



JACQUELINE SAVANA DA SILVA

**NEW STRAINS OF *Bradyrhizobium* ENRICH PLANT BIOMASS
NITROGEN CONTENT IN LEGUME SPECIES FOR USE AS
GREEN MANURE**

**LAVRAS - MG
2020**

JACQUELINE SAVANA DA SILVA

**NEW STRAINS OF *BRADYRHIZOBIUM* ENRICH PLANT BIOMASS NITROGEN
CONTENT IN LEGUME SPECIES FOR USE AS GREEN MANURE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Microbiologia e Bioquímica do Solo, para a obtenção do título de Doutora.

Prof^a. Dr^a. Fatima Maria de Souza Moreira
Orientadora
Dr^a. Dâmiany Pádua de Oliveira
Coorientadora
Dr^a. Márcia Rufini
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

da Silva, Jacqueline Savana.

New strains of *bradyrhizobium* enrich plant biomass nitrogen
content in legume species for use as green manure / Jacqueline
Savana da Silva. - 2020.

106 p. : il.

Orientador(a): Fatima Maria de Souza Moreira.

Coorientador(a): Dâmiany Pádua de Oliveira, Márcia Rufini.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. *Crotalaria spectabilis*. 2. *Stizolobium aterrimum*. 3. Fixação
biológica de nitrogênio. 4. Seleção de estirpes. 5. Inoculante. I.
Moreira, Fatima Maria de Souza. II. de Oliveira, Dâmiany Pádua.
III. Rufini, Márcia. IV. Título.

JACQUELINE SAVANA DA SILVA

**NEW STRAINS OF *Bradyrhizobium* ENRICH PLANT BIOMASS NITROGEN CONTENT
IN LEGUME SPECIES FOR USE AS GREEN MANURE**

**NOVAS ESTIRPES DE *BRADYRHIZOBIUM* ENRIQUECEM EM N A FITOMASSA DE
ESPÉCIES LEGUMINOSAS DESTINADAS À ADUBAÇÃO VERDE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Microbiologia e Bioquímica do Solo, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em, 28 de agosto de 2020.

Dr. Celso Aita UFSM

Dr. Daniel Rume Casagrande UFLA

Dr. Paulo Ademar Avelar Ferreira UFSM

Dr^a. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega UFRB

Prof^a. Dr^a. Fatima Maria de Souza Moreira

Orientadora

Dr^a. Dâmiany Pádua de Oliveira

Coorientadora

Dr^a. Márcia Rufini

Coorientadora

**LAVRAS - MG
2020**

AGRADECIMENTOS

Agradeço À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Ciência do Solo, ao Departamento de Agricultura, ao CNPq (Processo: 140757/2016-3), FAPEMIG e CAPES que contribuíram para minha formação e concretização desse trabalho,

À Profa. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira por sua orientação ao longo de todos esses anos e por sempre incentivar meu crescimento,

Às minhas coorientadoras Dâmiany e Márcia pela orientação e ajudas incansáveis no desenvolvimento desse projeto,

Ao professor Élberis pela ajuda e amizade,

À banca de defesa, pela disponibilidade e contribuição,

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia do Solo (LMS) Marlene, Manuel e Paulo pela amizade e ajudas constantes.

Aos ICs que trabalharam arduamente nesse trabalho: Celso, Thiago, Maria, Priscila, Lourdes, Carlos, André. Sem vocês seria impossível desenvolver esse projeto.

Aos demais parceiros cuja contribuição direta ou não foi essencial: Osnar, Gustavo, Carina, Devison, Flávia, Felipe, Karl, Silvino, Guilherme, Bruno, Maria Ligia, Dulce, Teo, Milton, Giuliana, Antônio, Aline, Lívia, Roberto, Mariene, Dirce,

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo pela amizade e apoio,

Aos meus pais Jovita e Jurandir que trabalhou duro, em todos os sentidos, para me ensinar os mais nobres valores da vida,

Ao meu namorado, amigo e parceiro Moisés que me entendeu quando eu mesma não me entendia, que não me deixou desistir, mas antes caminhou de mãos dadas comigo nessa jornada, obrigada!

Aos meus irmãos Juliano, Juliana e Marcelo pelo carinho e cuidado que sempre depositam sobre mim,

Aos meus cunhados Flávia e Carmelo pela amizade e disponibilidade em ajudar sempre,

Aos meus maravilhosos sobrinhos Otávio, Rafael, Thallys e Luigi que me ensinaram que as melhores coisas da vida estão nas coisas mais simples, como a brincadeira de uma criança, a Dáia ama muito vocês!

À minha prima e amiga Jô por seu amor e amizade que sempre me alcançam, independente da distância. Você é minha irmã de alma!

À minha amiga Damy por sua amizade e grande empatia que me abraçou no momento em que eu mais precisava, sempre grata feinha!

E por último, porém mais importante, a Deus na pessoa do Seu Filho Jesus Cristo por me conceder a experiência mais maravilhosa já relatada: o dom da vida. Te agradeço Pai, por sua bondade infinita e por me sustentar firme, pois até aqui o Senhor me ajudou. Te honro!

RESUMO

A utilização de espécies leguminosas como *Crotalaria spectabilis* e *Stizolobium aterrimum* em simbiose com rizóbios eficientes na adubação verde é promissora, pois pode maximizar a produção de fitomassa enriquecida com nitrogênio (N) através da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Estudos prévios apontam eficiência simbiótica de rizóbios que poderia ampliar a relação de estirpes aprovadas como inoculantes para *C. spectabilis* e *S. aterrimum* demandando avaliações em campo para confirmação dos bons resultados verificados em casa de vegetação. Diante disso, foram objetivos desse estudo: *i*) avaliar as eficiências simbiótica e agronômica de novas estirpes de *Bradyrhizobium* em *C. spectabilis* e *S. aterrimum*, em vasos com solo e em campo, visando corroborar sua indicação como inoculantes para essas espécies; *ii*) determinar, através de uma marcha de FBN, a contribuição das novas estirpes de *Bradyrhizobium* no acúmulo de N na fitomassa da *C. spectabilis* em quatro épocas de corte para uso como adubo verde e, *iii*) verificar a contribuição da *S. aterrimum* inoculada como adubo verde para o milho silagem subsequente. Os experimentos foram realizados em Lavras-MG, sempre em blocos ao acaso, com quatro repetições, sendo que para *C. spectabilis* em campo também se adotou esquema de parcelas subdivididas. Em vasos, a eficiência dos tratamentos, para ambos os adubos verdes, foi avaliada aos 60 dias após semeadura (DAS), e também aos 140 e 100 DAS para *C. spectabilis* e *S. aterrimum*, respectivamente. Essa última também foi avaliada aos 170 DAS (florescimento) em campo. A contribuição de *S. aterrimum* inoculado e com adubação de arranque também foi avaliada na eficiência agronômica do milho silagem subsequente, em campo. As estirpes UFLA05-03, UFLA05-09 e UFLA05-14 são eficientes em *C. spectabilis*. A estirpe UFLA05-03 possui potencial biotecnológico como inoculante para a espécie; a inoculação em *C. spectabilis* aumenta a produção de fitomassa enriquecida em N, e pode beneficiar a cultura posterior. As novas estirpes inoculadas em *S. aterrimum* aumentam a produtividade de fitomassa enriquecida em N destinada à adubação verde; palhadas de *S. aterrimum* com adubação de arranque e inoculadas com as estirpes UFLA05-19, UFLA05-20, BR2811 e INPA104A incrementam a produtividade do milho silagem.

Palavras-chave: *Crotalaria spectabilis*. *Stizolobium aterrimum*. Fixação biológica de nitrogênio. Seleção de estirpes. Inoculante.

ABSTRACT

The use of leguminous species such as *Crotalaria spectabilis* and *Stizolobium aterrimum* in symbiosis with rhizobia efficient in green manure is promising, since it can maximize the production of nitrogen-enriched phytomass through biological nitrogen fixation (FBN). Previous studies point to the symbiotic efficiency of rhizobia that could expand the list of strains approved as inoculants for *C. spectabilis* and *S. aterrimum*, requiring field evaluations to confirm the good results verified in the greenhouse. Therefore, the objectives of this study were: i) to evaluate the symbiotic and agronomic efficiencies of new strains of *Bradyrhizobium* in *C. spectabilis* and *S. aterrimum*, in pots with soil and in the field, in order to corroborate their indication as inoculants for these species; ii) determine, through an FBN march, the contribution of new strains of *Bradyrhizobium* in the accumulation of N in the phytomass of *C. spectabilis* in four cutting seasons for use as green manure and, iii) verify the contribution of inoculated *S. aterrimum* as green manure for subsequent silage corn. The experiments were carried out in Lavras-MG, always in random blocks, with four replications, and for *C. spectabilis* in the field, a split plot scheme was also adopted. In pots, the efficiency of treatments, for both green manures, was evaluated at 60 days after sowing (DAS), and also at 140 and 100 DAS for *C. spectabilis* and *S. aterrimum*, respectively. In pots, the efficiency of treatments, for both green manures, was evaluated at 60 days after sowing (DAS), and also at 140 and 100 DAS for *C. spectabilis* and *S. aterrimum*, respectively. The latter was also evaluated at 170 DAS (flowering) in the field. The contribution of inoculated *S. aterrimum* and starter fertilizer was also evaluated in the agronomic efficiency of subsequent silage corn in the field. Strains UFLA05-03, UFLA05-09 and UFLA05-14 are efficient in *C. spectabilis*. The strain UFLA05-03 has biotechnological potential as an inoculant for the species; inoculation in *C. spectabilis* increases the production of N-enriched phytomass and can benefit subsequent cultivation. The new strains inoculated in *S. aterrimum* increase the productivity of N-enriched phytomass for green manure; *S. aterrimum* straws with starter fertilizer and inoculated with strains UFLA05-19, UFLA05-20, BR2811 and INPA104A increase the productivity of silage corn.

