, no entanto, algumas particularidades da nodulação de *Lupinus albus*. Nesse modelo, a infecção das raízes se dá de forma intercelular, entre a base do pelo radicular e a célula epidérmica subsequente, as bactérias se concentram entre as paredes celulares na superfície externa de uma célula cortical externa. A liberação das bactérias para o citoplasma ocorre por meio de paredes celulares com a estrutura alterada. A célula infectada passa por divisões sequenciais, ocorrendo a formação do primórdio do nódulo. Portanto, o nódulo lupinoide é resultado da divisão de uma única célula infectada e a zona central dos nódulos não possui células não infectadas (Coba De La Pena *et al.*, 2018; González-Sama *et al.*, 2004).

Nas células infectadas dos nódulos de tremoço-branco os simbiossomas são segregados igualmente entre as duas células-filhas, quando as células da planta passam por divisão, de modo análogo a organelas com as mitocôndrias. Evidências como essa indicam uma coevolução entre leguminosa e simbiote, e indícios da origem de uma organela destinada à fixação de nitrogênio (Coba De La Pena *et al.*, 2018; González-Sama *et al.*, 2004).

2.4.2 Diversidade de rizóbios associados a *L. albus* e *L. angustifolius*

As espécies *L. albus* e *L. angustifolius* tem como centro de origem a região Mediterrânea e foram lá domesticadas, sendo trazidas para América do Sul por colonizadores europeus entre os séculos XVI e XVII (Garg *et al.*, 2022).

A especificidade entre *L. albus* e rizóbios do gênero *Bradyrhizobium* já foi relatada em estudos conduzidos no Marrocos (Lamrabet *et al.*, 2022), Espanha, Chile (Velázquez *et al.*, 2010). Já em solos calcáreos da Tunísia, Tounsi-Hammami e colaboradores (2019), a nodulação foi atribuída aos gêneros *Agrobacterium*, *Rhizobium* e *Neorhizobium*. Outros autores ainda descreveram associações com microsimbiontes dos gêneros *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Microvirga* e *Devosia* (El Idrissi *et al.*, 2020; Msaddak *et al.*, 2021; Trujillo *et al.*, 2005; Valverde *et al.*, 2005).

2.4.3 O nódulo como micro-habitat

Por muitos anos, os rizóbios foram considerados os únicos procariotos a habitar nódulos radiculares. De fato, esses organismos são os colonizadores primários dos nódulos, responsáveis por sua organogênese. Contudo, os rizóbios e as demais bactérias associadas atuam de forma sinérgica como uma comunidade microbiana no interior dos nódulos radiculares, promovendo a saúde e a sobrevivência vegetal, especialmente sob condições de estresse ambiental (Martínez-Hidalgo; Hirsch, 2017). As bactérias endofíticas dos nódulos diferenciam-se dos rizóbios particularmente por não estabelecerem uma relação endossimbiótica, restringindo sua colonização aos espaços intercelulares (Yu *et al.*, 2025).

A composição do fitomicrobioma do nódulo é taxonomicamente variável e pode estar associada à composição dos exsudatos radiculares, que podem favorecer determinados microrganismos em detrimento de outros, assim como via produção de compostos de sinalização específicos (Massalha *et al.*, 2017; Nelson; Sadowsky, 2015; Smith; Praslickova; Ilangumaran, 2015). Os gêneros mais relatados incluem: *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Chitinophaga*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Niastella*, *Novosphingobium*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*, e *Streptomyces* (Yu *et al.*, 2025).

A comunidade endofítica dos nódulos radiculares podem favorecer o crescimento vegetal por meio de outros mecanismos além da FBN. Por isso, essas bactérias também podem ser denominadas bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP).

2.5 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS (BPCP)

As bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), podem favorecer o crescimento das plantas por diferentes mecanismos (Bhanse *et al.*, 2022; Gomes *et al.*, 2022; Oleńska *et al.*, 2020; Pérez-Montañó *et al.*, 2014). Dentre as principais atividades promotoras do crescimento de plantas, destacam-se:

2.5.1 Solubilização de fosfato

As BPCP podem contribuir para o maior aproveitamento do fósforo presente nos solos, disponibilizando-o de formas não-lábeis (irreversivelmente associado a partículas do solo), assim como o encontrado em formas orgânicas. Isso pode ocorrer por diferentes modos como a acidificação do pH na rizosfera, secreção de fosfatases e agentes quelantes (Backer *et al.*, 2018; Paiva *et al.*, 2022).

2.5.2 Síntese de ácido indolacético (AIA)

A fitoestimulação pode ocorrer por meio da síntese e secreção de fitormônios pelas BPCP, por exemplo o ácido indol-3-acético (AIA), citocininas e giberelinas, o que pode promover modificações na arquitetura radicular, estimulando o crescimento (Gupta *et al.*, 2015; Jha; Saraf, 2015; Pérez-Montaña *et al.*, 2014). Entre os efeitos verificados pela utilização de BPCP produtoras de auxina citam-se a indução da elongação radicular, incremento de biomassa de raízes, alterações transcricionais em genes relacionados a defesa e hormônios (Llorente; Alasia; Larraburu, 2016; Spaepen *et al.*, 2014).

2.5.3 Produção de exopolissacarídeos (EPS)

Os exopolissacarídeos consistem em polímeros de proteínas e carboidratos, como o ácido hialurônico e a goma xantana, e cada grupo de BPCP sintetiza diferentes EPS. Eles podem fornecer contribuições distintas às plantas e ao solo como integrar um biofilme hidrofílico envolvendo as raízes auxiliando na manutenção do potencial osmótico, protegendo as plantas da dessecação e das temperaturas elevadas, bem como melhorando a estrutura e agregação do solo. Dessa forma, podem aumentar expressivamente o volume de poros do solo proporcionando maiores taxas de infiltração de água e a diminuição da salinidade. Consequentemente, verifica-se o aumento da disponibilidade de nutrientes e água para as plantas (Gomes *et al.*, 2022).

2.5.4 Produção de sideróforos

A produção de sideróforos pelas BPCP contribui para a biodisponibilidade do ferro, que é um importante micronutriente para as plantas integrando citocromos, ferro-proteínas não-

heme da fotossíntese, além da respiração celular e fixação de nitrogênio (Taiz *et al.*, 2021; Wittenwiler, 2007). Os sideróforos atuam fixando-se à superfície do mineral e coordenando-o, de forma que se obtém um complexo solúvel, o qual pode ser reconhecido por receptores específicos (Kraemer; Crowley; Kretzschmar, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de bactérias rizóbicas e endofíticas isoladas de nódulos radiculares de duas espécies de tremçoço (*Lupinus albus* e *Lupinus angustifolius*) cultivadas em diferentes tipos de solo, quanto à promoção do crescimento vegetal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar rizóbios e bactérias endofíticas a partir de nódulos radiculares de *L. albus* e *L. angustifolius* cultivados em solos de diferentes origens;
- Avaliar o desempenho inicial das plantas de tremçoço (crescimento da parte aérea e radicular, massas fresca e seca) em casa de vegetação, em função dos solos e espécies utilizadas;
- Caracterizar os isolados bacterianos quanto à sua diversidade genética por meio do sequenciamento do gene 16S e BOX-PCR;
- Analisar as atividades de promoção de crescimento vegetal *in vitro* dos isolados bacterianos, incluindo produção de AIA, EPS, sideróforos e solubilização de fosfato;
- Avaliar o efeito da inoculação com os isolados selecionados nos testes de germinação e vigor de *L. albus*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO, INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO DE PLANTA-ISCA EM CASA DE VEGETAÇÃO

O experimento foi realizado em casa de vegetação pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Ponta Grossa – Ponta Grossa, Paraná, durante o período de 14 de agosto a 11 de setembro de 2023.

Os tratamentos foram constituídos por duas espécies de tremoço (*L. albus* L. e *L. angustifolius* L.) e solos oriundos de cinco sistemas de cultivo e de locais distintos, cujas coordenadas geográficas se encontram descritas na Tabela 1, constituindo um fatorial 2x5, com cinco repetições, totalizando 50 unidades experimentais, em delineamento inteiramente casualizado. As sementes de *L. albus* L. e *L. angustifolius* L. apresentavam 91 e 75% de germinação, respectivamente.

Tabela 1 - Origem e coordenadas geográficas dos solos empregados no experimento de planta-isca com sementes de *Lupinus albus* L. e *Lupinus angustifolius* L. Ponta Grossa/PR, 2023

Cidade de origem	Estado	Coordenadas geográficas
Almirante Tamandaré do Sul - AC	RS	28°05'16"S, 52°54'39"W
Tibagi - AC	PR	24°32'19"S, 50°26'23"W
Ponta Grossa - FESCON - APP	PR	25°05'36"S, 50°03'46"W
Ponta Grossa - FESCON – CDE-B6	PR	25°05'28"S, 50°03'44"W
Ponta Grossa - FESCON – AC	PR	25°05'25"S, 50°03'24"W

AC= Área Comercial; FESCON= Fazenda Escola Capão da Onça; APP= Área de Preservação Permanente. Fonte: a autora

Os solos foram coletados da camada de 0-20 cm, seguido de secagem em ambiente natural, destorroamento, homogeneização com o auxílio de um rolo plástico e, por fim, foram peneirados para a remoção de resíduos remanescentes. Em função das diferentes densidades dos solos, padronizou-se o volume dos vasos a ser preenchido, determinando-se as massas de cada solo em balança semi-analítica (Tabela 2).

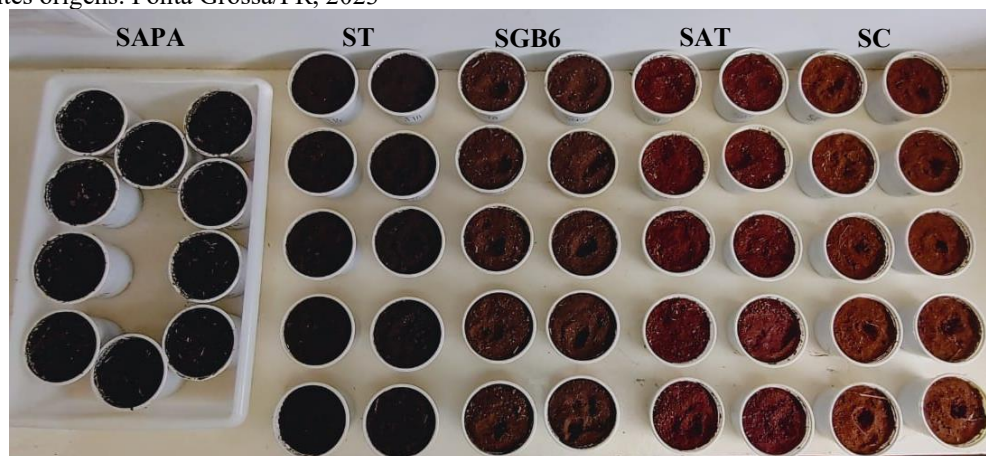
Tabela 2 - Massa dos solos utilizada em cada vaso e volume de água necessário para atingir a capacidade de campo. Ponta Grossa/PR, 2023

Cidade de origem	Massa de solo (g)	Volume de água para atingir a capacidade de campo (mL)
Almirante Tamandaré do Sul - AC	620	200
Tibagi - AC	500	148
Ponta Grossa - FESCON - APP	500	180
Ponta Grossa - FESCON – CDE-B6	620	250
Ponta Grossa - FESCON – AC	620	259

AC= Área Comercial; FESCON= Fazenda Escola Capão da Onça; APP= Área de Preservação Permanente. Fonte: a autora (2023). Fonte: a autora

Como unidade experimental utilizou-se vasos plásticos com capacidade de 500 mL (Figura 2), os quais foram perfurados em cinco pontos equidistantes, para a adequada drenagem da água de irrigação. Para evitar perdas de solo através desses orifícios, filtros de papel com retenção nominal de 2 µm, foram alocados no fundo dos vasos antes da adição dos solos. Foram preenchidos 10 vasos com cada solo (Figura 2), nos quais em cinco foram semeados o tremoço branco (*L. albus* L.) e nos outros cinco o tremoço azul (*L. angustifolius* L.). Não foi realizada a correção prévia da fertilidade dos solos.

Figura 2 – Foto dos recipientes após a semeadura, expressando a diversidade, inclusive de coloração, dos solos de diferentes origens. Ponta Grossa/PR, 2023



Fonte: a autora

A capacidade de campo dos solos foi determinada previamente, por meio do método de Peixoto, Pimenta e dos Reis (2020). Para isso, adicionou-se a copos descartáveis uma massa conhecida de solo, e a eles um volume pré-definido de água, deixando-os suspensos, coletando-

se a água excedente drenada (água gravitacional) até que cessasse esse processo e o solo estivesse na capacidade de campo. Posteriormente, esse volume de água foi aferido com o auxílio de uma proveta, assim como a massa dos solos úmidos. Com esses dados, calculou-se o volume necessário de água para que os solos atingissem a capacidade de campo quando irrigados.

As sementes passaram por desinfestação prévia, por meio de lavagem com água destilada; imersão em etanol 95% por um minuto; imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) 0,6% por 3 minutos; e dez etapas de lavagem com água destilada estéril, de forma a assegurar a remoção completa do NaClO.

A semeadura foi realizada no dia 14 de agosto de 2023, colocando-se quatro sementes por vaso a dois centímetros de profundidade. Após a emergência e estabelecimento das plântulas, realizou-se o desbaste, quando necessário, mantendo-se duas plantas por vaso. Os vasos foram irrigados depois da semeadura, visando elevar o nível de umidade à capacidade de campo dos solos (Tabela 2). Um dia após a semeadura, foram transferidos para casa a de vegetação, onde permaneceram durante 27 dias.

As irrigações foram efetuadas manualmente mediante a avaliação da necessidade, visando manter os solos em capacidade de campo. Por ocasião de cada irrigação, aferiu-se as massas de dois vasos de cada solo (um de cada espécie de tremoço), e calculou-se a massa média de água para elevar a umidade dos solos à capacidade de campo. Em três das oito irrigações foi fornecida solução nutritiva livre de nitrogênio (Hoagland; Arnon, 1950), para que não houvesse limitação nutricional das plantas.

4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOMÉTRICOS

As plantas foram cuidadosamente removidas dos vasos, e as raízes lavadas em água corrente, para retirar ao máximo o solo aderido. Posteriormente, foram aferidos, com régua graduada, o comprimento da parte aérea e das raízes. A massa fresca das raízes e das partes aéreas foram determinadas por pesagem em balança semi-analítica. Os nódulos foram coletados, lavados e armazenados em microtubos com adição de sílica, para conservação.

Na sequência, as plantas foram secas em estufa com circulação de ar a 60°C, até que atingissem massa constante para obtenção da massa seca.

4.3 AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS SIMBIONTES

4.3.1 Desinfestação dos nódulos e isolamento de bactérias

Os nódulos passaram por desinfestação, para remoção de microrganismos localizados na superfície externa, em câmara de fluxo laminar. Para tanto, os seguintes tratamentos foram adotados: imersão em etanol 70% por um minuto; imersão em solução de hipoclorito de sódio 3% por três minutos; dez etapas de lavagem com água destilada estéril, de forma a assegurar a remoção completa do hipoclorito.