Keywords: *Crotalaria spectabilis*. *Stizolobium aterrimum*. Biological nitrogen fixation. Strain selection. Inoculant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1	
Figure 1 -	Monthly variation of maximum, mean, and minimum temperatures and rainfall during the period of conducting the experiments. The pot experiment lasted from October 2017 to March 2018 and the field experiment from November 2017 to April 2018..... 72
Figure 2 -	Number of nodules (NN) and nodule dry matter (NDM) of <i>Crotalaria spectabilis</i> cultivated in conventional planting area, evaluated at 60, 90, 120 e 150 days after sowing. Mean of four replications of the treatments: inoculation of strains UFLA 05-03, UFLA 05-09, UFLA 05-14 e BR 2811 and non-inoculated controls: without (WoN) and with (WN) 70 kg N-urea ha ⁻¹ 73
Figure 3 -	Shoot dry matter (SDM) of <i>C. spectabilis</i> at different treatments: [inoculation of LNNFB strains and non-inoculated controls: without (WoN) and with (WN) 70 kg N-urea ha-1] in conventional planting area, evaluated at 60, 90, 120 e 150 days after sowing..... 74
Figure 4 -	Shoot N accumulation (SNA) of <i>C. spectabilis</i> at different treatments: [inoculation of LNNFB strains and non-inoculated controls: without (WoN) and with (WN) 70 kg N-ureia ha-1] in conventional planting area, evaluated at 60, 90, 120 e 150 days after sowing..... 75
ARTIGO 2	
Figura 1 -	Gráfico de médias mensais de precipitação e temperatura durante o período de instalação dos experimentos de campo..... 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Influência do uso de diferentes espécies de adubos verdes no cultivo do milho em diferentes regiões do Brasil. Ensaios realizados em condições de campo.....	27
ARTIGO 1		
Table 1 -	Chemical and physical properties of soil samples, taken at the 0.00-0.20 m depth layer, and geographic coordinates of the experimental area in Lavras-MG.....	64
Table 2 -	Identification of strains inoculated in <i>C. spectabilis</i> in pots with soil and at field conditions.....	65
Table 3 -	Contrast of mean values for number of nodules (NN), nodule dry matter (NDM), plant height (PH), indirect chlorophyll measurement (ICM), root dry matter (RDM), shoot dry matter (SDM) and shoot N accumulation (NAS) of <i>C. spectabilis</i> cultivated in pots with non-sterile soil (greenhouse), at 60 DAS.....	66
Table 4 -	Contrast of mean values for number of nodules (NN), nodule dry matter (NDM), plant height (PH), indirect chlorophyll measurement (ICM), root dry matter (RDM), shoot dry matter (SDM) and shoot N accumulation (NAS) of <i>C. spectabilis</i> cultivated in pots with non-sterile soil (greenhouse), at 140 DAS.....	68
Table 5 -	Mean values of shoot dry matter (SDM) of <i>C. spectabilis</i> cultivated in conventional planting area, evaluated at 60, 90, 120 e 150 DAS.....	70
ARTIGO 2		
Tabela 1 -	Características químicas e físicas e classe textural de amostra de solo coletada na profundidade de 0 a 20 cm, antes da implantação dos experimentos em vasos com solo e campo.....	93
Tabela 2 -	Identificação das estirpes de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio Nodulíferas testadas em mucuna-preta em vasos com solo não estéril e em campo.....	94
Tabela 3 -	Valores médios de número (NN) e massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR), leitura indireta de clorofila (LIC), fitomassa seca (FSPA) e acúmulo de N na parte aérea (ANPA) de mucuna-preta, inoculada com estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> comparadas a controles, e cultivada em vasos com Latossolo Vermelho por 60 dias após sua semeadura.....	95
Tabela 4 -	Valores médios de número (NN) e massa seca de nódulos (MSN), leitura indireta de clorofila (LIC), massa seca de raiz (MSR) e fitomassa seca da parte aérea (FSPA) de mucuna-preta, inoculadas com estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> comparadas a controles, e cultivada em vasos com Latossolo Vermelho por 100 dias após sua semeadura.....	97
Tabela 5 -	Valores médios de número (NN) e massa seca de nódulos (MSN), fitomassa seca (FSPA) e acúmulo de N na parte aérea (ANPA) de plantas de mucuna-preta inoculadas com estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> comparadas a controles, e coletadas no florescimento em um Latossolo Vermelho de Lavras-MG.....	99
Tabela 6 -	Valores médios de número (NN), massa seca de nódulos (MSN), fitomassa seca da parte aérea (FSPA) de plantas de mucuna-preta, inoculada com estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> comparadas a controles, e coletadas aos 80 DAS em um Latossolo Vermelho Amarelo.....	101

Tabela 7 - Valores médios de leitura indireta de clorofila do milho (LIC-Mi) no estágio VT e em R3/R4, de altura das plantas (AP), produtividade, teor de proteína bruta (TPB-MS) e acúmulo de N da parte aérea do milho silagem (ANPA-MS) cultivado sob palhada de mucuna-preta inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium* comparadas a controles, em campo, em um Latossolo Vermelho-Amarelo de Lavras-MG..... 103

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 Fixação biológica de nitrogênio.....	14
2.2 Seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL).....	16
2.3 Adubação verde.....	17
2.4 Adubação verde como fonte de nutrientes para as plantas.....	19
2.5 Crotalária.....	21
2.6 Mucuna-preta.....	22
2.7 O milho e a adubação verde.....	25
2.8 Milho silagem.....	31
REFERÊNCIAS.....	33
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....	45
ARTIGO 1 - New strains of <i>Bradyrhizobium</i> enrich plant biomass N content in <i>Crotalaria spectabilis</i> for use as a green manure.....	46
ARTIGO 2 - Eficiência simbiótica e agrônômica de novas estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> em mucuna-preta e suas contribuições como adubo verde no milho para silagem.....	76
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	106

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é mundialmente reconhecido por sua agricultura, que vêm ampliando suas fronteiras devido ao aumento da demanda mundial por seus produtos. Considerando o apelo atual pela produção sustentável e sua importância, é fundamental a busca de alternativas mais sustentáveis. Neste contexto, a adubação verde surge como uma dessas alternativas, podendo ajudar a manter ou aumentar a capacidade produtiva dos solos, já que atua como condicionante de suas características físicas, químicas e biológicas.

A adubação verde aumenta os níveis de matéria orgânica do solo, bem como, a capacidade de troca de cátions e a disponibilidade de macro e micronutrientes. Essa prática também aumenta a ciclagem de nutrientes, que são acumulados durante o crescimento e liberados durante a decomposição das espécies de adubos verdes utilizadas (LIMA FILHO et al., 2014a, 2014b). Benefícios à física do solo também podem ser obtidos pela utilização dos adubos verdes, dentre eles encontram-se a melhoria da densidade do solo, da macro, micro e prosidade total, da agregação, da infiltração e retenção de água no solo, entre outros (ABREU; REICHERT; REINERT, 2004; BONINI; ALVES, 2011; MATHEUS; KANTUR; BORA, 2018; SOUZA; SOUZA; CARVALHO, 2014; SOUZA; GUIMARÃES; FAVARATO, 2015; SILVA et al., 1998). Determinadas espécies de adubos verdes também atuam na redução do ataque de pragas e doenças (BRAZ et al., 2016; DEBERDT et al., 2015; FERRAZ et al., 2007; WUTKE; CALEGARI; WILDNER, 2014) bem como no controle de plantas espontâneas (WUTKE; CALEGARI; WILDNER, 2014).

Dentre os adubos verdes mais utilizados estão a *Crotalaria spectabilis* (crotalária) e o *Stizolobium aterrimum* (mucuna-preta) cuja utilização é bastante promissora mediante a capacidade de estabelecerem simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL) que promovem a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) e potencializam o aporte do nutriente ao sistema solo-planta (LIMA FILHO et al., 2014a, 2014b). A FBN pode ser maximizada por meio da inoculação de estirpes selecionadas e eficientes proporcionando consideráveis benefícios ambientais e econômicos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Além de serem poucas, as estirpes aprovadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para essas espécies de adubos verdes, o processo de recomendação daquelas aprovadas para a crotalária restringiu-se a apenas testes em vasos com solo (BRASIL, 2011).