Na última etapa de lavagem, macerou-se vigorosamente o nódulo, com o auxílio de uma alça tipo Drigalski formato T. Com essa mesma alça, o conteúdo do macerado foi inoculado em meio Yeast-Manitol-Agar (YMA), contendo o corante vermelho congo, de acordo com os métodos propostos por Howieson *et al.* (2016). As placas foram transferidas para a incubadora BOD, a 28°C, permanecendo durante o tempo necessário para o crescimento e isolamento das colônias.

Após o crescimento das colônias em meio YMA, selecionou-se aquelas que não absorveram corante do meio, ou seja, que permaneceram com tonalidades de branco a incolor, para serem reisoladas em novas placas contendo o mesmo meio de cultivo. As bactérias selecionadas foram armazenadas em tubos de ensaio contendo o mesmo meio inclinado, sob refrigeração.

A etapa seguinte consistiu em verificar a reação ácida/alcalina em meio YMA contendo o indicador azul de bromotimol (Howieson *et al.*, 2016).

4.3.2 Identificação molecular das estirpes bacterianas

As bactérias isoladas foram cultivadas em meio de cultivo YMA líquido sob agitação orbital (120 rpm) a 28°C até que se observasse a turbidez do meio, indicando o crescimento bacteriano. A extração do DNA total foi realizada utilizando o kit GenElute DNA Extraction Kit™ (Sigma Aldrich), segundo as recomendações do fabricante. A quantificação do DNA e verificação da integridade foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, a 80V.

4.3.2.1 Tipagem molecular por BOX-PCR

Para a tipagem molecular e verificação de presença de clones (*DNA fingerprinting*), utilizou-se o iniciador BOX-A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic *et al.*, 1994), seguindo as modificações de Batista *et al.* (2007). A reação foi conduzida em um volume final de 25 μL , contendo 13,8 μL de água Milli-Q estéril; 5,0 μL de dNTPs, (estoque com 1,5 mmol L^{-1} de cada base); 2,5 μL de tampão 10X (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4); 1,5 μL de MgCl (50 mmol L^{-1}); 1,0 μL de primer (50 pmol μL^{-1}); 1,0 μL de DNA (50 ng μL^{-1}) e 0,2 μL de Taq (5 U μL^{-1}).

A amplificação das sequências consistiu em: 1 ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 7 min; 30 a 35 ciclos de desnaturação (1 min a 94 °C), anelamento (1 min a 53 °C) e extensão (8 min a 65 °C); 1 ciclo de extensão final a 65 °C por 16 min; manutenção a 4 °C (Batista *et al.*, 2007).

Os amplicons foram separados por meio de gel de agarose 1,5% utilizando 1kb Plus Ladder da (Invitrogen) como peso molecular.

Os perfis obtidos foram analisados no programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v.7.6) para construção de um dendrograma utilizando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard com 2% de tolerância.

4.3.2.2. Amplificação e sequenciamento do gene 16S DNAr

Visando a identificação molecular em nível de gênero, o DNA total de cada isolado foi utilizado como molde para amplificação e sequenciamento do gene ribossomal 16S DNAr, utilizando os iniciadores universais fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg *et al.*, 1991). Para realizar a reação foi utilizado: 35,5 μL de água ultrapura estéril; 3,0 μL de dNTPs contendo 1,5 mmol de cada nucleotídeo; 5,0 μL de tampão 10X (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCL, pH 8,4); 1,5 μL de MgCl (50 mmol L^{-1}); 1,5 μL de cada um dos iniciadores (10 pmol μL^{-1}); 0,2 μL de Taq DNA polimerase (5U μL^{-1}) e 2,0 μL de DNA (50 ng μL^{-1}), em um volume final de 50 μL . A reação consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 2 minutos, 32 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 segundos, 93 °C por 45 segundos, anelamento a 55 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos e um ciclo final de extensão por 5 minutos. Os produtos de PCR (de

aproximadamente 1500pb) foram purificados utilizando o Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare).

Para o sequenciamento, os produtos de PCR purificados foram submetidos a uma nova amplificação, com ao menos dois dos seguintes iniciadores: 362F, 786F e 1492R (Hongoh; Ohkuma; Kudo, 2003; Suzuki; Giovannoni, 1996); a qual consistiu na adição de 3 µL de DNA ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$), 1,3 µL de BigDye (compatível com o sequenciador ABI3500XL, Applied Biosystems), 1 µL de iniciador (3,2 pmol), 2,5 µL de tampão 10x (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4) e 12,2 µL de H₂O ultrapura estéril, totalizando um volume de 20µL por reação. As amostras foram submetidas a um ciclo inicial de 96 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 96 °C por 15 s, 50 °C por 15 s e 60 °C por 4 min em termociclador (MJ Research Inc. PTC200). Depois de amplificadas, as amostras foram precipitadas (Menna *et al.*, 2006) e submetidas ao sequenciamento em ABI 3500XL (Applied Biosystems).

As sequências de bases nitrogenadas obtidas no sequenciamento foram analisadas com o programa Geneious v.7.1 (Biomatters). As sequências consenso geradas pelo alinhamento dos produtos de sequenciamento foram utilizadas para busca no banco de dados “rRNA/ITS” do NCBI, utilizando a ferramenta BlastN.

4.4 AVALIAÇÃO *in vitro* DAS ATIVIDADES PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS

Os pré-inóculos das bactérias foram preparados em erlenmeyers contendo meio Tryptone Soya Broth (TSB) (Himedia), com pH ajustado em 6,8. Para tanto, inoculou-se cada isolado em 15 mL do meio, seguido de incubação a 28 °C, 120 rpm, durante 72h. Transcorrido esse período, ajustou-se a densidade óptica no comprimento de onda de 630 nm (DO_{630}) para valores compreendidos no intervalo de 0,8 a 0,9, de forma a obter-se suspensões com concentrações equivalentes de células viáveis. Essas suspensões foram empregadas como inóculos nos testes descritos a seguir. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4.1 Habilidade de solubilização de fosfato inorgânico

Foi inoculado o volume de 0,5 µL de pré-inóculo em três pontos equidistantes em placas de Petri contendo meio de cultivo NBRIP (10 g L^{-1} de glicose, 5 g L^{-1} de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0,25 \text{ g L}^{-1}$ de KCl, $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de NH_4 , 5 g L^{-1} de fosfato de cálcio e 15 g L^{-1} de ágar) acrescido de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (5 g L^{-1}). As placas foram incubadas em BOD a 28 °C durante 7 dias. Transcorrido

o período previsto, avaliou-se a formação de halos de solubilização de fosfato (halos transparentes ao redor dos pontos de inoculação).

4.4.2 Quantificação de compostos indólicos pelo método de Salkowski

Para o ensaio de quantificação de compostos indólicos, 30 μL do pré-inóculo foi inoculado em 3 mL de meio líquido TSA com L-triptofano ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), em três repetições biológicas. A quantificação da produção de compostos indólicos seguiu o método colorimétrico descrito por Gordon e Weber (1951). As culturas foram centrifugadas a 12000 xg por 15 minutos; em seguida a 250 μL dos sobrenadantes foram acrescentados 1000 μL do reagente Salkowski (30 mL de ácido sulfúrico; 50 mL de água destilada; 1 mL de cloreto de ferro 0,5 M) (Gordon; Weber, 1951).

Após incubação por 30 minutos no escuro, em temperatura ambiente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (modelo Thermoscientific GENESYS 50), no comprimento de onda de 530 nm.

Para estimativa da quantidade de compostos indólicos foi construída uma curva de calibração com concentrações crescentes de ácido indolacético (AIA) sintético (Sigma Aldrich).

A curva de calibração para a quantificação dos compostos indólicos foi preparada conforme descrito na Tabela 3, a partir de uma solução estoque AIA na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Após a adição dos reagentes, os tubos foram homogeneizados em vórtex e incubados à temperatura ambiente, durante 30 minutos em local escuro. Posteriormente, realizou-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530 nm, iniciando-se pelo tubo com 0 μg , e efetuando-se as demais leituras em ordem crescente de concentração. Sob posse desses valores, foi obtida a equação da reta correspondente (Gordon; Weber, 1951), que foi utilizada para calcular a quantidade de AIA presente nos sobrenadantes dos cultivos bacterianos.

Tabela 3 - Volume dos reagentes utilizados na composição dos pontos da curva-padrão para quantificação dos compostos indólicos pelo método de Salkowski. Ponta Grossa/PR, 2024

Massa final de AIA (μg)	Volume de H_2O (μL)	Volume da solução estoque de AIA ($10 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) (μL)	Volume de reagente de Salkowski (mL)
0	500	0	2
10	499	1	2
20	498	2	2
30	497	3	2
40	496	4	2
50	495	5	2
60	494	6	2
70	493	7	2
80	492	8	2
90	491	9	2
100	490	10	2

AIA = Ácido indolacético. Fonte: a autora

4.4.3 Avaliação da produção de sideróforos por meio da estratégia de O-CAS ou “overlaid CAS”

Adicionou-se $0,5 \mu\text{L}$ de pré-inóculo (item 4.4) em três pontos equidistantes (triplicata) de cada placa (uma placa por estirpe), contendo meio de cultivo TSA. As placas foram incubadas em BOD por sete dias, a 28°C .

A solução de cromazurol S (CAS) foi preparada de acordo com Pérez-Miranda *et al.* (2007), agindo como revelador. Para um litro de solução foram utilizados: $60,5 \text{ mg}$ de CAS; $72,9 \text{ mg}$ de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HDTMA); $30,24 \text{ g}$ de Piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanossulfônico) (PIPES); e 1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 10 mM HCl ; Agarose ($0,9\%$, p/v), utilizada como agente gelificante e pH ajustado em 6,8.

Foram aplicados 20 mL da solução de revelação sobre as colônias de cada placa, e aguardou-se até sete dias, em temperatura ambiente, monitorando se houve formação do halo com mudança de cor ao redor das colônias, confirmativos da produção de sideróforos (Pérez-Miranda *et al.*, 2007). As colorações observadas podem variar de azul para roxo, indicando a presença de sideróforos do tipo catecol, ou de azul para laranja/amarelo, denotando a produção de hidroxamatos (Pérez-Miranda *et al.*, 2007).

4.4.4 Avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS)

A inoculação das estirpes ocorreu por meio da disposição de 3 discos de papel filtro, de 5 mm de diâmetro, contendo 3 μL de pré-inóculo, em placas contendo o meio de cultura acrescido de sacarose 10% (20,0 g L^{-1} de extrato de levedura, 15 g L^{-1} de K_2HPO_4 , 0,2 g L^{-1} de MgSO_4 , 0,015 g L^{-1} de MnSO_4 , 0,015 g L^{-1} de FeSO_4 , 0,03 g L^{-1} de CaCl_2 , 0,015 g L^{-1} de NaCl e 15,0 g L^{-1} de ágar). As placas foram incubadas em BOD a 28 °C, durante quatro dias.

A produção de EPS foi então avaliada com base na formação de uma colônia mucoide ao redor dos discos. A produção deste biopolímero pelos isolados foi confirmada pela mistura de uma porção da substância mucoide em 2 mL de álcool absoluto (Paulo *et al.*, 2012). O resultado foi considerado positivo quando o produto não se solubilizou e o solvente permaneceu límpido. Além disso, os diâmetros dos halos de produção de EPS foram aferidos com paquímetro.

4.5 EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS RADICULARES DE *Lupinus* sp. NA GERMINAÇÃO E VIGOR DE *L. albus* L.

Com o intuito de avaliar o efeito da inoculação dos isolados na germinação e vigor de sementes de tremço branco (*L. albus* L.), foram produzidos inoculantes a partir dos isolados, e as sementes inoculadas foram utilizadas nos testes de germinação e vigor. Foram utilizados 13 tratamentos (as 12 estirpes isoladas dos nódulos radiculares e o controle sem inoculação).

Os inoculantes foram obtidos a partir de colônias recentes dos isolados cultivadas em erlenmeyer contendo 15 mL de meio FORM15 (3 g L^{-1} de glicerol, 5 g L^{-1} de sucrose, 0,15 g L^{-1} de fosfato dipotássico, 5 g L^{-1} de extrato de levedura e 0,1 mL L^{-1} de solução nutritiva). A composição da solução nutritiva foi 0,14 g L^{-1} de ácido bórico, 0,12 g L^{-1} de sulfato de zinco, 0,12 g L^{-1} de sulfato de manganês, 0,10 g L^{-1} de molibdato de sódio, 0,004 g L^{-1} de sulfato de cobre (Oliveira *et al.*, 2017).

Os cultivos foram incubados a 28°C, 120 rpm, até atingirem a DO_{630} de 0,8, para a produção dos pré-inóculos. Adicionou-se 1,5 mL dos pré-inóculos em 15 mL de meio FORM15 para produzir os inoculantes, os quais foram incubados sob as mesmas condições dos pré-inóculos, até a DO_{630} 0,8.

A inoculação foi realizada em local fresco e sombreado, aplicando-se o inoculante na proporção de 100 mL para 50 kg de sementes, neste caso, 182 μL sobre 90,81 g de sementes (o

equivalente a 300 sementes), acondicionadas em sacos plásticos. Posteriormente, os sacos foram fechados, agitados para o completo recobrimento das sementes pelo inoculante, seguido de secagem. A testemunha foi submetida ao mesmo processo, recebendo o mesmo volume de água estéril em vez do inoculante.

O teste de germinação foi instalado de acordo com as Regras para análise de sementes (RAS) para temperatura e avaliação de plântulas (BRASIL, 2009). O teste foi realizado utilizando-se como substrato o papel Germitest[®], foram avaliadas 50 sementes por repetição, em um total de quatro repetições por tratamento. Os rolos de papel contendo as sementes foram acondicionados em câmara de germinação, sob incidência de luz artificial constante, a $\pm 20^{\circ}\text{C}$, por um período de sete dias. Após isso, procedeu-se a contagem do número de plântulas normais. Os dados foram expressos em porcentagem (BRASIL, 2009).

No teste de vigor foi avaliado o crescimento das plântulas por meio do comprimento e fitomassa fresca e seca de plântulas. Esse teste foi instalado em papel Germitest[®], seguindo o método proposto por Krzyzanowski *et al.* (1991). As sementes foram dispostas 2 cm abaixo da borda superior do papel, em número de 10 por repetição, totalizando cinco repetições por tratamento. Os rolos de papel foram dispostos em câmara de germinação envolta por plástico preto (para evitar o efeito da luz sobre as plântulas), sob temperatura de $\pm 20^{\circ}\text{C}$, por um período de sete dias.

Na avaliação desse teste, foram consideradas somente as plântulas normais, para as quais mensurou-se o comprimento de raiz, parte aérea e da plântula inteira. Posteriormente, determinou-se a massa fresca de raízes, parte aérea e da plântula inteira. Na sequência, essas foram secas em estufa com circulação de ar forçada, à temperatura de 65°C por 24 h (período suficiente para que atingissem massa constante), a qual foi determinada em balança semi-analítica. Os valores de porcentagem de massa seca, foram obtidos pelo quociente percentual entre massa seca e a massa fresca. Os resultados foram apresentados considerando os valores médios por plântula.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada em software R[™], por meio do pacote easyanova (Arnhold, 2013). Inicialmente, foi feita a verificação quanto à presença de outliers, depois o atendimento aos pressupostos da Análise de Variância (ANOVA) de normalidade dos resíduos e homocedasticidade das variâncias.

Ao serem atendidos os pressupostos, procedeu-se a ANOVA. Entretanto, quando isso não ocorreu, realizou-se a transformação de dados de Boxcox previamente. Para o experimento fatorial (solos de diferentes locais e espécies de tremoço) desenvolvido em casa de vegetação, quando houve interação significativa entre os fatores, efetuou-se os desdobramentos de solos dentro de espécies e espécies dentro de solos, e a comparação de médias pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância. Para as variáveis em que não ocorreu interação, a comparação de médias foi feita, sob os mesmos critérios, apenas para os fatores em que houve diferença significativa entre os tratamentos.

A análise das etapas sequenciais desenvolvidas em laboratório, bem como dos testes de germinação e vigor, seguiu a mesma sequência supracitada (para delineamento inteiramente casualizado), assim como o mesmo teste de comparação de médias e nível de significância, quando houve diferença significativa na ANOVA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SOLOS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO

Na Tabela 4 é apresentada a análise química dos solos empregados no experimento em casa de vegetação. Os valores de acidez dos solos estudados foram em geral intermediários, com exceção do solo da área de preservação permanente (SAPA), no qual encontrava-se elevada. Valores de pH em água situados entre 5,5 e 6,5 constituem o melhor intervalo para a disponibilização simultânea de macro e micronutrientes (Lucas; Davis, 1961; Malavolta, 1989).

Tabela 4 - Análise química dos solos empregados no experimento realizado em casa de vegetação, na etapa de prospecção de microrganismos nodulíferos e endofíticos por meio de duas espécies de tremoço. Ponta Grossa/PR, 2024

Solo	pH em H ₂ O	pH em CaCl	H+Al	Al	Ca	Mg	K	P	COT	MO	V (%)
			cmol _c dm ⁻³			mg dm ⁻³		g dm ⁻³		%	
SGB6	5,66	4,72	5,63	0,17	3,20	0,55	0,57	7,79	18,03	3,10	43,4
ST	5,79	5,00	8,94	0,08	5,22	0,57	0,32	2,78	32,04	5,51	40,5
SC	5,38	4,15	8,68	0,03	4,78	0,80	0,53	22,58	19,51	3,36	41,3
SAT	5,82	5,24	4,75	0,60	2,06	0,30	1,45	5,32	19,03	3,27	44,5
SAPA	4,76	3,75	16,58	0,39	2,58	0,84	0,66	9,16	17,99	3,09	19,7

SGB6= solo da gleba B6 (FESCON). ST= Solo de Tibagi-PR. SC= solo de área comercial da Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON). SAT= solo de Almirante Tamandaré do Sul-RS. SAPA= solo de área de preservação (FESCON). COT= carbono orgânico total. MO= teor de matéria orgânica do solo. V (%) = saturação por bases.

Fonte: a autora

Os teores de alumínio (Al) estavam baixos, exceto o do solo de Almirante Tamandaré do Sul-RS (SAT), que apresentou teor médio. Os níveis de cálcio (Ca) foram altos no solo de Tibagi-PR (ST) e no solo de área comercial da Fazenda Escola Capão da Onça (SC); e dentro da faixa adequada nos demais solos. Os teores de magnésio (Mg) estavam médios nos solos da gleba B6 da Fazenda Escola Capão da Onça (SGB6), ST e SC, baixo no SAT e alto no SAPA. Nos solos SGB6, ST e SC os teores de potássio (K) estavam altos e muito altos nos solos SAT e SAPA. Os teores de fósforo (P), encontravam-se muito baixos no ST, baixos no SAT, médios nos SGB6 e SAPA, e muito alto no SC (Pauletti; Motta, 2017).

Semelhante à variação observada quanto às características químicas, as classes texturais dos solos analisados variaram desde média nos solos SC e SGB6 até argilosa do SAT (Tabela 5).

Tabela 5 – Classes texturais dos solos empregados no experimento, na etapa de prospecção em casa de vegetação, conforme Santos *et al.* (2018). Ponta Grossa/PR, 2024

Amostras	Areia	Silte	Argila	Classe textural
	g kg ⁻¹			
SGB6	694,28	107,92	197,80	Média
ST	144,53	550,94	304,53	Siltosa
SC	556,53	147,98	295,50	Média
SAT	147,56	369,44	483,00	Argilosa
SAPA	-	-	-	-

SGB6= solo da gleba B6 (FESCON). ST= Solo de Tibagi-PR. SC= solo de área comercial da Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON). SAT= solo de Almirante Tamandaré do Sul-RS. SAPA= solo de área de preservação (FESCON). COT= carbono orgânico total. MO= teor de matéria orgânica do solo. V (%) = saturação por bases. Os dados referentes à textura do SAPA foram inconsistentes.

Fonte: a autora

5.2 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS DE *L. albus* e *L. angustifolius* CULTIVADOS EM CINCO SOLOS DISTINTOS

A análise de variância indicou interação significativa entre os fatores espécie de tremoço e origem dos solos para as variáveis comprimento da parte aérea (CPA), massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa fresca de raízes (MFR). Diferenças significativas foram verificadas entre os tratamentos para o fator espécie de tremoço para a variável comprimento de raízes (CR), e de ambos os fatores, separadamente, para as variáveis massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raízes (MSR) (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise de variância para as variáveis comprimento da parte aérea (CPA), comprimento de raízes (CR), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca de raízes (MFR), e massa seca de raízes (MSR), em função da espécie de tremoço e da origem do solo. Ponta Grossa/PR, 2024

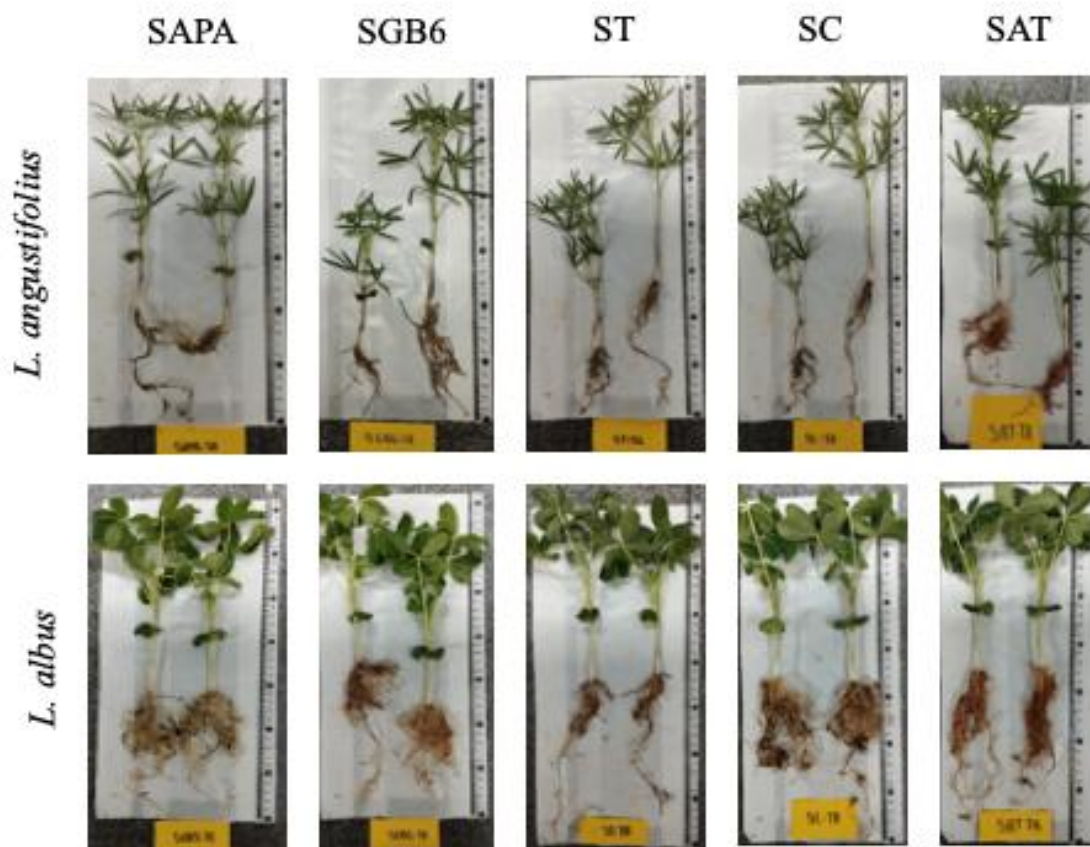
Fonte de variação	GL	Quadrado Médio (Q.M.)					
		CPA	CR	MFPA	MSPA	MFR	MSR
ET	1	1,22 ^{ns}	427,30 ^{***}	107,62 ^{***}	1,52 ^{***}	15,53 ^{***}	4,32 ^{***}
SDO	4	19,65 ^{**}	20,94 ^{ns}	2,36 ^{***}	0,05 ^{***}	2,19 ^{***}	5,22 ^{***}
ET x SDO	4	16,42 ^{**}	3,26 ^{ns}	1,23 [*]	0,01 ^{ns}	0,91 ^{**}	0,36 ^{ns}
Resíduo	38	4,22	12,27	0,32	0,01	0,19	0,19
CV (%)		10,47	21,58	14,65	16,54	27,35	22,38

^{ns}= não significativo; ^{*} significativo a 5% de probabilidade, ^{**} significativo a 1% de probabilidade, ^{***} significativo a 0,1% de probabilidade. SDO= Solos de diferentes origens. ET= Espécies de tremoço. CV= coeficiente de variação. GL= graus de liberdade.

Os coeficientes de variação (CV) encontrados demonstraram alta homogeneidade dos dados e precisão experimental para a variável CPA, mediana para as variáveis MFPA e MSPA.

No entanto, para as variáveis CR, MFR e MSR a homogeneidade dos dados foi baixa, consequentemente a variação ao acaso foi alta (Pimentel Gomes, 2009), o que pode ser atribuído ao vigor das sementes utilizadas, uma vez que, foram semeadas cinco sementes por unidade experimental (UE) e, posteriormente à emergência das plântulas, realizou-se o desbaste deixando-se as duas melhores plântulas por UE, o que pode ter repercutido em grandes variações. Além disso, as diferenças das características físico-químicas dos solos, podem ter contribuído de modo distinto na disponibilidade de nutrientes e resistência à emergência e desenvolvimento das plântulas. Tal hipótese relaciona-se com a desuniformidade observada na emergência das plântulas, consequentemente no tamanho das plantas na UE, principalmente do *L. angustifolius* (Figura 3).

Figura 3 – Plantas representativas de cada tratamento, coletadas aos 27 DAS. Ponta Grossa/PR, 2023

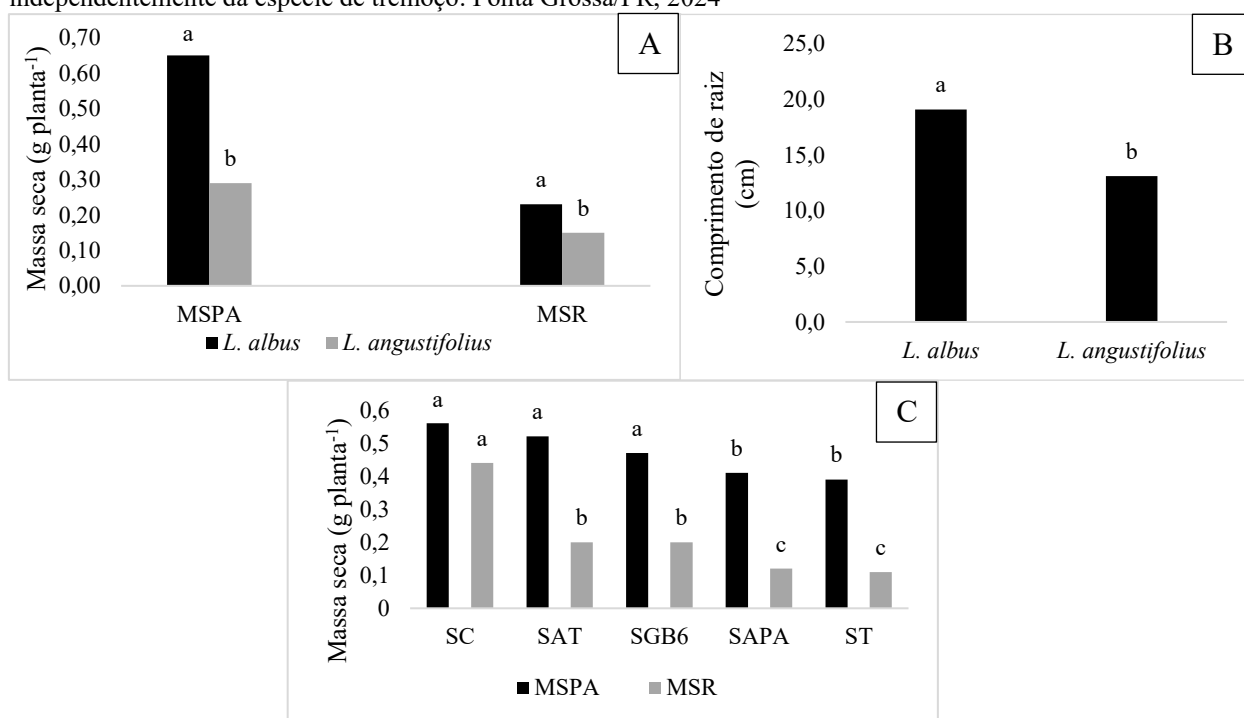


SAPA= solo de área de preservação (FESCON). SGB6= solo da gleba B6 (FESCON). ST= Solo de Tibagi-PR. SC= solo de área comercial da Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON). SAT= solo de Almirante Tamandaré do Sul-RS. Fonte: a autora

A espécie *L. albus*, independentemente da origem do solo, demonstrou valores para as variáveis MSPA, MSR e CR superiores em média 55,38, 34,78 e 31,41% à espécie *L. angustifolius*, respectivamente (Figuras 4A e 4B). As diferenças observadas caracterizam

variabilidade genética, constatada pelas diferenças morfológicas entre as espécies de tremoço (Figura 3), uma vez que, a largura dos folíolos das folhas do *L. albus* é muito maior que a do *L. angustifolius*, bem como o *L. albus* apresentou em média maior densidade de raízes, porém mais curtas que o *L. angustifolius*, conforme descrito por Clements, White e Buirchell (1993).