Diante disso, a prospecção de novas estirpes mais eficientes na FBN para *Crotalaria spectabilis* e o *Stizolobium aterrimum* é justificada, sobretudo, diante de trabalhos cujos resultados,

em alguns casos, têm demonstrado superioridade sobre aquelas aprovadas pelo MAPA, em condições axênicas e/ou em vasos com solo para essas espécies e/ou para outras como *Vigna unguiculata*, *Macroptilium atropurpureum* e *Phaseolus lunatus* (COSTA, 2016; COSTA et al., 2017; FLORENTINO et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2012, 2015; RANGEL et al., 2017). Como diversos fatores ambientais e relacionados aos simbiossomas podem afetar o sucesso da simbiose, a eficiência em FBN e a competitividade com microrganismos nativos dessas novas estirpes devem ser validadas também em condições edafoclimáticas de campo, objetivando a obtenção de inoculantes adequados (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Uma cultura sucessora que tem se beneficiado da adubação verde é o milho (AMADO et al., 2007; CARLESI et al., 2019; CONCEIÇÃO et al., 2005; MEDEIROS et al., 2019; OKITO et al., 2004; SCIVITTARO et al., 2000; SILVA et al., 2018) sendo uma de suas principais finalidades a produção de silagem que exerce grande importância para o estado de Minas Gerais, importante bacia leiteira nacional (CONAB, 2020).

As principais hipóteses do atual trabalho são de que o cultivo prévio de *Crotalaria spectabilis* e *Stizolobium aterrimum* inoculadas com BFNNL eficientes na FBN poderia antecipar o período de corte da *C. spectabilis* e potencializar o aporte de N para o milho incrementando a produtividade de sua silagem, além de proporcionar diversos benefícios ao sistema solo-planta (AITA et al., 2001; OKITO et al., 2004; SCIVITTARO et al., 2000). As novas estirpes de *Bradyrhizobium* selecionadas para a crotalaria e mucuna preta ainda não testadas em condições de campo são tão ou mais efetivas do que as estirpes recomendadas atualmente pelo MAPA para essas leguminosas.

Diante do exposto, os objetivos desse trabalho foram *i)* avaliar as eficiências simbiótica e agrônômica de novas estirpes de *Bradyrhizobium* em *C. spectabilis* e *S. aterrimum*, em vasos com solo e em campo, visando corroborar sua indicação como inoculantes para essas espécies; *ii)* determinar a contribuição das novas estirpes de *Bradyrhizobium* no acúmulo de N na fitomassa da *C. spectabilis* em quatro épocas de corte para incorporação no solo e, *iii)* verificar a contribuição da *S. aterrimum* inoculada como adubo verde para o milho silagem subsequente.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio (N) é um elemento essencial à manutenção da vida no planeta, sendo constituinte de compostos vitais, tais como; aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas, entre outros. Nos vegetais esse nutriente é exigido em grande quantidade devido à multiplicidade de reações químicas e biológicas nas quais o elemento está envolvido. Entretanto, a disponibilidade do N é restrita, pois, apesar de ser abundante na atmosfera terrestre na forma de N_2 , essa forma não é assimilável para a maioria dos organismos, sendo o N utilizável pelos vegetais oriundo de outros processos, naturais ou não.

No processo industrial de obtenção de fertilizantes nitrogenados são necessárias diversas reações químicas, através de um processo conhecido como “Haber-Bosch”, que demanda altas temperaturas e pressões, com conseqüente consumo de combustíveis fósseis, tornando-o bastante complexo e oneroso. Além disso, a eficiência de uso desses fertilizantes geralmente é baixa (50%) sendo facilmente perdido por lixiviação ou volatilização (CANTARELLA, 2007), principalmente com um manejo inadequado, como a falta de cobertura vegetal. Diante disso, a fixação biológica de nitrogênio é uma alternativa sustentável para obtenção do N necessário à produção agrícola por ser um processo natural mediado por bactérias e por requerer apenas energia metabólica para sua execução (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A fixação biológica de N (FBN) é realizada por bactérias de vida livre ou por bactérias e actinobactérias em simbiose com espécies vegetais e consiste no processo da redução do N_2 em NH_3 pela ação da enzima nitrogenase, presente nesses organismos. Esse processo contribui com a maior parcela de N fixado por ano no planeta, aproximadamente 65% do total (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Dentre as bactérias que realizam simbiose com espécies vegetais estão as bactérias fixadoras de N nodulíferas em leguminosas (BFNNL), também conhecidas como rizóbios.

Essa simbiose é vantajosa tanto para a leguminosa que adquire o N assimilável quanto para a BFNNL que é suprida pelos fotoassimilados produzidos pela planta hospedeira. A FBN ocorre no interior de estruturas específicas, denominadas de nódulos, que se desenvolvem nas raízes das leguminosas ou excepcionalmente no caule. Os nódulos ativos apresentam cor avermelhada no seu interior devido à presença da leghemoglobina, proteína que transporta o O_2 para o metabolismo

aeróbio dos bacteróides (BFNNL) presentes no interior dos nódulos e mantem baixa a concentração de O₂ no meio, uma vez que a enzima nitrogenase é extremamente sensível a sua presença.

A simbiose entre BFNNL e as espécies leguminosas promove benefícios econômicos e ecológicos para os sistemas agrícolas e florestais. Dentre esses, está o aumento da fertilidade e matéria orgânica do solo (HOEFSLOOT et al., 2005), da produção vegetal (LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006), e a recuperação de áreas degradadas (MAESTRE et al., 2006). No âmbito econômico há a redução do uso dos fertilizantes nitrogenados, uma vez que a FBN pode substituir total ou parcialmente o uso desses produtos para o cultivo de determinadas leguminosas (FARIAS et al., 2016; MOREIRA, 1994; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; OLIVEIRA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019; RUFINI et al, 2011; RUFINI et al, 2014; RUFINI et al, 2016; SOARES et al., 2016) e a consequente diminuição de contaminação de águas subterrâneas.

Um exemplo importante do benefício da FBN é o cultivo de soja no Brasil, onde a adubação nitrogenada é totalmente substituída por inoculantes contendo estirpes de BFNNL do gênero *Bradyrhizobium*. A técnica de inoculação promoveu uma economia de R\$ 24,9 bilhões para o país no ano de 2018, quando o Brasil se tornou líder mundial no uso de bactérias fixadoras de N₂ na agricultura ao comercializar aproximadamente 73,5 milhões de doses de inoculantes (GLOBALFERT, 2020). Além disso, a FBN também apresenta outras funções, como a estimulação ao crescimento vegetal pela produção de hormônios, de exopolissacarídeos e pela solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis (BOMFETI et al., 2011; de OLIVEIRA-LONGATTI et al, 2015; HARA; OLIVEIRA, 2004; MARRA et al., 2011; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Diante disso, as instituições de pesquisas vêm desenvolvendo trabalhos de prospecção de BFNNL capazes de substituir total ou parcialmente a adubação nitrogenada no cultivo das leguminosas, a exemplo do que ocorre com o cultivo de soja no Brasil (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Para isso, demanda-se uma série de trabalhos de casa de vegetação e campo visando comprovar a eficiência em fixar N de determinada estirpe de BFNNL quando em simbiose com determinada espécie leguminosa. Ainda são grandes os desafios a serem superados, devido ao elevado número de espécies que podem se beneficiar da FBN e pela ampla diversidade de diazotróficos com potencial agrícola.

2.2 Seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL)

Nem sempre a população nativa de rizóbios do solo é capaz de estabelecer uma simbiose mutualística eficiente com o hospedeiro cultivado, sendo, então, necessária a inoculação de estirpes selecionadas para a espécie vegetal-alvo. Mas, como a simbiose pode ser afetada por diferentes fatores (clima, espécie hospedeira, microrganismo, tipo de solo, pH, entre outros), a seleção de estirpes de BFNNL visa alcançar a máxima eficiência do processo em diferentes condições edafoclimáticas. Dessa forma, é possível a obtenção de estirpes competitivas com a população nativa, estáveis geneticamente e que aumentem a produção com redução de custos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O processo de seleção de estirpes de BFNNL que vise à obtenção de um inoculante para determinada espécie vegetal, possui basicamente quatro etapas fundamentais. A primeira etapa consiste em avaliar a capacidade de nodulação e fixação de N para a espécie vegetal alvo em condições axênicas e controladas (autenticação). Geralmente esses testes são realizados em recipientes menores com solução nutritiva livre ou com baixo teor de N mineral.

A segunda etapa consiste em testar as estirpes selecionadas na primeira em vasos maiores contendo substrato e solução nutritiva com baixo teor de N, ainda em condições axênicas e controladas, em casa de vegetação. O objetivo dessa etapa é avaliar seu potencial de fixação de N na planta de interesse. As estirpes selecionadas (eficientes) serão submetidas à terceira etapa, em vasos com solo não esterilizado, em casa de vegetação, para a comprovação de sua eficiência simbiótica e de sua capacidade competitiva em relação às estirpes nativas em condições mais estressantes do solo.

A quarta e última etapa, consiste em testar as estirpes selecionadas em experimentos de campo, em diferentes condições edafoclimáticas. Em todas as etapas do processo de seleção é necessária a adição de três tratamentos controle: um sem inoculação e sem nitrogênio mineral; um sem inoculação e com nitrogênio mineral e um inoculado com estirpe eficiente previamente selecionada para a espécie (caso exista) e/ou reconhecidamente nodulífera na espécie (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Esse processo de seleção de estirpes eficientes em fixar o N em espécies vegetais de importância econômica tem sido um dos principais alvos da pesquisa com FBN. Além da eficiência, essas estirpes devem apresentar outras características, como serem boas competidoras por sítios de infecção com relação às estirpes nativas, ter boa sobrevivência e adaptação às diversas condições edafoclimáticas, além de possuir a habilidade de fixar N numa ampla gama de hospedeiros. Estirpes

que não tenham um bom desempenho nos estágios iniciais de seleção são eliminadas, pois, se não estabelecem simbiose eficiente em condições nutricionais e ambientais adequadas, também não o farão nas condições mais estressantes do solo.