Figura 4 – Comparação de médias da massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raízes (MSR) entre as espécies de tremoço (A); do comprimento de raiz (CR) (B) independentemente do solo onde foram cultivados; e da massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raízes (MSR) entre os solos de diferentes origens (C) independentemente da espécie de tremoço. Ponta Grossa/PR, 2024



*Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. SC= solo de área comercial da Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON). SAT= solo de Almirante Tamandaré do Sul-RS. SGB6= solo da gleba B6 (FESCON). SAPA= solo de área de preservação (FESCON). ST= Solo de Tibagi-PR. Fonte: a autora

A MSPA de plantas de tremoço, avaliada aos 27 dias de ciclo, foi influenciada pela origem dos solos (Tabela 6). Quando cultivadas nos solos SC, SAT e SGB6, independentemente da espécie de tremoço, a MSPA foi superior em relação ao cultivo nos ST e SAPA (Figura 4C). A variável MSR, por sua vez, foi a que apresentou maior variação, tendo sido superior no SC, independentemente da espécie, expressando valores 2,2 vezes maiores do que quando cultivados nos SAT e SGB6 e, em média 3,7 vezes maiores que quando cultivados nos SAPA e ST (Figura 4C).

Os resultados demonstraram que a variação da textura (Tabela 5) e das características químicas do solo (Tabela 4), influenciaram a taxa de crescimento das plantas. Resultados de algumas pesquisas demonstraram que a textura média do solo é recomendada para a cultura do

tremoço (Lema; Soengas, 2023; Rodés-Bachs; Van der Fels-Klerx, 2023), o que pode justificar o maior acúmulo de massa seca, tanto de raízes como de parte aérea quando do cultivo do tremoço no SC, o qual apresenta textura média (Tabela 5).

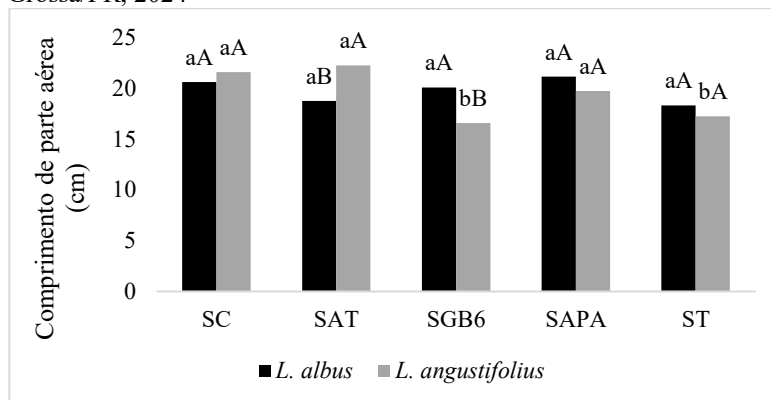
Outro fator que pode ter contribuído para o melhor desenvolvimento das plantas no SC foi o baixo valor de pH (5,38) verificado na Tabela 4, menos acentuado, entretanto, que o do solo SAPA. Diferentes autores relataram que a espécie *L. albus* se desenvolve melhor em solos fortemente ácidos a neutros, e que *L. angustifolius* possui melhor desenvolvimento em solos ácidos (pH em água entre 5,0 e 5,5) (Tang *et al.*, 1993), de modo que valores de pH em CaCl_2 superiores à 5,5 seriam um fator limitante ao desenvolvimento radicular da espécie (Alemu; Asmare; Yeheyis, 2019; Lema; Soengas, 2023; Rodés-Bachs; Van der Fels-Klerx, 2023).

A maior MSR apresentada pela cultura do tremoço no SC aos 27 DAS (Figura 4C), pode estar relacionada ainda ao nível elevado de fósforo neste solo em relação aos demais (Tabela 4). O fósforo é um macronutriente, sua essencialidade para o desenvolvimento vegetal se justifica, dentre outros parâmetros, por desempenhar funções estruturais, integrando os fosfolipídeos da plasmalema e das demais organelas celulares e por integrar compostos metabólicos, tais como açúcares fosfatados, intermediários da fotossíntese e respiração celular, ácidos nucleicos (DNA e RNA), bem como o ATP e NADPH, entre outras. Além disso, é indispensável para que a fixação biológica do nitrogênio se processe adequadamente, considerando que, para cada N_2 ser reduzido à dois NH_4^+ , são requeridas 16 moléculas de ATP pelo complexo da enzima nitrogenase (Taiz *et al.*, 2021).

O desempenho inferior de MSR verificado quando as plantas foram cultivadas no SAPA pode se justificar, dentre outros fatores, pelos teores de alumínio (Al^{3+}) que estavam em níveis superiores aos demais solos (Tabela 4), o que pode ter reduzido o acúmulo de massa seca nas raízes, consequentemente a absorção de água e nutrientes, repercutindo em menor MSPA (Figura 4C). Tal premissa tem como sustentação o fato do Al^{3+} , forma disponível na solução do solo e absorvida pelas plantas, ser comprovadamente tóxica, fazendo com que os sintomas iniciais e mais nocivos sejam sobre o crescimento e desenvolvimento das raízes (Finger, 2025; Taiz *et al.*, 2021).

Ao comparar as médias do CPA das duas espécies de tremoço em cada um dos cinco solos, verificou-se diferença significativa entre as espécies de tremoço quando cultivadas nos SAT e SGB6, sendo que o CPA do *L. angustifolius* foi em média 18,67% maior que o do *L. albus* quando cultivados no SAT, todavia, foi em média 17,33% inferior ao *L. albus* quando cultivado no SGB6 (Figura 5).

Figura 5 - Comprimento da parte aérea de plantas (CPA) de duas espécies de tremoço cultivadas em solos de diferentes origens. Ponta Grossa/PR, 2024

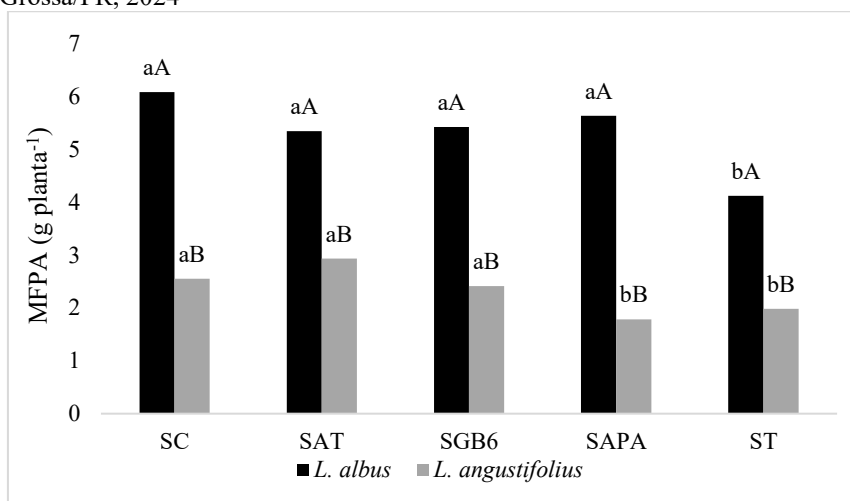


*Médias seguidas da mesma letra minúscula entre as colunas de mesma cor e maiúscula entre as colunas de cores distintas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. SC= solo de área comercial da Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON). SAT= solo de Almirante Tamandaré do Sul-RS. SGB6= solo da gleba B6 (FESCON). SAPA= solo de área de preservação (FESCON). ST= Solo de Tibagi-PR. Fonte: a autora.

Esse desempenho de *L. angustifolius* diverge dos resultados de outros pesquisadores, uma vez que o solo SAT é de textura argilosa e apresenta o maior valor de pH dentre os solos estudados, enquanto as condições descritas como ideais ao seu cultivo são pH baixo e solos de textura média (Chen Yinglong *et al.*, 2014).

Considerando a significância da interação entre espécies de tremoço x origens dos solos e, desdobrando-se o fator espécies de tremoço em cada solo, a espécie *L. albus* apresentou maior MFPA em todos os cinco solos, produzindo em média 238,43; 182,25; 224,90; 316,29 e 208,08% mais MFPA que a espécie *L. angustifolius*, para os SC, SAT, SGB6, SAPA e ST, respectivamente. Como pode-se observar, a maior diferença entre as espécies de tremoço foi observada quando cultivadas no SAPA (Figura 6). Essa diferença expressiva pode ser atribuída à variabilidade genética entre espécies, principalmente no que diz respeito às diferenças morfológicas observadas até os 27 DAS, quando foi realizada a avaliação (Figura 3).

Figura 6 - Massa fresca da parte aérea (MFPA) de duas espécies de tremoço cultivadas em solos de diferentes origens. Ponta Grossa/PR, 2024

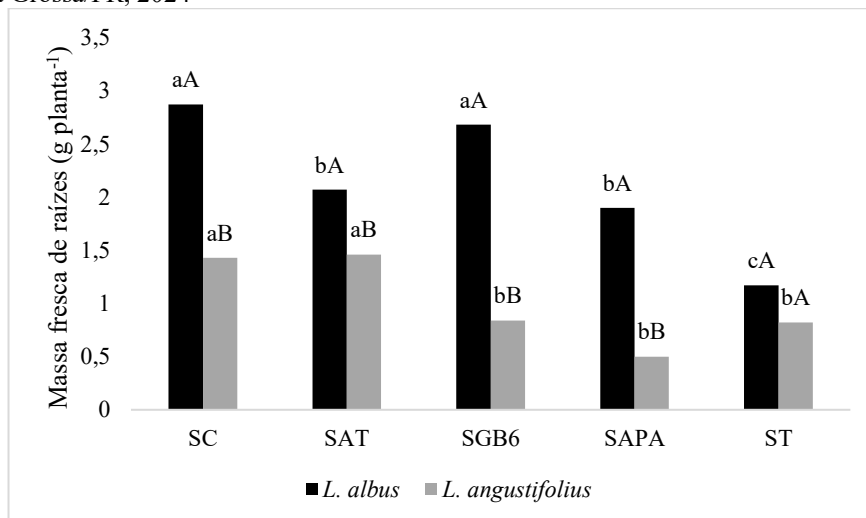


*Médias seguidas da mesma letra minúscula entre as colunas de mesma cor e maiúscula entre as colunas de cores distintas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. SC= solo de área comercial da Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON). SAT= solo de Almirante Tamandaré do Sul-RS. SGB6= solo da gleba B6 (FESCON). SAPA= solo de área de preservação (FESCON). ST= Solo de Tibagi-PR. Fonte: a autora.

A MFPA da espécie *L. albus* não diferiu entre os solos oriundos de SC, SAPA, SGB6 e SAT, no entanto, quando cultivado no solo ST a MFPA foi menor em 32,24; 22,85; 23,99 e 26,82%, respectivamente aos solos supracitados. *L. angustifolius*, por sua vez, expressou médias de MFPA superiores (e estatisticamente iguais), quando cultivado nos solos SAT, SC e SGB6, em relação aos solos ST e SAPA (Figura 6).

A espécie *L. albus* demonstrou maior MFR em relação à *L. angustifolius* quando cultivada em quatro dos cinco solos testados, exceto no solo ST, para o qual não houve diferença de MFR entre as duas espécies de tremoço (Figura 7). Ao avaliar-se cada espécie nos diferentes solos, enquanto a espécie *L. albus* apresentou as maiores médias de MFR quando cultivada nos solos SC e SGB6, a espécie *L. angustifolius* evidenciou os maiores valores para essa variável nos SAT e SC (Figura 7).

Figura 7 - Massa fresca de raízes (MFR) de plantas de duas espécies de tremoço cultivadas em solos de diferentes origens. Ponta Grossa/PR, 2024



*Médias seguidas da mesma letra minúscula entre as colunas de mesma cor e maiúscula entre as colunas de cores distintas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. SC= solo de área comercial da Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON). SAT= solo de Almirante Tamandaré do Sul-RS. SGB6= solo da gleba B6 (FESCON). SAPA= solo de área de preservação (FESCON). ST= Solo de Tibagi-PR. Fonte: a autora.

Os valores superiores de massa fresca e seca apresentados por *L. albus* em relação à *L. angustifolius* avaliadas aos 27 DAS (Figuras 4, 6 e 7), contrapõem-se aos valores observados para as mesmas espécies ao serem avaliadas em fase mais avançada do ciclo de vida e, cultivadas no sudoeste do Paraná (EMBRAPA, 1986).

As variáveis analisadas neste estudo, em geral, demonstraram menores desempenhos quando cultivadas nos ST e SAPA. Dentre as possíveis causas, salienta-se a textura siltosa (Tabela 5), que pode apresentar limitações à drenagem durante as irrigações, embora o fornecimento de água tenha se processado observando-se à manutenção da capacidade de campo. Sob baixa disponibilidade de oxigênio, ocorre a limitação da respiração radicular, reduzindo a produção de ATP, essencial para a manutenção da atividade das proteínas bomba (H^+ -ATPases), geradoras do gradiente de potencial eletroquímico nas membranas, o qual é indispensável para a absorção dos nutrientes e o desenvolvimento adequado das plantas (Taiz *et al.*, 2021).

No que diz respeito ao teor elevado de matéria orgânica no ST, ainda que contenha valores elevados de nitrogênio, e isso possa ser considerado um fator prejudicial à fixação biológica, visto que a simbiose se estabelece somente sob níveis limitantes de nitrogênio nos solos (Taiz *et al.*, 2021), a quantidade prontamente disponível desse nutriente na solução do solo é dependente da atividade microbiana e esta, por sua vez, é dependente de fatores como pH, textura, umidade, temperatura (Havlin *et al.*, 2016).

5.3 NODULAÇÃO DE *Lupinus* sp. CULTIVADOS EM DIFERENTES SOLOS

De um total de 68 plantas que apresentaram nodulação na ocasião da avaliação do experimento (aos 27 DAS), 22 eram da espécie *L. angustifolius* e 46 de *L. albus*. Ao relacioná-las ao solo onde foram cultivadas, o maior número foi verificado para o SC (17 plantas), e o menor para o SAPA (9 plantas), conforme representado na Tabela 7.

Tabela 7 - Número de plantas de *Lupinus* sp. contendo nódulos, coletadas aos 27 DAS, provenientes dos solos de diferentes origens empregados na etapa de prospecção em casa de vegetação. Ponta Grossa/PR, 2024

Tratamentos	Número de plantas com nódulos
Espécie de tremoço	
<i>Lupinus albus</i>	46
<i>Lupinus angustifolius</i>	22
Origem dos solos	
SC	17
SAT	15
SGB6	15
SAPA	9
ST	12

SC= solo de área comercial da Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON). SAT= solo de Almirante Tamandaré do Sul-RS. SGB6= solo da gleba B6 (FESCON). SAPA= solo de área de preservação (FESCON). ST= Solo de Tibagi-PR. Fonte: a autora

Posteriormente às etapas de triagem (cultivo em meio YMA contendo vermelho congo), foram selecionadas 12 estirpes de bactérias, as quais estão descritas na Tabela 8, de acordo com a origem do solo e a espécie de tremoço. Nove delas foram coletadas de nódulos das raízes de *L. albus* e três de *L. angustifolius*, sendo cinco provenientes de plantas de tremoço cultivadas no SGB6 (Tabela 8). O SGB6 é um solo no qual o *L. albus* já havia sido cultivado anteriormente, o que pode ter contribuído para a facilitação da simbiose. Cabe ressaltar que diversos nódulos se deterioraram durante o armazenamento e não foi possível isolar as bactérias contidas neles.

Tabela 8 – Estirpes bacterianas isoladas de nódulos de plantas de *Lupinus* sp., de quatro dos cinco solos utilizados na etapa de prospecção em casa de vegetação, aos 27 DAS. Ponta Grossa/PR, 2024

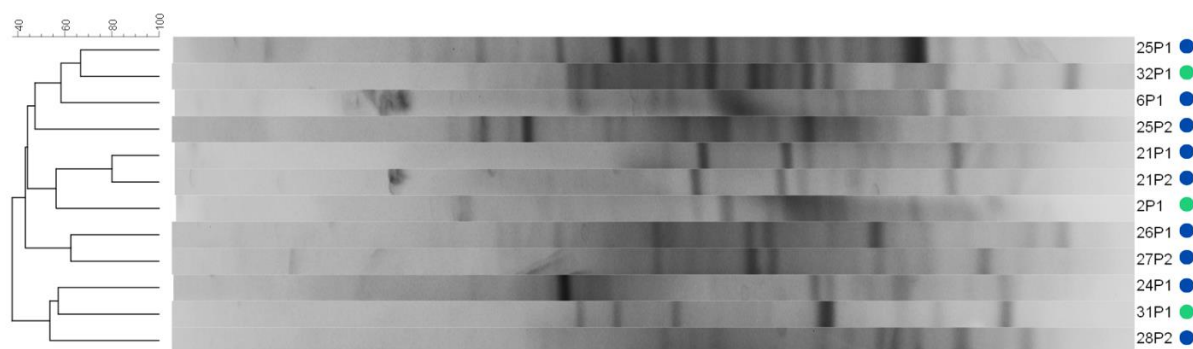
Origem dos solos	Espécies	Estirpes	
SAT	<i>L. angustifolius</i>	2P1	
SAT	<i>L. albus</i>	6P2	
SAPA	<i>L. albus</i>	21P1	21P2
SAPA	<i>L. albus</i>	24P1	
SGB6	<i>L. albus</i>	25P1	25P2
SGB6	<i>L. albus</i>	26P1	
SGB6	<i>L. albus</i>	27P2	
SGB6	<i>L. albus</i>	28P2	
SC	<i>L. angustifolius</i>	31P1	
SC	<i>L. angustifolius</i>	32P1	

SC= solo de área comercial da Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON). SAT= solo de Almirante Tamandaré do Sul-RS. SGB6= solo da gleba B6 (FESCON). SAPA= solo de área de preservação (FESCON). ST= Solo de Tibagi-PR. P1= planta um. P2= planta dois, de um vaso. Fonte: a autora

A técnica de *DNA-fingerprinting* por BOX-PCR foi utilizada para avaliar o grau de polimorfismo e identificação clonal. Os perfis de BOX-PCR revelaram um elevado grau de polimorfismo entre os microssimbiontes de *Lupinus* sp., visto que foi possível verificar a ocorrência de perfis únicos para todas as estirpes (Figura 8). Além disso, os agrupamentos formados não foram consistentes com as espécies de *Lupinus* e/ou com os solos de origem; ou seja, mesmo sendo isolados de um mesmo solo de origem e espécie hospedeira, os isolados evidenciaram genótipos únicos.

As estirpes 21P1 e 21P2, ambas isoladas de nódulos de *L. albus* cultivado em SAPA foram agrupadas com similaridade superior a 80%. Por outro lado, as estirpes 26P1 e 27P2, também isoladas de *L. albus* cultivado em SGB6, apresentaram perfis agrupados com cerca de 62% de similaridade (Figura 8).

Figura 8 – Dendrograma baseado nos perfis de BOX-PCR de isolados bacterianos de nódulos de *L. angustifolius* (verde) e *L. albus* (azul) algoritmo UPGMA, coeficiente de Jaccard e 2% de tolerância, utilizando o software Bionumerics 7.6 (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium). Ponta Grossa/PR, 2024



P1= planta 1; P2= planta 2. Fonte: Dados da pesquisa (2025)

É importante salientar que o *DNA-fingerprinting* é uma análise de variabilidade intraespecífica para verificar a ocorrência de clones entre os isolados.

A identificação taxonômica de Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCP) normalmente inicia-se com a obtenção das sequências nucleotídicas do gene 16S rDNA, que codifica um RNA ribossomal componente da subunidade menor do ribossomo (Mayhood; Mirza, 2021). O gene 16S rDNA é considerado um importante marcador filogenético, pois é onipresente em procariotos, geralmente em cópia única por genoma, apresentam um papel metabólico-chave e seu tamanho (1500 pares de bases) é ideal para a aplicação em diversas técnicas moleculares. Além disso, a sequência é conservada permitindo a utilização de iniciadores universais, porém contém sítios variáveis o suficiente para revelar relações filogenéticas (Baker; Smith; Cowan, 2003). No entanto, em muitos casos, essa ferramenta apresenta baixa resolução filogenética e poder discriminatório a nível de espécie, principalmente no que se refere a espécies que são estritamente relacionadas, porém permite eficiente classificação em nível de gênero (Ferraz Helene; Klepa; Hungria, 2022).

Assim, foi realizado o sequenciamento do gene ribossomal 16S rDNA das estirpes em estudo, com exceção da estirpe 6P2, cujo sequenciamento teve baixa qualidade e deverá ser repetido (Tabela 9).

Tabela 9 - Identificação molecular baseada em sequências parciais do gene 16S rDNA de bactérias provenientes de nódulos de *Lupinus* sp. cultivados em solos de diferentes origens. Ponta Grossa/PR (2025)

Origem ¹	Espécies	Isolado	Identificação NCBI/Blast ²	Identidade (%)	Tamanho (pb)
SAT	<i>L. angustifolius</i>	2P1	<i>Bradyrhizobium diversitatis</i> CNPSo 4019 (NR_180490.1)	99,93	1409
SAT	<i>L. albus</i>	6P2	Não identificada		
SAPA	<i>L. albus</i>	21P1	<i>Bradyrhizobium ripae</i> WR4 (NR_179732)	99,25	1066
SAPA	<i>L. albus</i>	21P2	<i>Bradyrhizobium ripae</i> WR4 (NR_179732)	99,63	1091
SAPA	<i>L. albus</i>	24P1	<i>Bacillus australimaris</i> MCCC 1A5787 (NR_148787)	99,82	1106
SGB6	<i>L. albus</i>	25P1	<i>Priestia aryabhattai</i> B8W22 (NR_115953.1)	99,86	1415
SGB6	<i>L. albus</i>	25P2	<i>Paenibacillus azotifigens</i> NF2-4-5 (NR_159222)	99,72	1059
SGB6	<i>L. albus</i>	26P1	<i>Paenibacillus jilunlii</i> Be17 (NR108639)		
SGB6	<i>L. albus</i>	27P2	<i>Enterobacter sichuanensis</i> WCHEL-C4 (NR_179946.1)	99,72	709
SGB6	<i>L. albus</i>	28P2	<i>Enterobacter mori</i> YIM Hb-3 (NR_146667.2)	99,78	1395
SGB6	<i>L. albus</i>	28P2	<i>Enterobacter sichuanensis</i> WCHEL-C4 (NR_179946.1)	99,71	1023
SC	<i>L. angustifolius</i>	31P1	<i>Leifsonia shinshuensis</i> DB 102 (NR_043663.1)	99,44	1071
SC	<i>L. angustifolius</i>	32P1	<i>Paenibacillus planticola</i> LMG 31457 (NR_181096.1)	93,44	716

¹ SC= solo de área comercial da Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON). SAT= solo de Almirante Tamandaré do Sul-RS. SGB6= solo da gleba B6 (FESCON). SAPA= solo de área de preservação (FESCON). ST= Solo de Tibagi-PR.

² O nome da espécie e número de acesso são relativos aos maiores valores de *score* após busca no banco de dados rRNA/ITS via NCBI/Blast. Fonte: Dados da pesquisa (2025)

Três das doze estirpes do presente estudo (*Bradyrhizobium* sp. 2P1, 21P1 e 21P2) foram identificadas como pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (Tabela 9). Dentre os microssimbiontes que nodulam espécies de *Lupinus* sp., esse gênero é o mais frequente, incluindo espécies como *B. canariense*, *B. japonicum*, *B. valentinum*, *B. elkanii*, *B. diazoefficiens* e *B. cytisi*, observadas em diferentes países como Argélia, Tunísia, Chile, Espanha, Marrocos, Uruguai, em espécies nativas e/ou cultivadas de *Lupinus*. (Bourebaba *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2023; Durán *et al.*, 2014; Granada *et al.*, 2015; Jarabo-Lorenzo *et al.*, 2003; Mellal *et al.*, 2019; Msaddak *et al.*, 2018; Rejili; Benabderrahim; Mars, 2024; Stepkowski *et al.*, 2011; Velázquez *et al.*, 2010).

O fitomicrobioma dos nódulos não é composto apenas por bactérias noduladoras (responsáveis por induzir sua organogênese), sendo também colonizado por outras bactérias

denominadas endofíticas não noduladoras ou endófitas de nódulos. Em sinergia com as noduladoras, podem apresentar múltiplas contribuições tanto para a manutenção da nodulação quanto para a maior resiliência e produtividade das culturas frente a condições adversas, promovendo aumento do crescimento das Fabaceae, a nodulação, mitigação do estresse abiótico (déficit hídrico, temperaturas extremas, salinidade, acidez, toxicidade por metais), proteção contra fitopatógenos diretamente (pela produção de enzimas líticas como as quitinases) ou por resistência sistêmica induzida. Isso ocorre por meio de atividades como a produção de ACC (1-amino-ciclopropano-1-carboxilato) desaminase, produção de compostos indólicos como o AIA, sideróforos, solubilização de fosfato e fixação biológica de nitrogênio (Ayilara; Adeleke; Babalola, 2023; De Andrade *et al.*, 2025; Hassen *et al.*, 2025; Hnini; Aurag, 2024; Rana *et al.*, 2023; Yu; Crosbie; Arancibia, 2025).

Dentre os fatores que exercem influência sobre a composição do fitomicrobioma do nódulo estão a microbiota do solo, suas propriedades (por exemplo o pH) e o genótipo da planta hospedeira (Brown *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2020; Shah *et al.*, 2021).

Alguns dos gêneros descritos como endófitos nodulares são *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Chitinophaga*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Niastella*, *Novosphingobium*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Acinetobacter*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Mycobacterium* e *Micromonospora* (Martínez-Hidalgo; Hirsch, 2017; Yu; Crosbie; Arancibia, 2025).

De acordo com Hnini e Aurag (2024), os mais frequentes, dentre os supracitados são *Bacillus* e *Pseudomonas*, seguidos por *Paenibacillus* e *Enterobacter*, em concordância com o observado no presente estudo, visto que uma das estirpes foi classificada no gênero *Bacillus* (*Bacillus* sp. 24P1), duas no gênero *Paenibacillus* (*Paenibacillus* sp.25P2 e 32P1) e três no gênero *Enterobacter* (*Enterobacter* sp.26P1, 27P2 e 28P2). Outros gêneros verificados foram *Priestia* (*Priestia* sp.25P1), *Leifsonia* (*Leifsonia* sp.31P1) e o isolado 6P2 que não foi identificado (Tabela 9).

5.4 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS ESTIRPES SELECIONADAS

Em paralelo às análises genéticas, os isolados foram caracterizados quanto às suas características fenotípicas. O crescimento em meio YM acrescido do indicador de pH azul de bromotimol pode gerar uma reação ácida (coloração amarela), neutra (coloração verde) ou alcalina (coloração azul). Os isolados, majoritariamente, tornaram o meio verde (6P2, 24P1, 25P1, 25P2 e 31P1) (Tabela 10).

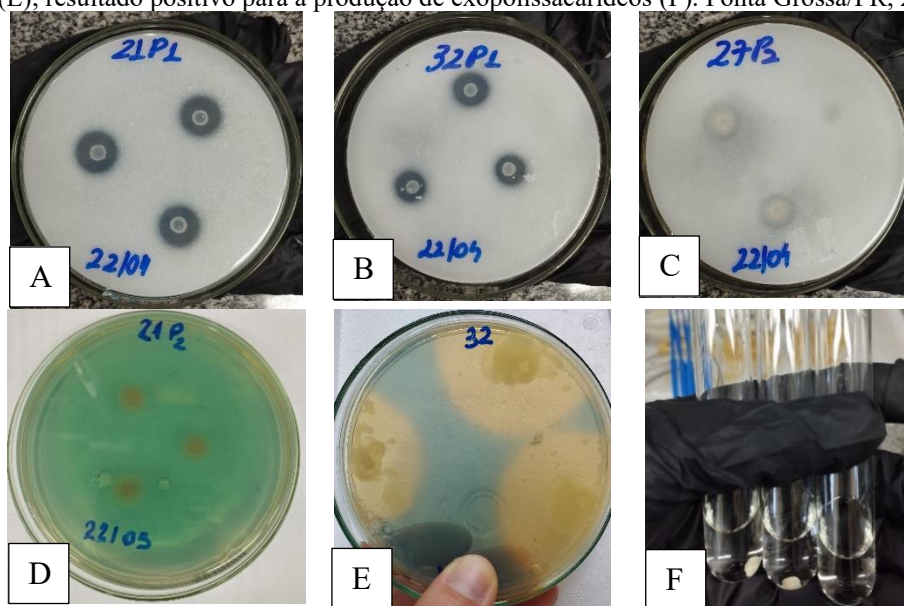
Tabela 10 – Resumo dos resultados das análises *in vitro* quanto à habilidade das estirpes de bactérias como promotoras do crescimento de plantas: solubilização de fosfato, produção de sideróforos, produção de exopolissacarídeos (EPS) e produção de ácido indolacético (AIA). Ponta Grossa/PR, 2024

Estirpes	Reação em YM + azul de bromotimol	Solubilização de fosfato	Sideróforos	Produção de EPS	AIA
<i>Bradyrhizobium</i> sp. 2P1	Alcalina	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
6P2*	Neutra	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Bradyrhizobium</i> sp. 21P1	Alcalina	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Bradyrhizobium</i> sp. 21P2	Alcalina	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
<i>Bacillus</i> sp. 24P1	Neutra	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Priestia</i> sp. 25P1	Neutra	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Paenibacillus</i> sp. 25P2	Neutra	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Enterobacter</i> sp. 26P1	Ácida	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
<i>Enterobacter</i> sp. 27P2	Ácida	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Enterobacter</i> sp. 28P2	Ácida	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Leifsonia</i> sp. 31P1	Neutra	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
<i>Paenibacillus</i> sp. 32P1	Alcalina	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

*A estirpe 6P2 não foi identificada por sequenciamento do gene 16S rDNA. Fonte: a autora