No Brasil, estirpes de BFNNL já foram selecionadas para 94 espécies vegetais (BRASIL, 2011). No entanto, a utilização da tecnologia de inoculação com esses microrganismos ainda é muito restrita no país, devido a sua pouca difusão para outras espécies vegetais, a exceção da soja. Portanto, as pesquisas com FBN são necessárias para a ampliação do uso dessa biotecnologia para as espécies que não possuem estirpes inoculantes aprovadas, bem como, para a seleção de novas estirpes eficientes adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas brasileiras, incluindo as estirpes aprovadas pelo MAPA e que foram testadas em número reduzido de experimentos restritos a poucas condições climáticas e edáficas.

2.3 Adubação verde

A adubação verde consiste na prática de se incorporar ao solo massa vegetal não decomposta, de plantas cultivadas no local ou importadas, com a finalidade de preservar e/ou restaurar a produtividade das terras agricultáveis. Essa é uma técnica muito antiga e foram os chineses os primeiros a utilizá-la. Na dinastia Chou (1134-247 a.C), os restos de cultura e vegetação natural dos campos cultivados eram usados como adubos (ROSSI; CARLOS, 2014).

Depois disso, gregos e romanos empregaram largamente as leguminosas como rotação de culturas. Em 430 a.C., o célebre historiador grego Xenofonte preconizava a adubação verde como um dos meios de conservar e melhorar a fertilidade do solo. Theophrasto (372-287 a. C.) registrou que os povos da Thessalia e da Macedônia já faziam uso dessa prática naquela época. Na época do Império Romano, foi encontrada nas ruínas da cidade Herculano a inscrição “*Sator arepo tenet opera rotas*” que no latim quer dizer “Agricultor sábio sempre faz rotação” (WUTKE et al., 2007). Essa frase representa um palíndromo perfeito que têm despertado a curiosidade ao longo do tempo (LIMA FILHO et al., 2014a, 2014b; ROSSI; CARLOS, 2014).

Os benefícios da adubação verde foram usufruídos por mais de dois mil anos sem que fossem elucidados cientificamente. Após isso, importantes figuras históricas como Lavoisier, Pasteur, Kock, Hellriegel, Wilfarth e Beijerinck contribuíram com seus achados científicos para que houvesse uma melhor compreensão desses benefícios. No Brasil, a adubação verde é conhecida há pelo menos 100 anos e seu primeiro relato técnico aqui foi o livro intitulado *Adubos verdes: sua produção e modo*

de emprego publicado por Gustavo Rodrigues Pereira D’Utra (D’UTRA, 1919). A partir de então, a pesquisa com adubos verdes não mais parou, sendo sempre incentivada por seus inúmeros benefícios e pela vasta quantidade de espécies vegetais utilizadas (ROSSI; CARLOS, 2014).

A adubação verde gera inúmeros benefícios químicos, físicos e biológicos para a agricultura advindos da cobertura vegetal viva ou morta, incorporada ou não ao solo e influenciadas pelas condições locais e pela frequência de uso (WUTKE; CALEGARI; WILDNER, 2014). Dentre eles podemos citar: incremento da fertilidade natural do solo; economia de fertilizantes (N e P); proteção do solo contra erosões hídrica e eólica; aumento da permeabilidade e retenção de água no solo; melhoria na distribuição e estoque de C no solo; formação e manutenção da matéria orgânica do solo (MOS); aumento da atividade biológica do solo; redução da perda de nutrientes por volatilização e lixiviação (N e K); facilitação da assimilação dos nutrientes (mobilização, ciclagem e solubilização); controle das variações térmicas das camadas superficiais do solo; controle de pragas e doenças (nematóides); controle de plantas espontâneas por meio de substâncias alelopáticas ou por competição; promoção da cobertura vegetal do plantio direto; aração e introdução biológica em profundidade, dentre outros (AITA et al., 2001; AITA; GIACOMINI, 2003; CALEGARI et al., 1993; FINHOLDT et al., 2009; LIMA FILHO et al., 2014a, 2014b; MERCANTE et al., 2014; MOREIRA, 2006).

Além disso, a adubação verde também contribui com benefícios econômicos, sociais e ambientais. Dentre esses podemos citar os relacionados ao sistema de plantio direto (SPD) cuja contribuição está na mitigação do efeito estufa através da redução da emissão de gases para a atmosfera, bem como pelo sequestro de carbono; a preservação de recursos naturais e a redução do desmatamento na integração lavoura-pecuária (WUTKE; CALEGARI; WILDNER, 2014). Na atualidade, a adubação verde tem contribuído consideravelmente na produção de alimentos mais saudáveis seja na agricultura orgânica ou no cultivo com o mínimo de insumos e de degradação ambiental (LIMA FILHO et al., 2014a, 2014b; WUTKE; CALEGARI; WILDNER, 2014).

Dessa forma, a adubação verde tem sido utilizada na rotação, consórcio e sucessão de culturas, na produção de grãos, na reforma da cana de açúcar e pastagens, no sistema convencional de preparo do solo, no sistema de plantio direto, no cultivo mínimo, na agricultura orgânica, no controle de nematóides do solo, como forrageiras, entre outras funções (LIMA FILHO et al., 2014a, 2014b; WUTKE; CALEGARI; WILDNER, 2014).

Diversas espécies vegetais podem ser utilizadas como adubos verdes, tais como as poáceas, crucíferas e compostas, mas são as leguminosas as mais requeridas para essa prática, devido

principalmente à sua capacidade de se beneficiar da FBN. Além disso, as leguminosas são mais tenras no estágio apropriado para o corte (pleno florescimento e início de formação de vagens), a decomposição de sua fitomassa é mais rápida, o que favorece a mineralização e liberação de nutrientes reciclados do solo e do N fixado simbioticamente (NASCIMENTO; MATTOS; MENDONÇA, 2016; WUTKE; CALEGARI; WILDNER, 2014).

2.4 Adubação verde como fonte de nutrientes para as plantas

Atualmente há uma importante demanda por manejos adaptados a diferentes condições edafoclimáticas condicionada pelo apelo da sustentabilidade agrícola. Dessa forma, a busca por sistemas agrícolas menos dependentes de fertilizantes minerais tem sido estimulada. Assim, a adubação verde coopera para a substituição parcial ou total da adubação mineral, principalmente da nitrogenada. Essa prática possui grande importância na ciclagem de nutrientes no solo, tanto dos fertilizantes minerais quanto dos orgânicos (ALCÂNTARA et al., 2000; ALVARENGA et al., 1995; SILVA et al., 2006b).

A adubação verde é fonte importante de MOS que engloba resíduos vegetais em variados estágios de decomposição, a biomassa microbiana, as raízes e o húmus (STEVENSON, 1994). A decomposição da MOS é o primeiro importante processo na ciclagem dos nutrientes e a suscetibilidade dos resíduos à sua ação, relaciona-se à composição química e orgânica dos mesmos. Entende-se por decomposição da MOS, a quebra dos compostos orgânicos em monômeros, sendo um processo regulado pelas condições físico-químicas do ambiente, pela qualidade do substrato, pela comunidade decompositora e pela interação desses fatores (CARVALHO et al., 2011; CORREIA; ANDRADE, 1999).

A MOS é a principal responsável pela CTC de solos tropicais e subtropicais, é fonte de N, P, S e outros nutrientes para os vegetais, além de formar complexos fosfo-húmicos (fraca retenção pelo solo) reduzindo a fixação do P em função do revestimento das partículas de argila pelo húmus e do menor contato entre o nutriente e as partículas (NOVAIS; SMITH, 1999). Durante a decomposição da MOS são liberados ácidos orgânicos capazes de reagir com óxidos e hidróxidos presentes no solo, bloqueando seus sítios de adsorção e aumentando a disponibilidade de P em solução (HAVLIN et al., 2016).

Outro processo importante na ciclagem dos nutrientes é a mineralização. Mineralização é o processo pelo qual os monômeros que foram liberados das macromoléculas pela ação das enzimas

extracelulares durante a degradação (decomposição) são absorvidos e metabolizados pelas células microbianas que os convertem em formas inorgânicas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A grande importância desse processo reside na sua capacidade de converter substâncias orgânicas decomponíveis à formas inorgânicas (CO_2 , NH_3 , NO_3 , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} e SO_4^{2-}) que são absorvíveis pelas plantas e pela microbiota do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Outros processos que também podem afetar a disponibilidade de nutrientes do solo para as plantas são aqueles relacionados às transformações de N e S, sendo eles a amonificação, a nitrificação, a desnitrificação, a oxidação do S e a redução do SO_4^{2-} (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O nutriente mais estudado nas pesquisas com adubos verdes é o N. Estudos com o uso de ^{15}N mostraram o aproveitamento desse nutriente oriundo de diferentes espécies de adubos verdes por distintas culturas. Em condições de campo, a utilização de *Pennisetum glaucum*, *Vicia villosa*, *Crotalaria juncea* e *Medicago sativa* proveu respectivamente, 8; 12,3; 13 e 21 % de N para o cultivo do milho (ACOSTA et al., 2011; HARRIS; HESTERMAN, 1990; SILVA et al., 2006b). Na cultura do arroz irrigado o aproveitamento do N disponibilizado pela decomposição da *Sesbania rostrata* chegou a quase 50 % (DIEKMANN; DE DATTA; OTTOW, 1993). Para o trigo, a contribuição da *Lens culinaris* foi de 19 % de N (BREMER; VAN KESSEL, 1992).

Os estudos de liberação do P dos resíduos culturais de adubos verdes ainda são escassos. Em uma pesquisa desenvolvida com o objetivo de avaliar a liberação de P e K dos resíduos culturais de aveia-preta, ervilhaca comum, nabo forrageiro e de consórcios de aveia e ervilhaca, em plantio direto, os autores observaram que aos 15 dias houve uma liberação de 43, 7 e 10 % do P contidos na ervilhaca comum, nabo-forrageiro e aveia-preta, respectivamente. Já aos 29 dias, a liberação foi de 59% para a ervilhaca e 27% para a aveia (GIACOMINI et al., 2003).

Ainda sobre o estudo supracitado, a quantidade total de K liberado dos resíduos culturais da aveia-preta, ervilhaca comum e do nabo forrageiro após seis meses foi de 91, 73 e 86 kg ha^{-1} , respectivamente. Nesse mesmo período, os resíduos culturais provenientes dos consórcios com 15 e 45% de aveia na mistura com a ervilhaca liberaram aproximadamente 81 e 103 kg ha^{-1} de K, respectivamente (GIACOMINI et al., 2003). Aos 15 dias após o manejo, o K remanescente da ervilhaca comum, nabo-forrageiro e aveia-preta era de 10, 15 e 45 %, respectivamente, nos resíduos culturais. O K é o nutriente mais rapidamente liberado dos resíduos culturais, deve-se a isso, o fato de não se associar a nenhum componente estrutural do tecido vegetal (MARSHNER, 2011).

2.5 Crotalária

A *Crotalaria spectabilis* Roth (Syn. *C. sericea* Retz, *C. retzii* Hitch) é uma espécie da Família Fabaceae originária da América do Sul (incluindo o Brasil) e do Norte. Popularmente conhecida como guizo de cascavel e chocalho de cascavel essa espécie é anual, ereta, de crescimento determinado, alcança de 1,2 a 1,5 m de altura e com sementes reduzidas em formato de rim (WUTKE; CALEGARI; WILDNER, 2014). É planta arbustiva e por isso pode ser usada em entrelinhas de culturas perenes sem prejudicar o trânsito de pessoas e máquinas.

Em relação à semeadura a época ideal é na primavera e verão no Centro-Oeste, Sul e Sudeste e durante o ano todo no Norte e Nordeste, sendo a densidade indicada em linha de 12 a 15 kg ha⁻¹ e de 15 a 20 kg ha⁻¹ quando a lanço. Possui rebrota e ressemeadura natural insuficiente (WUTKE; CALEGARI; WILDNER, 2014). *C. spectabilis* é de clima tropical e subtropical, suscetível à geada e apresenta bom comportamento nos diferentes tipos de solo, inclusive em solos com baixo teor de fósforo.

Dentre as várias aplicações de *C. spectabilis* está o controle de nematóides formadores de galhas (*Meloidogyne javanica* e *M. incógnita*) por ser uma má hospedeira e dificultar sua proliferação, além do aporte de matéria orgânica e consequente aumento de microrganismos desfavoráveis a esses nematóides (WUTKE; CALEGARI; WILDNER, 2014). *C. spectabilis* também pode ser utilizada para reduzir a densidade populacional e no manejo de áreas infestadas com *Pratylenchus brachyurus* (BRAZ et al., 2016; FERRAZ et al., 2007). Ainda em relação a doenças de plantas, essa espécie também é capaz de controlar a murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* quando cultivada anteriormente a essa cultura (DEBERDT et al., 2015).

C. spectabilis também apresenta potencial de fitorremediação de solos contaminados com As (LOPES et al., 2016; RANGEL et al., 2017), proporciona benefícios à física do solo (ABREU; REICHERT; REINERT, 2004), pode ser utilizada como planta de cobertura (AMADO et al., 2014; TENELLI et al., 2019) e como adubo verde devido a excelente produção de massa verde (15 a 30 t ha⁻¹), massa seca (3 a 8 t ha⁻¹) e de N estimado (100 a 160 kg ha⁻¹) que promovem aumentos de até 100% no rendimento das culturas sucessoras (ALBUQUERQUE et al., 2013; CALEGARI; CARLOS et al., 2014; NOGUEIRA et al., 2019; WUTKE; CALEGARI; WILDNER, 2014). *C. spectabilis* também melhora a eficiência do uso do N e pode aumentar a produção da soqueira da cana-de-açúcar (TENELLI et al., 2019).

O aporte de N oferecido pela crotalária para culturas sucessoras pode ser potencializado por sua capacidade de fixar o N atmosférico quando em simbiose com bactérias diazotróficas. A contribuição da FBN nos níveis de N em folhas do cafeeiro consorciado com *C. spectabilis* foi investigada através da técnica do ^{15}N em quatro fazendas da região montanhosa da Mata Atlântica em Minas Gerais. Demonstrou-se que *C. spectabilis* é uma leguminosa com alto potencial de transferência de N da FBN para o cafeeiro (aproximadamente 50%), sendo recomendada, portanto, sua utilização no consórcio com essa cultura (MENDONÇA et al., 2017).

Atualmente existem duas estirpes de BFNNL, ambas do gênero *Bradyrhizobium*, autorizadas pelo MAPA para a produção de inoculantes comerciais para *C. spectabilis*: a BR 2003 (SEMIA 6156) e a BR 2811 (SEMIA 6158) (BRASIL, 2011). Entretanto, como o sucesso da simbiose depende de diversos fatores ambientais e dos simbiossiontes, é imprescindível que os estudos de seleção de estirpes para a produção de inoculantes sejam realizados em diferentes condições edafoclimáticas para terem sua eficiência confirmada.

Os trabalhos de seleção de estirpes eficientes para *C. spectabilis* são escassos e limita-se a condições axênicas (FLORENTINO et al., 2014; RANGEL et al., 2017). Entretanto, podem demonstrar potencial biotecnológico para a produção de inoculantes para essa espécie. Um estudo sobre a eficiência simbiótica de estirpes isoladas de *C. spectabilis* de uma área contaminada com As mostrou que todas as estirpes estudadas foram mais eficientes na FBN que a estirpe aprovada BR 2811 (SEMIA 6158). E que, 11 das 13 estirpes avaliadas apresentaram peso da matéria seca e acúmulo de N da parte aérea superior ou igual ao do tratamento que recebeu N mineral. Os autores concluíram que a simbiose entre a estirpe UFLA 05-16 (*Rizobium tropici*) e *C. spectabilis* tem potencial para ser utilizada na fitoestabilização de solos contaminados por As.

2.6 Mucuna-preta

A mucuna-preta (*Mucuna pruriens*, sin. *Stizolobium aterrimum* Piper & Tracy) também conhecida como a “rainha” das leguminosas, pertence à Família Fabaceae, Subfamília Papilionoideae, Tribo Phaseoleae e originou-se na África. Também é conhecida pelos nomes populares de feijão-da-flórida, feijão-cabeludo-da-índia, feijão-de-gado, feijão-mucuna, feijão-macaco, feijão-maluco, feijão-veludo e mucuna-vilosa.

Seu ciclo é anual, é planta herbácea com hábito de crescimento prostrado/trepador e bastante vigorosa, com ramos trepadores de até 6 m de extensão lateral, podendo essa espécie atingir até 20 m

de comprimento Suas hastes e caules são longos e flexíveis, apresenta ráceros axilares, flores vistosas e grandes de coloração violácea ou branca, vagens largas e grossas que são deiscentes após maturação, com 3 a 6 sementes grandes e pretas de hilo branco (ABUD; REIS; TEÓFILO, 2009; WUTKE; CALEGARI; WILDNER, 2014). Possui um sistema radicular pivotante bem ramificado e de alto vigor que permite alcançar camadas inferiores no perfil do solo (CALEGARI, 1995).

Essa leguminosa possui um crescimento inicial rápido e uma elevada produção de fitomassa, também é resistente à seca, à sombra, às altas temperaturas, no entanto é suscetível à geada (CALEGARI; CARLOS, 2014). A mucuna-preta possui média exigência em condições de fertilidade de solos e elevada tolerância a alumínio (Al) sendo capaz de desenvolver-se bem em solos com reduzidos valores de saturação por bases (V ao redor de 35%), sendo, portanto, bastante adaptada às condições climáticas tropicais e subtropicais (FAO, 2019; WUTKE; CALEGARI; WILDNER, 2014).

Sua densidade de semeadura varia de 60 a 70 kg ha⁻¹ para plantio em linha e de 80 a 90 kg ha⁻¹ para o plantio a lanço e a época ideal para se semear é na primavera/verão para as regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste e o ano todo para Norte e Nordeste (CALEGARI; CARLOS, 2014). Sua ressemeadura natural e rebrota são suficientes para manter uma boa produção posteriormente e seu florescimento ocorre aproximadamente de 150 a 180 dias após o plantio (CALEGARI; CARLOS, 2014).