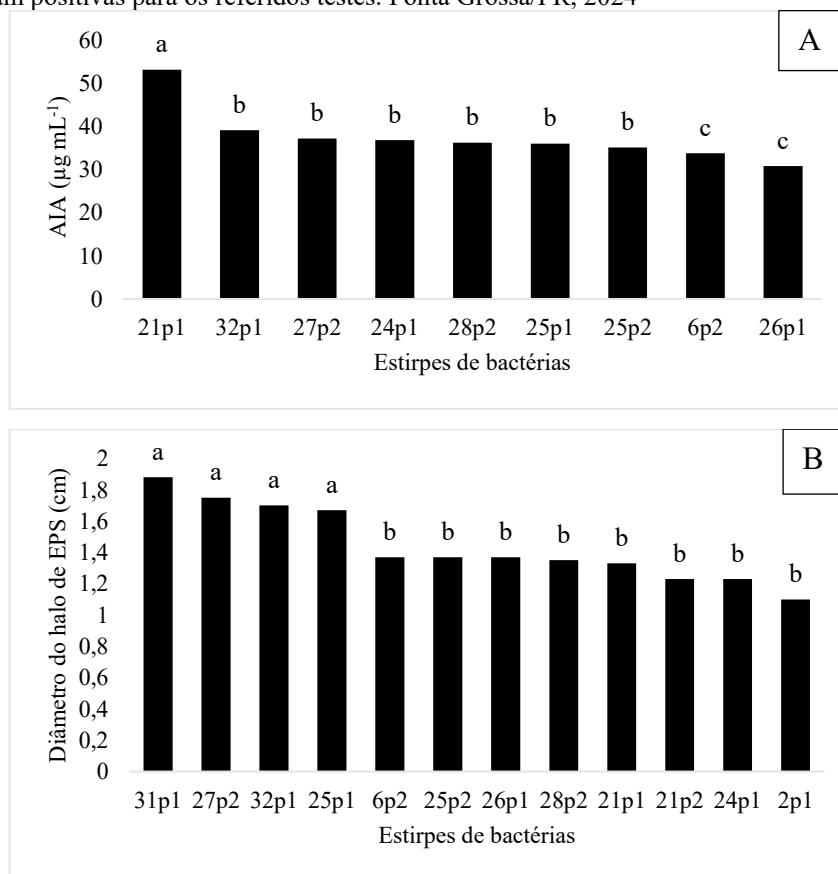
No que diz respeito às atividades diretamente relacionadas à promoção do crescimento vegetal, destacou-se a estirpe *Bradyrhizobium* sp. 21P1 que, além de ser fixadora de nitrogênio, apresentou elevada eficiência em solubilização de fosfato (Figura 9A), produção de exopolissacarídeos, produção de sideróforos (Tabela 10) e alcançou o maior índice de produção de compostos indólicos *in vitro*, com média de 53,09 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 9A), ressaltando o perfil multifuncional da estirpe.

Figura 9 – Resultados das análises de promoção do crescimento de plantas *in vitro*. Resultado positivo para a solubilização de fosfato em meio de cultivo NBRIP, verificado por meio do halo transparente ao redor dos pontos de inoculação das estirpes 21P1 (A), 32P1 (B) e 27P2 (C); resultado negativo para a produção de sideróforos pelo método O-CAS da estirpe 21P2 (D); resultado positivo para a produção de sideróforos pelo método O-CAS da estirpe 32P1 (E); resultado positivo para a produção de exopolissacarídeos (F). Ponta Grossa/PR, 2024



Fonte: a autora

Figura 10 – Comparação de médias da produção de compostos indólicos (AIA), em $\mu\text{g mL}^{-1}$ (A); Comparação de médias dos diâmetros dos halos de produção de exopolissacarídeos (EPS) (B). Ambos consideram apenas as estirpes que foram positivas para os referidos testes. Ponta Grossa/PR, 2024



Letras distintas entre as barras resultam de diferença significativa entre as médias, pelo teste de Scott-Knott, a 5%.
Fonte: a autora

Esse desempenho multifuncional como promotora do crescimento é pouco descrito para o gênero *Bradyrhizobium* (Alikhani; Saleh-Rastin; Antoun, 2006; Bouhnik *et al.*, 2022). Lamrabet *et al.* (2022), dentre 70 isolados, oriundos de nódulos radiculares de *L. albus* e *L. angustifolius*, no Marrocos, obtiveram apenas 3 estirpes com habilidades simultâneas de solubilização de fosfato, produção de auxina e de sideróforos. De modo similar, El Idrissi *et al.* (2020), ao caracterizarem microssimbiontes de *L. cosentinii* e *L. luteus*, no Marrocos, verificaram apenas duas estirpes dentre 28 isolados com as três atividades de promoção do crescimento supracitadas.

Nas avaliações das atividades de promoção do crescimento de plantas *in vitro* dos isolados, a estirpe *Bacillus* sp. 24P1 demonstrou produção média de AIA ($36,78 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 10A), foi positiva para as atividades de produção de sideróforos e EPS (Figura 10B). Essas atividades também foram descritas por Dhole *et al.* (2016) e Maheshwari *et al.* (2019). Outras habilidades que já observadas em estirpes desse gênero foram a solubilização de fosfato, mobilização de potássio, atividade da ACC desaminase, tolerância ao estresse salino, fixação de nitrogênio e antagonismo a fitopatógenos (Hassen *et al.*, 2025; Hnini; Aurag, 2024; Zhao; Xu; Lai, 2018).

A estirpe *Priestia* sp. 25P1 produziu sideróforos, EPS e uma média de $35,95 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA (Figura 10A), assim como relatado por outras pesquisas (Almirón *et al.*, 2025; Baruah *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2024). O gênero ainda pode apresentar outras atividades como a produção de ácido giberélico e tolerância ao estresse oxidativo (Parks *et al.*, 2015).

Ambas as estirpes *Paenibacillus* sp. 25P2 e 32P1, obtiveram médias de produção de AIA (Figura 10A) e diâmetros de EPS que não diferiram estatisticamente (Figura 10B). No entanto, *Paenibacillus* sp. 32P1 se destacou na atividade de produção de sideróforos, com os maiores halos dentre todas as estirpes com essa habilidade neste estudo (Figura 9E), além disso, demonstrou ser solubilizadora de fosfato (Figura 9B). Esses resultados corroboram com o verificado por outros pesquisadores (Hassen *et al.*, 2025; Pandya; Rajput; Rajkumar, 2015). Outras atividades do gênero incluem a atividade da ACC desaminase, fixação de nitrogênio e antagonismo a fungos fitopatogênicos (Ali *et al.*, 2022; Hnini; Aurag, 2024; Paço *et al.*, 2020).

A estirpe *Enterobacter* sp. 27P2 destacou-se entre as demais do mesmo gênero (*Enterobacter* sp. 26P1 e 28P2), pois apresentou as quatro atividades de promoção do crescimento testadas (Tabela 10), solubilização de fosfato (Figura 9C), com média de produção de AIA de $37,18 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 10A), diâmetro de EPS estatisticamente superior ao das outras duas (Figura 10B) e produção de sideróforos. Isso está em conformidade com o descrito por

outros autores para o gênero *Enterobacter* (Eid *et al.*, 2021; Khalifa, 2020). Outras habilidades relatadas são fixação de nitrogênio, antagonismo a fitopatógenos e tolerância a metais pesados (Debnath *et al.*, 2023; Pramanik *et al.*, 2018; Rahal; Chekireb, 2021; Zhao; Xu; Lai, 2018).

A estirpe *Leifsonia* sp. 31P1 apresentou as atividades de produção de EPS e de sideróforos. Os estudos a respeito das atividades do gênero *Leifsonia* sp. como BPCP são mais escassos, mas foram descritas, principalmente, a produção de giberelina e a tolerância a metais pesados como o cobre; produção de AIA, modulação do conteúdo de aminoácidos endógenos nas plantas (ácido glutâmico, treonina, fenilalanina, glicina, prolina e arginina) e aumento do conteúdo de fósforo e ferro em plantas cultivadas sob estresse por cobre (Kang *et al.*, 2017).

5.5 DESEMPENHO DAS ESTIRPES DE BACTÉRIAS SOBRE A GERMINAÇÃO E O VIGOR DE SEMENTES DE *Lupinus albus* L.

A análise da variância não revelou efeito significativo da inoculação das 12 estirpes previamente isoladas e selecionadas sobre a germinação de sementes, apresentando média de 60,96% (Tabela 11). Entretanto, houve efeito significativo da inoculação com as estirpes das bactérias para as variáveis comprimento da raiz (CR), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento total de plântula (CT), massa fresca da parte aérea (MFA), massa fresca de raízes (MFR), massa fresca total de plântula (MFT) e porcentagem de massa seca de plântula (PMS) (Tabela 12). Os coeficientes de variação obtidos demonstraram boa precisão experimental, o que segundo Pimentel Gomes (2009) demonstra alta homogeneidade dos dados e baixa variação ao acaso (Tabelas 11 e 12), exceto para a variável massa seca de raiz (Tabela 12).

Tabela 11 - Resumo da análise de variância do percentual de germinação de sementes de tremço branco *Lupinus albus* L. submetido à inoculação via sementes de 12 estirpes de bactérias e o controle sem inoculação. Ponta Grossa/PR, 2024

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio (Q.M.)
		Germinação
Tratamentos	12	78,91 ^{ns}
Resíduo	39	43,31
CV (%)		10,8
Média geral (%)		60,96

^{ns}= não significativo. CV= coeficiente de variação. GL= graus de liberdade. Fonte: a autora

Tabela 12 - Resumo da análise da variância para as variáveis comprimento da raiz (CR), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento total de plântula (CT), massa fresca da parte aérea (MFA), massa fresca de raízes (MFR), massa fresca total de plântula (MFT), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raízes (MSR), massa seca total de plântula (MST) e porcentagem de massa seca de plântula (PMS), de tremço branco *Lupinus albus* L. submetido ao tratamento de sementes com 12 estirpes distintas de bactérias. Ponta Grossa/PR, 2024

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio (Q.M.)									
		CR	CPA	CT	MFA	MFR	MFT	MSPA	MSR	MST	PMS
Tratamento	12	7,97*	2,48***	17,96**	0,03**	0,005***	0,05***	0,0006 ^{ns}	1,07.10 ^{-5ns}	0,0006 ^{ns}	10,41**
Resíduo	52	3,14	0,70	6,05	0,01	0,001	0,02	0,0007	5,74.10 ⁻⁶	0,0007	3,25
CV (%)		13,53	12,48	12,43	8,74	14,25	8,7	13,07	35,65	12,67	11,71

^{ns}= não significativo; * significativo a 5% de significância; ** significativo a 1% de probabilidade; *** significativo a 0,1% de probabilidade. CV= coeficiente de variação. GL= graus de liberdade. Fonte: a autora

Tabela 13 – Comparação de médias do comprimento da raiz primária (CR), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento total de plântula (CT), massa fresca da parte aérea (MFA), massa fresca de raízes (MFR), massa fresca tota de plântula (MFT) e porcentagem de massa seca de plântula (PMS), de tremçoço branco *Lupinus albus* L. submetido ao tratamento de sementes com 12 estirpes distintas de bactérias. Ponta Grossa/PR, 2025

Estirpes	CR	CPA	CT	MFA	MFR	MFT	PMS
	(cm)	(cm)	(cm)	(g)	(g)	(g)	(%)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. 2P1	10,68 b	5,56 b	16,24 b	1,13 a	0,20 b	1,34 b	18,09 a
6P2	12,18 b	6,58 a	18,76 b	1,16 a	0,24 a	1,40 a	14,80 b
<i>Bradyrhizobium</i> sp. 21P1	14,51 a	6,64 a	21,15 a	1,26 a	0,25 a	1,52 a	14,58 b
<i>Bradyrhizobium</i> sp. 21P2	14,54 a	7,56 a	22,10 a	1,29 a	0,26 a	1,54 a	13,51 b
<i>Bacillus</i> sp. 24P1	11,74 b	5,81 b	17,56 b	1,13 a	0,20 b	1,33 b	16,74 a
<i>Priestia</i> sp. 25P1	12,93 a	6,99 a	19,92 a	1,22 a	0,23 a	1,45 a	16,18 a
<i>Paenibacillus</i> sp. 25P2	13,85 a	6,94 a	20,78 a	1,21 a	0,26 a	1,47 a	14,16 b
<i>Enterobacter</i> sp. 26P1	13,52 a	7,32 a	20,84 a	1,21 a	0,22 a	1,43 a	14,80 b
<i>Enterobacter</i> sp. 27P2	13,99 a	7,32 a	21,31 a	1,31 a	0,25 a	1,56 a	14,39 b
<i>Enterobacter</i> sp. 28P2	13,80 a	7,02 a	20,82 a	1,18 a	0,20 b	1,39 a	15,50 b
<i>Leifsonia</i> sp. 31P1	13,85 a	6,54 a	20,39 a	1,20 a	0,23 a	1,43 a	15,06 b
<i>Paenibacillus</i> sp. 32P1	13,42 a	7,31 a	20,73 a	1,19 a	0,25 a	1,44 a	14,39 b
Controle	11,15 b	5,40 b	16,56 b	1,02 a	0,14 c	1,16 c	17,98 a
CV%	13,53	12,48	12,43	8,74	14,25	8,70	11,71

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%. CV= coeficiente de variação. Fonte: a autora

O CR foi inferior para as sementes inoculadas com as estirpes *Bradyrhizobium* sp. 2P1, 6P2 e *Bacillus* sp. 24P1, em relação às demais que apresentaram valor médio de 13,82 cm (Tabela 13). As plântulas de *Lupinus albus* apresentaram maior CPA para a inoculação das sementes com a estirpe *Bradyrhizobium* sp. 21P2 (7,56 cm), valor médio superior em 28,57% em relação ao controle (5,40 cm), assim como foi superior ao CPA da estirpe *Bradyrhizobium* sp. 2P1 (Tabela 13).

O CT de plântula também foi maior quando as sementes de tremoço branco foram inoculadas com a estirpe *Bradyrhizobium* sp. 21P2, apresentando valor superior em média 25,07% ao obtido sem a inoculação das sementes (controle) e redução média de 26,52% com a inoculação com a estirpe *Bradyrhizobium* sp. 2P1 (Tabela 13).

A MFA não apresentou diferença significativa entre as plântulas submetidas aos tratamentos avaliados (Tabela 13). A MFR de plântulas de *L. albus* foi significativamente aumentada quando dos tratamentos com as estirpes *Bradyrhizobium* sp. 21P2, *Bradyrhizobium* sp. 21P1, *Enterobacter* sp. 27P2, *Enterobacter* sp. 26P1, *Paenibacillus* sp. 25P2, *Paenibacillus* sp. 32P1, *Leifsonia* sp. 31P1, *Priestia* sp. 25P1 e a 6P2 (não identificada) em relação ao controle (Tabela 13). Desempenho similar foi verificado para a variável MFT (Tabela 13).

As estirpes *Bradyrhizobium* sp. 21P1, *Enterobacter* sp. 27P2 e *Paenibacillus* sp. 32P1 estiveram entre as de desempenho superior para as variáveis CR, CPA, CT, MFR e MFT, do teste de vigor (Tabela 13). Tal fato, pode estar relacionado ao caráter multifuncional desses microrganismos que foram destaque nas análises de promoção do crescimento vegetal *in vitro*, apresentando as quatro atividades avaliadas. Todavia, a estirpe *Bradyrhizobium* sp. 21P2 diverge desse raciocínio por ter demonstrado desempenho similar ao das estirpes superiores no teste de vigor, ainda que não tenha se destacado nas atividades *in vitro* que foram avaliadas (Tabela 10).