A mucuna-preta apresenta inúmeras utilidades: na alimentação animal (silagem, feno, grãos e vagens) (CALEGARI, 1995; PAULINO et al., 2014), na biodegradação de herbicidas (SANTOS, 2010; SOUTO et al., 2013; WUTKE; CALEGARI; WILDNER, 2014), na rotação de culturas, na recuperação da estrutura física de solos (BONINI; ALVES, 2011; MATHEUS; KANTUR; BORA, 2018; SILVA et al., 1998), na fitorremediação de solos contaminados (HERNANI; PADOVAN, 2014) por arsênio (RANGEL et al., 2014, 2017), chumbo (DE SOUZA et al., 2011) e boro (PEREIRA COSTA et al., 2018). A mucuna preta também pode ser utilizada no controle de plantas espontâneas na horticultura, na ornamentação e na adubação verde (MATHEUS; KANTUR; BORA, 2018; OKITO et al., 2004; SCIVITTARO et al., 2000; WUTKE; CALEGARI; WILDNER, 2014). Além disso, essa leguminosa também possui uma diversidade de propriedades medicinais (GROVER; YADAV; VATS, 2002; KATZENSCHLAGER et al., 2004).

Como adubo verde seu emprego é bastante incentivado na agricultura devido às altas quantidades de fitomassa produzidas que podem chegar a 29-50 t ha⁻¹ de fitomassa verde, 6 a 9 t ha⁻¹ de fitomassa seca e 1 a 1,5 t ha⁻¹ de sementes promovendo assim, a ciclagem de importantes

nutrientes, principalmente do N (de 120 a 210 kg ha⁻¹ de N), oriundo da FBN na mucuna-preta (AMBROSANO et al., 2011, 2013; ANDRADE NETO et al., 2010; BORKERT et al., 2003; MATOS et al., 2011; QUEIROZ et al., 2010; SANTOS et al., 2017; TABALDI et al., 2012, WUTKE; CALEGARI; WILDNER, 2014; ZACCHEO et al., 2016).

A FBN ocorre quando a mucuna-preta estabelece simbiose com BFNNL que habitam naturalmente o solo ou que foram inoculadas em suas sementes antes do plantio. Um dos principais benefícios desse processo são as consideráveis quantidades de N fixado pela BFNNL (até 157 kg ha⁻¹ ano⁻¹) que enriquecem sobremaneira a fitomassa dessa leguminosa (COSTA, 2016; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; RANGEL et al., 2017). Por esse motivo, instituições de pesquisa têm desenvolvido estudos em casa de vegetação e campo (condições axênicas e não) para comprovar a eficiência dessa simbiose. Consequentemente, existe hoje, uma estirpe de comprovada eficiência autorizadas pelo MAPA para a produção de inoculantes comerciais para a mucuna-preta, a BR 2811 (SEMIA 6158) pertencente ao gênero *Bradyrhizobium* (BRASIL, 2011).

Um trabalho com o objetivo de avaliar a eficiência simbiótica de 18 estirpes de *Bradyrhizobium* em mucuna-preta, em condições axênicas, mostrou que a estirpe INPA 104A acumulou 101% vezes mais N na parte aérea que o controle com alta concentração de N e 241% a mais que a estirpe recomendada BR 2811 (SEMIA 6158). Além disso, a INPA 104A, como também a UFLA 03-144 superaram os demais tratamentos na produção de fitomassa seca da parte aérea da mucuna-preta, demonstrando potencial biotecnológico para a produção de inoculantes para essa espécie, que necessita ainda ser investigado em condições não axênicas e em campo (COSTA, 2016).

Um estudo da eficiência simbiótica, em condições axênicas, de estirpes de BFNNL isoladas da mucuna-preta de uma área contaminada com arsênio mostrou que das 12 estirpes estudadas, seis superaram os resultados de fitomassa seca da parte aérea da estirpe recomendada BR 2811 (SEMIA 6158) e quatro do controle com alta concentração de N mineral (CN). Além disso, cinco estirpes avaliadas acumularam mais N na fitomassa seca da parte aérea que a BR 2811 (SEMIA 6158) e que o controle CN. Esses resultados mostram potencial biotecnológico dessas estirpes e sugerem a continuidade de sua pesquisa em condições diversas (RANGEL et al., 2017).

Ainda sobre seleção de estirpes eficientes foi desenvolvido um trabalho em Carpina, PE, com o objetivo de avaliar a eficiência simbiótica de estirpes de BFNNL com a mucuna-preta em condições de campo. Duas (T2.19A e T1.17M) das cinco estirpes avaliadas promoveram o acúmulo de N significativamente superior ao controle (112 e 104%), à inoculação com a mistura das estirpes aprovadas (99 e 91%) e à aplicação de nitrogênio mineral (58 e 52%), respectivamente. Portanto, os

autores concluíram que essas duas estirpes têm potencial para inoculação em mucuna-preta na adubação-verde (SANTOS et al., 2017).

A estirpe *Mp195* isolada de nódulos da mucuna preta consorciada com o cafeeiro no Paraná demonstrou alta eficiência simbiótica quando inoculada no feijão comum em vasos com solo não estéril. Nessas condições, *Mp195* apresentou acúmulo de N na parte aérea estatisticamente similar às estirpes aprovadas para a produção de inoculantes para o feijão: SEMIA 4077 (CIAT 899), SEMIA 4088 (H 12) e SEMIA 4080 (PRF 81) (BRASIL, 2011). Além disso, a estirpe *Mp195* apresentou eficiência com base no N total da parte aérea semelhante a da estirpe SEMIA 4080 e superior a da SEMIA 4088 (Cardoso et al., 2012). A confirmação desses resultados na espécie hospedeira (mucuna-preta) e em condições de campo poderia contribuir na obtenção de estirpes mais eficientes para a espécie de adubo verde.

2.7 O milho e a adubação verde

O milho (*Zea mays*) é uma espécie pertencente à família *Poaceae* que possivelmente se originou no Continente Americano, onde se encontram seus parentes mais próximos: teosinte e *Tripsacum*. Acredita-se que sua domesticação data de mais de 10000 anos, tendo sido cultivado pelas importantes civilizações: astecas, incas e maias (MÔRO; NETO, 2015; PATERNIANI; CAMPOS, 2005). O milho apresentou ao longo do tempo uma ampla adaptabilidade ambiental, isso, aliado ao seu relativo baixo custo de produção, ao seu alto valor nutritivo e a sua versatilidade em termos de consumo, tornaram-no uma cultura de grande importância internacional, sendo um dos cereais mais cultivados no mundo (MÔRO; NETO, 2015).

O Brasil é considerado o terceiro maior produtor mundial de milho, e aqui, essa produção é distribuída em três safras de cultivo. O cereal é produzido em todas as regiões com destaque para o Centro-Oeste e Sul que possuem a maior área cultivada (68%), o maior volume de grãos produzidos (76%) e juntamente com o Sudeste, a maior produtividade da cultura no País (MÔRO; NETO, 2015). Na safra de 2018/2019 o Brasil produziu mais de 100 milhões de toneladas de milho em uma área de mais de 17 milhões de hectares, alcançando, portanto uma produtividade de 5.719 kg ha⁻¹ (CONAB, 2020).

Essa cultura possui uma grande importância na agricultura brasileira e seu cultivo sob plantio direto têm se tornado cada vez mais comum e vantajoso no nosso País. Diante disso, percebe-se a relevância da adubação verde para o manejo desse cultivo. A pesquisa têm demonstrado os benefícios

dos adubos verdes no cultivo do milho, inclusive em relação ao fornecimento de N para essa gramínea. A Tabela 1 relaciona diversos trabalhos desenvolvidos em condições de campo que demonstram os benefícios de espécies de adubos verdes inoculados ou não na produção do milho em diferentes regiões do Brasil.