Ante o exposto, propõe-se que sejam feitos ensaios complementares empregando a coinoculação das estirpes que se destacaram nas atividades como BPCP, por meio da combinação das estirpes *Bradyrhizobium* sp. 21P1 e/ou 21P2 com as endofíticas *Enterobacter* sp. 27P2 e/ou *Paenibacillus* sp. 32P1, de forma a verificar se atuam sinergicamente.

Crescimento é o aumento irreversível do tamanho ou volume da planta, geralmente acompanhado do aumento da massa seca (Floss, 2006). Verificou-se na Tabela 13, que os tratamentos com desempenho superior em todas as variáveis avaliadas propiciaram médias inferiores de massa seca, isso pode ter ocorrido porque durante a germinação ocorre a degradação das reservas para o crescimento e desenvolvimento do embrião em plântula, acompanhada da redução da matéria seca (Taiz *et al.*, 2021). As diferenças observadas

caracterizam variabilidade entre as estirpes isoladas e testadas quanto à germinação e vigor de sementes de tremoço branco (Tabela 13).

6 CONCLUSÕES

Considerando as condições experimentais, verifica-se que os solos SC, SGB6 e SAT propiciaram maior crescimento das duas espécies de tremço e, que a espécie *L. albus* foi, de modo geral, superior à *L. angustifolius* nos parâmetros biométricos analisados. Assim como, esses três solos e *L. albus* se destacaram em relação ao número de plantas noduladas aos 27 DAS.

Das 12 estirpes obtidas a partir de nódulos radiculares, três são microssimbiontes pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* sp., enquanto as demais são endófitos, das quais uma é do gênero *Bacillus* sp., uma do gênero *Priestia* sp., três do gênero *Paenibacillus* sp., três do gênero *Enterobacter* sp., uma do gênero *Leifsonia* sp. e uma não identificada (6P2).

A avaliação da promoção do crescimento vegetal *in vitro* revelou desempenho superior das estirpes *Bradyrhizobium* sp. 21P1, *Enterobacter* sp. 27P2 e *Paenibacillus* sp. 32P1, as quais apresentaram as quatro atividades avaliadas (produção de AIA, EPS, sideróforos e solubilização de fosfato).

As sementes inoculadas com as estirpes identificadas não induziram diferenças na germinação, todavia, os tratamentos inoculados com as estirpes *Bradyrhizobium* sp. 21P1, *Enterobacter* sp. 27P2 e *Paenibacillus* sp. 32P1 estiveram entre as estirpes que proporcionaram maiores médias para as variáveis CR, CPA, CT, MFR e MFT analisadas no teste de vigor.

REFERÊNCIAS

- ABE-INGE, V. *et al.* Plant-based dietary shift: Current trends, barriers, and carriers. **Trends in Food Science & Technology**, v. 143, p. 104292, 2024.
- ABRAHAM, E. M. *et al.* The use of lupin as a source of protein in animal feeding: Genomic tools and breeding approaches. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 4, p. 851, 2019.
- ALBUJA-VACA, D. *et al.* Gluten-free pasta: development of a new formulation based on rice and lupine bean flour (*Lupinus Mutabilis*) using a mixture-process design. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 408-414, 2019.
- ALEMU, F.; ASMARE, B.; YEHEYIS, L. Growth, yield and yield component attributes of narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) varieties in the highlands of Ethiopia. **Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales**, v. 7, n. 1, p. 48-55, 2019.
- ALI, B. *et al.* Role of endophytic bacteria in salinity stress amelioration by physiological and molecular mechanisms of defense: A comprehensive review. **South African Journal of Botany**, v. 151, p. 33-46, 2022.
- ALIKHANI, H.; SALEH-RASTIN, N.; ANTOUN, H. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. **Plant and soil**, v. 287, n. 1, p. 35-41, 2006.
- ALMIRÓN, C. *et al.* Functional and genomic analyses of plant growth promoting traits in *Priestia aryabhattai* and *Paenibacillus* sp. isolates from tomato rhizosphere. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 3498, 2025.
- ARNHOLD, E. Package in the R environment for analysis of variance and complementary analyses. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 6, p. 488-492, 2013.
- AYILARA, M. S.; ADELEKE, B. S.; BABALOLA, O. O. Bioprospecting and challenges of plant microbiome research for sustainable agriculture, a review on soybean endophytic bacteria. **Microbial ecology**, v. 85, n. 3, p. 1113-1135, 2023.
- BACKER, R. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1473, 2018.
- BAKER, G.; SMITH, J. J.; COWAN, D. A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **Journal of microbiological methods**, v. 55, n. 3, p. 541-555, 2003.
- BARUAH, M. *et al.* *Priestia aryabhattai* MBM3-Mediated enhancement of sulphur metabolism in *Brassica campestris*. **Current Microbiology**, v. 81, n. 10, p. 316, 2024.
- BATISTA, J. S. S. *et al.* Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a Cerrados soil. **Microbial ecology**, v. 53, n. 2, p. 270-284, 2007.

BHANSE, P. *et al.* Role of plant growth-promoting rhizobacteria in boosting the phytoremediation of stressed soils: Opportunities, challenges, and prospects. **Chemosphere**, v. 303, p. 134954, 2022.

BOUHNİK, O. *et al.* The fodder legume *Chamaecytisus albidus* establishes functional symbiosis with different bradyrhizobial symbiovars in Morocco. **Microbial ecology**, v. 84, n. 3, p. 1-14, 2022.

BOUREBABA, Y. *et al.* Diversity of *Bradyrhizobium* strains nodulating *Lupinus micranthus* on both sides of the Western Mediterranean: Algeria and Spain. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 266-274, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 395 p.

BROWN, S. P. *et al.* Soil origin and plant genotype structure distinct microbiome compartments in the model legume *Medicago truncatula*. **Microbiome**, v. 8, p. 1-17, 2020.

CHEN, Y. L. *et al.* Root architecture alteration of narrow-leaved lupin and wheat in response to soil compaction. **Field Crops Research**, v. 165, n. 2, p. 61-70, 2014.

CHEN, Y. L. *et al.* Phosphorus starvation boosts carboxylate secretion in P-deficient genotypes of *Lupinus angustifolius* with contrasting root structure. **Crop and Pasture Science**, v. 64, n. 6, p. 588-599, 2013.

CLEMENTS, J.; WHITE, P.; BUIRCHELL, B. The root morphology of *Lupinus angustifolius* in relation to other *Lupinus* species. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 44, n. 6, p. 1367-1375, 1993.

COBA DE LA PENA, T. *et al.* The symbiosome: legume and rhizobia co-evolution toward a nitrogen-fixing organelle? **Frontiers in plant science**, 8, p. 2229, 2018.

COSTA, A. *et al.* Diversity of *Bradyrhizobium* strains that nodulate *Lupinus* species native to Uruguay. **Environmental Sustainability**, v. 6, n. 2, p. 195-211, 2023.

CURTI, C. *et al.* The addition of Andean lupin (*Lupinus mutabilis*) protein concentrate enhances the nutritive value and the antioxidant activity of yoghurt: Yoghurts added with Andean lupin protein concentrate. **Revista española de nutrición humana y dietética**, v. 26, n. 1, p. 1-7, 2022.

DE ANDRADE, M. S. R. *et al.* Effect of co-inoculation with plant growth-promoting bacteria on the microbiome of soybean roots. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 9, p. 1505001, 2025.

DE LIMA, R. L. *et al.* Yield of maize grown in succession to green fertilization. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 1, 2013.

DE LIMA FILHO, O. F. *et al.* **Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil: fundamentos e prática**. 2. ed. Brasília-DF: Embrapa, 2023. 586p.

DEBNATH, S. *et al.* Non-rhizobial nodule endophytes improve nodulation, change root exudation pattern and promote the growth of lentil, for prospective application in fallow soil. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1152875, 2023.

DHOLE, A. *et al.* Endophytic occupation of legume root nodules by nif H-positive non-rhizobial bacteria, and their efficacy in the groundnut (*Arachis hypogaea*). **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1397-1407, 2016.

DURÁN, D. *et al.* *Bradyrhizobium valentinum* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lupinus mariae-josephae*, a lupine endemic of basic-lime soils in Eastern Spain. **Systematic and applied microbiology**, v. 37, n. 5, p. 336-341, 2014.

EID, A. M. *et al.* Harnessing bacterial endophytes for promotion of plant growth and biotechnological applications: an overview. **Plants**, v. 10, n. 5, p. 935, 2021.

EL IDRISSE, M. M. *et al.* *Microvirga* sp. symbiovar mediterraneense nodulates *Lupinus cosentinii* grown wild in Morocco. **Journal of applied microbiology**, v. 128, n. 4, p. 1109-1118, 2020.

EMBRAPA. **Anais da II Reunião Brasileira de Tremoço – Lupinus sp.: Passo Fundo, RS, 15 e 16 de outubro de 1985**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1986.

FERRAZ HELENE, L. C.; KLEPA, M. S.; HUNGRIA, M. New insights into the taxonomy of bacteria in the genomic era and a case study with rhizobia. **International Journal of Microbiology**, v. 2022, n. 1, p. 4623713, 2022.

FINGER, A. C. **Tolerância ao alumínio em trigo: controle genético e expressão de genes em linhagens melhoradas**. 2025. Projeto de Tese de Doutorado (Doutorado na Área de Agricultura) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2025.

FLOSS, E. L. **Fisiologia das plantas cultivadas: o estudo do que está por trás do que se vê**. 3. ed. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2006. 751 p.

FUNAYAMA-NOGUCHI, S.; NOGUCHI, K.; TERASHIMA, I. Comparison of the response to phosphorus deficiency in two lupin species, *Lupinus albus* and *L. angustifolius*, with contrasting root morphology. **Plant, Cell & Environment**, v. 38, n. 3, p. 399-410, 2015.

GARG, G. *et al.* A pan-genome and chromosome-length reference genome of narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius*) reveals genomic diversity and insights into key industry and biological traits. **The Plant Journal**, v. 111, n. 5, p. 1252-1266, 2022.

GOMES, E. A. *et al.* Mecanismos das bactérias promotoras do crescimento de plantas na mitigação dos efeitos do déficit hídrico. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2022. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 267).

GONZÁLEZ-SAMA, A. *et al.* An unusual infection mechanism and nodule morphogenesis in white lupin (*Lupinus albus*). **New Phytologist**, v. 163, n. 2, p. 371-380, 2004.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant physiology**, v. 26, n. 1, p. 192-195, 1951.

GRANADA, C. E. *et al.* Multilocus sequence analysis reveals taxonomic differences among Bradyrhizobium sp. symbionts of *Lupinus albus* plants growing in arenized and non-arenized areas. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 323-329, 2015.

GUPTA, G. *et al.* Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 7, n. 2, p. 096-102, 2015.

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

HASSEN, A. I. *et al.* Non-Rhizobial Endophytes (NREs) of the nodule microbiome have synergistic roles in beneficial tripartite plant–microbe interactions. **Microorganisms**, v. 13, n. 3, p. 518, 2025.

HAVLIN, J. L. *et al.* **Soil Fertility and Fertilizers: An Introduction to Nutrient Management**. 8. ed. Delhi: Pearson India, 2016.

HELLAL, K. *et al.* ¹H NMR-based metabolomics and UHPLC-ESI-MS/MS for the investigation of bioactive compounds from *Lupinus albus* fractions. **Food Research International**, v. 140, p. 110046, 2021.

HNINI, M.; AURAG, J. Prevalence, diversity and applications potential of nodules endophytic bacteria: a systematic review. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1386742, 2024.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural of Experimental Station Bull, v.347, p. 1-32, 1950.

HONGO, Y.; OHKUMA, M.; KUDO, T. Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). **FEMS microbiology ecology**, v. 44, n. 2, p. 231-242, 2003.

HOWIESON, J. G. *et al.* **Working with rhizobia**. Canberra: Australian centre for international agricultural research, 2016.

JARABO-LORENZO, A. *et al.* Genetic diversity of bradyrhizobial populations from diverse geographic origins that nodulate *Lupinus* spp. and *Ornithopus* spp. **Systematic and applied microbiology**, v. 26, n. 4, p. 611-623, 2003.

JHA, C. K.; SARAF, M. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. **Journal of Agricultural Research and Development**, v. 5, n. 2, p. 108-119, 2015.

JHA, U. C. *et al.* Progress of genomics-driven approaches for sustaining underutilized legume crops in the post-genomic era. **Frontiers in Genetics**, v. 13, p. 831656, 2022.

JOHNSON, S. K. *et al.* Lupins: Their unique nutritional and health-promoting attributes. In: TAYLOR, J. R. N.; AWIKA, Joseph M. (Ed.). **Gluten-free ancient grains: Cereals, pseudocereals, and legumes: Sustainable, nutritious, and health-promoting foods for the 21st century**. Amsterdam: Elsevier, 2017. p. 179–221.

- KANG, S.-M. *et al.* Gibberellins and indole-3-acetic acid producing rhizospheric bacterium *Leifsonia xyli* SE134 mitigates the adverse effects of copper-mediated stress on tomato. **Journal of Plant Interactions**, v. 12, n. 1, p. 373-380, 2017.
- KHALIFA, A. Enterobacter. In: **Beneficial microbes in agro-ecology**: Elsevier, 2020. p. 259-270.
- KOURIS-BLAZOS, A.; BELSKI, R. Health benefits of legumes and pulses with a focus on Australian sweet lupins. **Asia Pacific journal of clinical nutrition**, v. 25, n. 1, p. 1-17, 2016.
- KRAEMER, S. M.; CROWLEY, D.; KRETZSCHMAR, R. Geochemical aspects of phytosiderophore-promoted iron acquisition by plants. **Advances in agronomy**, v. 91, p. 1-46, 2006.
- KRZYŻANOWSKI, F. C.; FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A. Relato dos testes de vigor disponíveis para as grandes culturas. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 1, n. 2, p. 11-14, 1991.
- LAMRABET, M. *et al.* Phylogenetic and symbiotic diversity of *Lupinus albus* and *L. angustifolius* microsymbionts in the Maamora forest, Morocco. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 126338, 2022.
- LEMA, M.; SOENGAS, P. Identification of promising accessions of wild *Lupinus hispanicus* Boiss. et Reut. from northwestern Spain. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 70, n. 2, p. 677-690, 2023.
- LEMUS-CONEJO, A. *et al.* Nutritional composition and biological activity of narrow-leaved lupins (*Lupinus angustifolius* L.) hydrolysates and seeds. **Food chemistry**, v. 420, p. 136104, 2023.
- LLORENTE, B. E.; ALASIA, M. A.; LARRABURU, E. E. Biofertilization with *Azospirillum brasilense* improves in vitro culture of *Handroanthus ochraceus*, a forestry, ornamental and medicinal plant. **New biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 32-40, 2016.
- LUCAS, R. E.; DAVIS, J. F. Relationships between pH values of organic soils and availabilities of 12 plant nutrients. **Soil science**, v. 92, n. 3, p. 177-182, 1961.
- LUO, Z.; LIU, H.; XIE, F. Cellular and molecular basis of symbiotic nodule development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 76, p. 102478, 2023.
- MAHESHWARI, R. *et al.* Functional diversity of cultivable endophytes from *Cicer arietinum* and *Pisum sativum*: bioprospecting their plant growth potential. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, p. 101229, 2019.
- MAIA, M. R. *et al.* Upcycling post-harvest biomass residues from native European *Lupinus* species: from straws and pod shells production to nutritive value and alkaloids content for ruminant animals. **Frontiers in Nutrition**, v. 10, p. 1195015, 2023.
- MALAVOLTA, E. ABC da adubação. Editora Agronômica CERES, São Paulo, 1989. 292 p.