Tabela 1 - Influência do uso de diferentes espécies de adubos verdes no cultivo do milho em diferentes regiões do Brasil. Ensaios realizados em condições de campo. (Continua)

Espécie de adubo verde	Inoculação	Resultados	Estado	Referências
<i>Mucuna aterrima</i>	<i>Bradyrhizobium</i> spp. (CM-1545)	O aproveitamento do N da ureia pelo milho foi maior que o da <i>Mucuna aterrima</i> , sendo os melhores efeitos proporcionados pela combinação das duas fontes	SP	SCIVITTARO et al., 2000
Ervilhaca comum, ervilha forrageira, chícharo, tremoço azul e aveia preta	Sim (SE)	Tremoço azul acumulou a maior quantidade de N na parte aérea (113,7 kg ha ⁻¹ de N). A equivalência em N mineral para ervilhaca, tremoço, chícharo e ervilha forrageira, em relação ao pousio invernal, foi de, respectivamente, 137, 122, 85 e 55 kg ha ⁻¹ de N. Na ausência de adubação nitrogenada, o rendimento de grãos de milho foi maior após as leguminosas do que após a aveia e o pousio invernal	RS	AITA et al., 2001
<i>Mucuna aterrima</i> , <i>Cajanus cajan</i> , <i>Crotalaria juncea</i> e <i>Pennisetum americanum</i>	Não	<i>C. juncea</i> cultivada na primavera proporciona maior produtividade do milho em sucessão comparada à área de pousio	MS	CARVALHO et al., 2004
Aveia preta, ervilhaca comum e nabo forrageiro	Não	Os consórcios de aveia preta com ervilhaca até 30% de sementes de aveia proporcionaram produtividade de milho equivalente a 70% daquela obtida com 180 kg ha ⁻¹ de ureia no pousio	RS	GIACOMINI et al., 2004
<i>Arachis hypogaea</i> e <i>Mucuna pruriens</i>	BR423, BR 2811	A seqüência amendoim-milho diminuiria, a longo prazo, a reserva de N do solo, enquanto a seqüência mucuna-milho ajudaria a aumentar a reserva de N do solo	RJ	OKITO et al., 2004
<i>Mucuna aterrima</i> , <i>Canavalia ensiformis</i> , <i>Crotalaria juncea</i> , <i>Dolichos lablab</i> , <i>Brachiaria Brizantha</i> e <i>Pennisetum americanum</i>	Não	A <i>C. juncea</i> e <i>C. ensiformis</i> apresentaram maiores conteúdos de N. O milho em sucessão à <i>C. juncea</i> apresentou maior produção de grãos	SP	BERTIN; ANDRIOLI; CENTURION, 2005

Azevém, ervilhaca, mucuna, aveia preta, caupi, guandu	Não	O uso de plantio direto com adubos verdes (mucuna e guandu) e o uso de consórcio (aveia-preta + ervilhaca/milho + caupi) promoveram aumento na qualidade do solo	RS	AMADO et al., 2007; CONCEIÇÃO et al., 2005
<i>Mucuna deeringiana</i> , <i>Cajanus cajan</i> , <i>Crotalaria spectabilis</i> e <i>Canavalia ensiformis</i>	Não	O <i>Canavalia ensiformis</i> apresentou maior produção de fitomassa e acúmulo de N, P, K, Ca, Mg, S e beneficiou a produção de milho no segundo ano de cultivo	SP	HEINRICHS et al., 2005
<i>Crotalaria juncea</i> e <i>Pennisetum glaucum</i>	Não	Aproveitamento pelo milho de 13% do N da <i>C. juncea</i> e de 8 % do N do <i>P. glaucum</i>	MS	SILVA et al., 2006b
<i>Crotalaria juncea</i> , <i>Brachiaria brizantha</i> , <i>Dolechus lablab</i> e <i>Pennisetum americanum</i>	Não	Doses de N de 60 e 120 kg ha ⁻¹ em cobertura e uso de plantas de cobertura do solo aumentam a produtividade de fitomassa seca e de grãos de milho. Para milho no plantio direto, a utilização de crotalária proporcionou maior produtividade em relação ao milheto e lablab, em pré-safra associada a adição de N mineral	SP	ANDRIOLI et al., 2008
<i>Vicia villosa</i>	Não	Aproveitamento de 12,3 % do N da <i>V. villosa</i> pelo milho. Produtividade de 8,2 t ha ⁻¹	RS	ACOSTA et al., 2011
<i>Crotalaria juncea</i> , <i>Canavalia ensiformes</i> , <i>Rafhanus sativus</i>	Não	O pré-cultivo dos abubos verdes e do seu coquetel permitem maiores ganhos em produtividade	MG	VALADARES et al., 2012
<i>Brachiaria brizantha</i> , <i>Pennisetum Americanum</i> , <i>Crotalaria juncea</i> e <i>Dolechus lablab</i>	Não	O cultivo em pré-safra com crotalária, braquiária e milheto foram semelhantes na melhoria da fertilidade do solo da camada de 0-0,05cm, em relação ao sistema convencional	SP	ANDRIOLI; PRADO, 2012
<i>Crotalaria spectabilis</i> , <i>Stizolobium aterrimum</i> e <i>Cajanus cajan</i>	Não	A produtividade proporcionada por <i>C. spectabilis</i> foi semelhante a do controle com 80 kg ha ⁻¹ de N mineral	AL	ALBUQUERQUE et al., 2013
<i>Crotalaria juncea</i> e <i>Lupinus albus</i>	Não	A adubação verde, quando associada a compostos com 3% de N, aumentou a produtividade comercial do milho-verde em 4,5%	ES	SOUZA; GUIMARÃES; FAVARATO, 2015

Conclusão				
<i>Pennisetum glaucum</i> , <i>Crotalaria juncea</i> e consórcio de ambos	Não	Em sucessão a <i>C. juncea</i> e na ausência da aplicação do adubo nitrogenado em cobertura, o milho obteve a maior lucratividade em relação aos demais tratamentos e em sucessão ao consórcio <i>P. glaucum</i> + <i>C. juncea</i> doses de N em cobertura entre 50 e 55 kg ha ⁻¹ proporcionam maior lucratividade ao cultivo do milho	MS	KAPPES et al., 2015
<i>Avena Strigosa</i> , <i>Lupinus albus</i> e o consórcio com ambas	Não	O uso de trevoço-branco solteiro ou em consórcio com aveia-preta apresentou-se como boa opção para a formação de palha no SPD orgânico, garantindo o crescimento e a produtividade satisfatória para a cultura do milho-verde	ES	FAVARATO et al., 2016
Consórcio com feijão-de-porco, <i>Crotalaria juncea</i> , mucuna-preta, guandu-anão ou feijão-caupi	Não	O consórcio do milho com <i>Crotalaria juncea</i> apresentou maior produtividade que o monocultivo do milho	MS	PAZ et al., 2017
Guandu anão, feijão Macassar e esterco bovino	Não	As atividades enzimáticas responderam às diferentes doses e leguminosas, com maiores resultados na dose de 60 t ha ⁻¹ com o macassar. O uso de leguminosas com esterco melhorou a produção de milho e a qualidade microbiológica e bioquímica dos solos	PE	SILVA, et al., 2018
<i>Crotalaria spectabilis</i>	Não	Alta produtividade e acúmulo de matéria seca	DF	NOGUEIRA et al., 2019

SE: sem especificações sobre os inoculantes.

Fonte: Da autora.

A avaliação da dinâmica do N proveniente da mucuna-preta inoculada e da ureia aplicados à cultura do milho através da técnica do ^{15}N mostrou que o milho aproveitou melhor o N mineral (43%) que o do adubo verde (12%) e que o N remanescente no solo após o cultivo do milho, proveniente da mucuna-preta (50%) foi superior ao da ureia (33%). Também mostrou que a recuperação média de N pela mucuna-preta foi de 61% e da ureia foi de 76%, concluindo, portanto, que a combinação com o adubo verde inoculado favorece a recuperação de N da ureia no sistema solo-planta, uma vez que, os melhores efeitos foram proporcionados pela combinação das duas fontes (SCIVITTARO et al., 2000a; SCIVITTARO et al., 2003).

No ano de 2014, foram realizados dois ensaios de campo (na safrinha e na safra) para estudar a seletividade dos herbicidas bentazon e nicosulfuron para *Crotalaria spectabilis* o controle de plantas espontâneas e o desenvolvimento do milho no sistema de consórcio, uma vez que informações desse tipo eram escassas. Tanto na safrinha como na safra, o consórcio promoveu bons resultados de produtividade do milho e de acúmulo de massa pela leguminosa, sem a necessidade de aplicação de herbicidas (NOGUEIRA et al., 2019).

Com o objetivo de avaliar a influência da adubação-verde com *Crotalaria spectabilis*, *Stizolobium aterrimum* e *Cajanus cajan* sobre os componentes morfológicos e de produção do milho sob sistema de plantio direto, foi desenvolvido um trabalho nos tabuleiros costeiros do estado do Alagoas. *C. spectabilis* foi o adubo verde que mais favoreceu os resultados dos componentes de produção e da produtividade do milho (4.051 kg ha^{-1}), não diferindo estatisticamente do tratamento de 80 kg ha^{-1} de N mineral (4.861 kg ha^{-1}). Além disso, constatou-se efeito da interação entre adubação verde e adubação nitrogenada resultando em maior produtividade de grãos para a cultura do milho (ALBUQUERQUE et al., 2013).

O balanço do N no sistema solo planta fornecido pelos adubos verdes crotalária-juncea e mucuna-preta, marcados com ^{15}N foi estudado em casa de vegetação. Na ocasião, os adubos verdes foram incorporadas em dois diferentes tipos de solo (Latosolo Vermelho eutroférico e Argissolo Vermelho-Amarelo) cultivados com milho. A mucuna-preta promoveu a maior absorção e acúmulo de N na parte aérea pelo milho, em ambos os solos. Os autores atribuíram esses resultados à maior capacidade de fixar o N biologicamente da mucuna-preta quando comparada a crotalária-juncea nas condições do experimento (AMBROSANO et al., 2009).

Um estudo realizado no Mato Grosso do Sul teve como objetivo avaliar o desempenho e a produtividade do milho em consórcio com feijão-de-porco, crotalária-júncea, mucuna-preta, guandu-anão e feijão caupi, em sistema orgânico. O milho consorciado com *Crotalaria juncea* alcançou

maior produtividade em relação ao monocultivo da gramínea, e os demais consórcios apresentaram médias numericamente superiores as do milho solteiro. Demonstrou-se dessa forma, que os adubos verdes utilizados contribuíram nutricionalmente, sobretudo com N, na produtividade do milho (PAZ et al., 2017).