MARTÍNEZ-HIDALGO, P.; HIRSCH, A. M. The nodule microbiome: N₂-fixing rhizobia do not live alone. **Phytobiomes Journal**, v. 1, n. 2, p. 70-82, 2017.

MASSALHA, H. *et al.* Small molecules below-ground: the role of specialized metabolites in the rhizosphere. **The Plant Journal**, v. 90, n. 4, p. 788-807, 2017.

MAYHOOD, P.; MIRZA, B. S. Soybean root nodule and rhizosphere microbiome: Distribution of rhizobial and nonrhizobial endophytes. **Applied and environmental microbiology**, v. 87, n. 10, p. e02884-02820, 2021.

MELLAL, H. *et al.* Phylogenetic diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius* grown wild in the North East of Algeria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 397-402, 2019.

MENNA, P. *et al.* Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 315-332, 2006.

MSADDAK, A. *et al.* Definition of two new symbiovars, sv. lupini and sv. mediterraneense, within the genera *Bradyrhizobium* and *Phyllobacterium* efficiently nodulating *Lupinus micranthus* in Tunisia. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 487-493, 2018.

MSADDAK, A. *et al.* Phylogenetic analyses of rhizobia isolated from nodules of *Lupinus angustifolius* in Northern Tunisia reveal *Devosia* sp. as a new microsymbiont of lupin species. **Agronomy**, v. 11, n. 8, p. 1510, 2021.

MUSCO, N. *et al.* Comparison of nutritional and antinutritional traits among different species (*Lupinus albus* L. *Lupinus luteus* L. *Lupinus angustifolius* L.) and varieties of lupin seeds. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 101, n. 6, p. 1227-1241, 2017.

NASCIMENTO, E. Avaliação da solubilização de fosfato por rizóbios isolados de leguminosas nativas dos Campos Gerais do Paraná. 2022. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2022.

NELSON, M. S.; SADOWSKY, M. J. Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 491, 2015.

OKAGU, I. U. *et al.* Lupin-Derived Bioactive Peptides: Intestinal Transport, Bioavailability and Health Benefits. **Nutrients**, v. 13, n. 9, p. 3266, 2021.

OLEŃSKA, E. *et al.* Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. **Science of the Total Environment**, v. 743, p. 140682, 2020.

OLIVEIRA, A. L. M. *et al.* Maize inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cells enriched with exopolysaccharides and polyhydroxybutyrate results in high productivity under low N fertilizer input. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1873, 2017.

ONG, A.; O'BRIAN, M. R. *Bradyrhizobium japonicum* diazoefficiens. **Trends in Microbiology**, v. 32, n. 6, p. 614-615, 2024.

PAÇO, A. *et al.* Exogenous ACC deaminase is key to improving the performance of pasture legume-rhizobial symbioses in the presence of a high manganese concentration. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1630, 2020.

PAIVA, C. A. *et al.* Microrganismos solubilizadores de fósforo e potássio na cultura da soja. In: MEYER, M. C. *et al.* (Ed.). **Bioinsumos na cultura da soja**. Brasília, DF: Embrapa, 2022. p. 163–179.

PALMERO, F. *et al.* A quantitative review into the contributions of biological nitrogen fixation to agricultural systems by grain legumes. **European Journal of Agronomy**, v. 136, p. 126514, 2022.

PANDYA, M.; RAJPUT, M.; RAJKUMAR, S. Exploring plant growth promoting potential of non rhizobial root nodules endophytes of *Vigna radiata*. **Microbiology**, v. 84, p. 80-89, 2015.

PARKS, D. H. *et al.* CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome research**, v. 25, n. 7, p. 1043-1055, 2015.

PAULETTI, V.; MOTTA, A. C. V. Manual de adubação e calagem para o estado do Paraná. Curitiba: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo – Núcleo Estadual Paraná, 2017. 482 p.

PAULO, E. M. *et al.* An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. **Food Science and Technology**, v. 32, p. 710-714, 2012.

PEIXOTO, P. H. P.; PIMENTA, M. R.; REIS, L. B. dos. **Manual de aulas práticas de fisiologia vegetal: uma abordagem prática em multimídia**. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora, 2020. 218 p.

PEREIRA, A.; RAMOS, F.; SANCHES SILVA, A. Lupin (*Lupinus albus* L.) seeds: balancing the good and the bad and addressing future challenges. **Molecules**, v. 27, n. 23, p. 8557, 2022.

PÉREZ-MIRANDA, S. *et al.* O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. v. 70, n. 1, p. 127–131, 2007.

PÉREZ-MONTAÑO, F. *et al.* Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. **Microbiological research**, v. 169, n. 5-6, p. 325-336, 2014.

PIMENTEL GOMES, F. P. **Curso de Estatística Experimental**. 15ª Ed., Livraria Nobel S.A., São Paulo. 2009. 451p.

PRAMANIK, K.; MITRA, S.; SARKAR, A.; MAITI, T. K. Alleviation of phytotoxic effects of cadmium on rice seedlings by cadmium resistant PGPR strain *Enterobacter aerogenes* MCC 3092. **Journal of hazardous materials**, v. 351, n. 1, p. 317-329, 2018.

PUEYO, J. J. *et al.* Nitrogen and phosphorus interplay in lupin root nodules and cluster roots. **Frontiers in plant science**, v. 12, p. 644218, 2021.

QUIÑONES, M. A.; LUCAS, M. M.; PUEYO, J. J. Adaptive mechanisms make lupin a choice crop for acidic soils affected by aluminum toxicity. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 810692, 2022.

RAHAL, S.; CHEKIREB, D. Diversity of rhizobia and non-rhizobia endophytes isolated from root nodules of *Trifolium* sp. growing in lead and zinc mine site Guelma, Algeria. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 7, p. 3839-3849, 2021.

RANA, A. K.; VYAS, P.; SHARMA, S.; SARDANA, V. Groundnut harbours non-nodulating non-rhizobial plant growth-promoting bacterial endophytes. **3 Biotech**, v. 13, n. 12, p. 420, 2023.

REJILI, M.; BENABDERRAHIM, M. A.; MARS, M. Bacterial communities nodulating lupinus cosentinii gus. and their inputs in the worldwide phylogeography of lupine endosymbionts. **Soil Systems**, v. 8, n. 4, p. 119, 2024.

RODÉS-BACHS, C.; VAN DER FELS-KLERX, H. Impact of environmental factors on the presence of quinolizidine alkaloids in lupins: a review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 40, n. 6, p. 757-769, 2023.

ROSER, M.; RITCHIE, H. How has world population growth changed over time? **Our World in Data**, 2023.

SANTOS, H. G. dos *et al.* **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 5. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2018. E-book.

SCHWARZER, S. Putting Carbon back where it belongs - The potential of carbon sequestration in the soil. **UN Environment Programme. Foresight Br./Sci. Div. UN Environ. Programme**, v. 12, p. 1-12, 2019.

SHAH, A. *et al.* *Trifolium repens* and *T. subterraneum* modify their nodule microbiome in response to soil pH. **Journal of applied microbiology**, v. 131, n. 4, p. 1858-1869, 2021.

SHEN, X. *et al.* Plant-Based Diets and the Gut Microbiome: Findings from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 119, n. 3, p. 628–638, 2024.

SMITH, D. L.; PRASLICKOVA, D.; ILANGUMARAN, G. Inter-organismal signaling and management of the phytomicrobiome. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 722, 2015.

SPAEPEN, S. *et al.* Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. **New Phytologist**, v. 201, n. 3, p. 850-861, 2014.

STEPKOWSKI, T. *et al.* *Bradyrhizobium canariense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the two dominant rhizobium species in root nodules of lupin and serradella plants growing in Europe. **Systematic and applied microbiology**, v. 34, n. 5, p. 368-375, 2011.

SUSEK, K. *et al.* A first glimpse of wild lupin karyotype variation as revealed by comparative cytogenetic mapping. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1152, 2016.

SUZUKI, M. T.; GIOVANNONI, S. J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 2, p. 625-630, 1996.

TAIZ, L. *et al.* **Fundamentos de Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: ArtMed, 2021. E-book. pág.110. ISBN 9786581335113.

TANG, C. *et al.* Physiological responses of lupin roots to high pH. In: **Plant Nutrition—from Genetic Engineering to Field Practice: Proceedings of the Twelfth International Plant Nutrition Colloquium**, 21–26 September 1993, Perth, Western Australia. Springer Netherlands, 1993. p. 755-758.

TOUNSI-HAMMAMI, S. *et al.* Genetic diversity of rhizobia associated with root nodules of white lupin (*Lupinus albus* L.) in Tunisian calcareous soils. **Systematic and applied microbiology**, v. 42, n. 4, p. 448-456, 2019.

TRUJILLO, M. E. *et al.* Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1318-1327, 2005.

VALENTE, I. M. *et al.* Agronomic, Nutritional Traits, and Alkaloids of *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius* and *Lupinus luteus* Genotypes: Effect of Sowing Dates and Locations. **ACS Agricultural Science & Technology**, v. 4, n. 4, p. 450-462, 2024.

VALVERDE, A. *et al.* *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1985-1989, 2005.

VELÁZQUEZ, E. *et al.* Strains nodulating *Lupinus albus* on different continents belong to several new chromosomal and symbiotic lineages within *Bradyrhizobium*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 97, n. 4, p. 363-376, 2010.

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

WANG, F. *et al.* *Priestia aryabhattai* improves soil environment and promotes alfalfa growth by enhancing rhizosphere microbial carbon sequestration capacity under greenhouse conditions. **Current Microbiology**, v. 81, n. 12, p. 420, 2024.

WANG, Y. *et al.* Rhizosphere organic anions play a minor role in improving crop species' ability to take up residual phosphorus (P) in agricultural soils low in P availability. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1664, 2016.

WEISBURG, W. G. *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WITTENWILER, M. Mechanisms of iron mobilization by siderophores. **Master Studies in Environmental Sciences Master**, ETH Zürich, Zürich, 2007.

YAMADA, H.; NISHIDA, S.; WASAKI, J. Ethylene works as a possible regulator for the rootlet elongation and transcription of genes for phosphorus acquisition in cluster roots of *Lupinus albus* L. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 68, n. 3, p. 383-392, 2022.

YANG, J. *et al.* Mechanisms underlying legume–rhizobium symbioses. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 64, n. 2, p. 244-267, 2022.

YU, Y. H.; CROSBIE, D. B.; ARANCIBIA, M. M. *Pseudomonas* in the spotlight: emerging roles in the nodule microbiome. **Trends in plant science**, v. 30, n. 5, p. 461-470, 2025.

ZHAO, L.; XU, Y.; LAI, X. Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 269-278, 2018.

ANEXO A – TABELAS REFERENTES AOS TESTES DE COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DO EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO

Tabela 14 – Comparação de médias do comprimento de raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raízes (MSR) entre as espécies de tremoço ou entre os solos de diferentes origens. Ponta Grossa/PR, 2024

Tratamentos	CR	MSPA	MSR
	(cm)	(g planta ⁻¹)	(g planta ⁻¹)
Espécie de tremoço			
<i>Lupinus albus</i>	19,1 a	0,65 a	0,23 a
<i>Lupinus angustifolius</i>	13,1 b	0,29 b	0,15 b
Média	16,1	0,47	0,19
Origem dos solos			
SC		0,56 a	0,44 a
SAT		0,52 a	0,20 b
SGB6		0,47 a	0,20 b
SAPA		0,41 b	0,12 c
ST		0,39 b	0,11 c
Média	16,1	0,47	0,21

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. SC= solo de área comercial da Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON). SAT= solo de Almirante Tamandaré do Sul-RS. SGB6= solo da gleba B6 (FESCON). SAPA= solo de área de preservação (FESCON). ST= Solo de Tibagi-PR. Fonte: a autora

Tabela 15 - Comprimento da parte aérea de plantas (CPA) de duas espécies de tremoço cultivadas em solos de diferentes origens. Ponta Grossa/PR, 2024

Comprimento da parte aérea de plantas (cm)		
Origem dos solos	Espécies de tremoço	
	<i>Lupinus albus</i>	<i>Lupinus angustifolius</i>
SC	20,63 aA	21,60 aA
SAT	18,75 aB	22,25 aA
SGB6	20,08 aA	16,60 bB
SAPA	21,15 aA	19,75 aA
ST	18,32 aA	17,25 bA
Média	19,77	19,49
Média geral	19,64	

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. SC= solo de área comercial da Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON). SAT= solo de Almirante Tamandaré do Sul-RS. SGB6= solo da gleba B6 (FESCON). SAPA= solo de área de preservação (FESCON). ST= Solo de Tibagi-PR. Fonte: a autora.

Tabela 16 - Massa fresca da parte aérea de duas espécies de tremoço cultivadas em solos de diferentes origens. Ponta Grossa/PR, 2024

Origem dos solos	Massa fresca da parte aérea (g planta ⁻¹)	
	Espécies de tremoço	
	<i>Lupinus albus</i>	<i>Lupinus angustifolius</i>
SC	6,08 aA	2,55 aB
SAT	5,34 aA	2,93 aB
SGB6	5,42 aA	2,41 aB
SAPA	5,63 aA	1,78 bB
ST	4,12 bA	1,98 bB
Média	5,32	2,33
Média geral	3,82	

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. SC= solo de área comercial da Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON). SAT= solo de Almirante Tamandaré do Sul-RS. SGB6= solo da gleba B6 (FESCON). SAPA= solo de área de preservação (FESCON). ST= Solo de Tibagi-PR. Fonte: a autora

Tabela 17 - Massa fresca de raízes de plantas de duas espécies de tremoço cultivadas em solos de diferentes origens. Ponta Grossa/PR, 2024

Origem dos solos	Massa fresca de raízes (g planta ⁻¹)	
	Espécies de tremoço	
	<i>Lupinus albus</i>	<i>Lupinus angustifolius</i>
SC	2,87 aA	1,43 aB
SAT	2,07 bA	1,46 aB
SGB6	2,68 aA	0,84 bB
SAPA	1,90 bA	0,50 bB
ST	1,17 cA	0,82 bA
Média	2,14	1,01
Média geral	1,56	

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. SC= solo de área comercial da Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON). SAT= solo de Almirante Tamandaré do Sul-RS. SGB6= solo da gleba B6 (FESCON). SAPA= solo de área de preservação (FESCON). ST= Solo de Tibagi-PR. Fonte: a autora