Na África do Sul, de 2005 a 2007, foi realizado um estudo com o objetivo de selecionar algumas espécies leguminosas de adubos verdes que se adequem melhor à região, como também de estudar o efeito delas na produção de milho. As espécies mais promissoras foram *Mucuna pruriens*, *Crotalaria juncea* e *Lablab purpureus*, pois quando utilizadas, com ou sem os fertilizantes nitrogenados, produziram entre 19 a 58% grãos a mais que o controle (-N). Os autores concluíram, portanto, que os adubos verdes selecionados têm potencial para aumentar a produção de milho na região estudada (ODHIAMBO, 2011).

2.8 Milho silagem

Uma das estratégias mais importantes utilizada por muitos pecuaristas para enfrentar o período da seca é a produção de silagem de milho. O principal indicador do mercado de milho silagem no Brasil é a produção leiteira que se concentra nas regiões Sul e Sudeste do País (CONAB, 2020), as maiores áreas produtoras de milho silagem. Sendo assim, estima-se que no Brasil exista 2,25 milhões de hectares destinados ao cultivo de milho silagem, ou seja, 15% da área total cultivada com a espécie (GOMES et al., 2010). O estado de Minas Gerais garante 40% da produção do País (MORAIS; GRANATO; NETO, 2015).

Para a produção da silagem o milho ainda verde é picado e armazenado em silos onde é compactado para a remoção do ar. Essa condição de anaerobiose conserva sem prejuízos à qualidade da silagem. O material vegetal fermenta produzindo ácido lático e outros ácidos orgânicos que reduzem seu pH (abaixo de 4,2) A silagem é um alimento volumoso muito utilizado na suplementação de pastagens nos períodos de estiagem, quando é baixa a disponibilidade de forragem (JUNIOR et al., 2017). Além disso, é também bastante utilizada nos sistemas intensivos de produção de confinamento total, nesse caso, ela é usada durante o ano todo como principal volumoso.

O milho é uma ótima opção para a ensilagem devido ao seu alto valor nutritivo e a sua elevada produtividade resultante da existência de híbridos mais produtivos e adaptados às mais diversas condições edafoclimáticas, assim como, ao seu alto potencial de produção de massa vegetal (PAZIANI et al., 2009). A silagem de milho é bastante utilizada na exploração da bovinocultura de

carne e leite, e sua qualidade está diretamente relacionada à produtividade do rebanho. Vale ressaltar que em sistemas intensivos de criação de gado é comum a utilização de animais melhorados e para que expressem todo seu potencial genético é imprescindível que a silagem de milho seja de alta qualidade (MELLO et al., 2005; MORAIS; GRANATO; NETO, 2015).

Ainda sobre as vantagens do uso do milho para a produção de silagem está sua composição bromatológica: teor de matéria seca (MS) entre 30 e 35%; mínimo de 3% de carboidratos solúveis na matéria original; baixo poder tampão e boa fermentação microbiana (DEMINICIS et al., 2009; MORAIS; GRANATO; NETO, 2015). Entretanto, para a obtenção de uma silagem de qualidade e em quantidades suficientes é essencial um planejamento de produção que se atente à escolha de cultivares, ao manejo do solo, à estação de plantio, à adubação, ao controle de pragas e de doenças, à colheita do milho e ao preparo da silagem (MORAIS; GRANATO; NETO, 2015).

O cultivo de adubos verdes previamente ao milho pode incrementar a produtividade de sua silagem, além de proporcionar amplos benefícios ao sistema solo-planta (AITA et al., 2001; AITA; GIACOMINI, 2003; CALEGARI et al., 1993; FINHOLDT et al., 2009; MERCANTE et al., 2014; MOREIRA, 2006; LIMA FILHO et al., 2014a, 2014b). Uma maneira de enriquecer em N a fitomassa desses adubos e potencializar o aporte desse nutriente para o milho é a inoculação com estirpes de BFNNL eficientes, sobretudo por ser uma prática agrícola eficiente e que apresenta inúmeras vantagens ecológicas e econômicas (AITA et al., 2001; OKITO et al., 2004; SCIVITTARO et al., 2000). Todavia, essa prática ainda é pouco comum e carece de maior difusão.

Resultados de pesquisas têm indicado potencial de FBN de estirpes de BFNNL para importantes espécies de adubos verdes, como *Cajanus cajan*, *Crotalaria spectabilis*, *Macroptilium atropurpureum*, *Phaseolus lunatus*, *Stizolobium aterrimum* e *Vigna unguiculata* (COSTA, 2016; COSTA et al., 2017; FLORENTINO et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2012, 2015; RANGEL et al., 2017; RUFINI et al., 2014, 2016). Entretanto, a maioria desses trabalhos limitou-se a condições axênicas e/ou em vasos com solo, sendo necessário, portanto, a validação desses bons resultados em condições de campo objetivando a recomendação de novos e mais eficientes inoculantes para a adubação verde.

REFERÊNCIAS

- ABREU, S. L.; REICHERT, J. M.; REINERT, D. J. Escarificação mecânica e biológica para a redução da compactação em Argissolo franco-arenoso sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, n. 3, p. 519-531, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-06832004000300013>>. Acesso em: julho 2020.
- ABUD, H. F.; REIS, R. D. G. E.; TEÓFILO, E. M. Caracterização morfológica de frutos, sementes, plântulas e germinação de *Mucuna aterrima* Piper & Tracy. **Revista Ciência Agronômica**, Pici, v. 40, n. 4, p. 563-569, 2009.
- ACOSTA, J. A. A. et al. Effect of ¹⁵N-labeled hairy vetch and nitrogen fertilization on maize nutrition and yield under no-tillage¹. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1337-1345, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832011000400028>. Acesso em: julho 2020.
- AITA, C. et al. Plantas de cobertura de solo como fonte de nitrogênio ao milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 1, 2001, p. 157-165, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-06832001000100017>>. Acesso em: julho 2020.
- AITA, C.; GIACOMINI, S. J. Crop residue decomposition and nitrogen release in single and mixed cover crops. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n. 4, p. 601-612, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832003000400004>>. Acesso em: julho 2020.
- ALBUQUERQUE, A. W. D. et al. Plantas de cobertura e adubação nitrogenada na produção de milho em sistema de plantio direto. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 7, p. 721-726, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-43662013000700005>>. Acesso em: julho 2020.
- ALCÂNTARA, F. A. et al. Adubação verde na recuperação da fertilidade de um Latossolo Vermelho-Escuro degradado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 2, p. 277-288, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2000000200006>>. Acesso em: julho 2020.
- ALVARENGA, R. C. et al. Características de alguns adubos verdes de interesse para a conservação e recuperação de solos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 175-185, 1995.
- AMADO, T. J. C. et al. Qualidade do solo avaliada pelo "Soil Quality Kit Test" em dois experimentos de longa duração no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, n. 1, p. 109-121. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-06832007000100012>>. Acesso em: julho 2020.
- AMADO, T. J. C. et al. Adubação verde na produção de grãos e no sistema de plantio direto. In: FILHO, O. F. L.; AMBROSANO, E. J.; ROSSI, F.; CARLOS, J. A. D. (Eds.). **Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil - Fundamentos e Prática** vol. 2. 1. ed. Brasília: Ed. Embrapa, 2014. cap.16 p. 81-125.

AMBROSANO, E. J. et al. Acúmulo de massa e nutrientes por adubos verdes e produtividade da cana-planta cultivada em sucessão, em duas localidades de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Dois Vizinhos, v. 8, n. 1, p. 199-209, 2013.

AMBROSANO, E. J. et al. Produtividade da cana-de-açúcar após o cultivo de leguminosas. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 4, p. 810-818, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0006-87052011000400012>>. Acesso em: julho 2020.

AMBROSANO, E. J. et al. Nitrogen supply to corn from sunn hemp and velvet bean green manures. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 3, p. 386-394, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-90162009000300014>>. Acesso em: julho 2020.

ANDRADE NETO, R. C. et al. Crescimento e produtividade do sorgo forrageiro BR 601 sob adubação verde. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 2, p. 124-130, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1415-43662010000200002>>. Acesso em: julho 2020.

ANDRIOLI, I. et al. Produção de milho em plantio direto com adubação nitrogenada e cobertura do solo na pré-safra. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 1691-1698, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-06832008000400034>>. Acesso em: julho 2020.

ANDRIOLI, I.; PRADO, R. M. Cover plants in pre-harvest and nitrogen in soil fertility in different layers with corn in no tillage and conventional system. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 963-978, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n3p963>>. Acesso em: julho 2020.

BERTIN, E. G.; ANDRIOLI, I.; CENTURION, J. F. Plantas de cobertura em pré-safra ao milho em plantio direto. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 3, p. 379-386, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.4025/actasciagron.v27i3.1393>>. Acesso em: julho 2020.

BOMFETI, C. A. et al. Exopolysaccharides produced by the symbiotic nitrogenfixing bacteria of leguminosae. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 3, p. 657-671, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-06832011000300001>>. Acesso em: julho 2020.

BONINI, S. B.; ALVES, M. C. Recovery of soil physical properties by green manure, liming, gypsum and pasture and spontaneous native species¹. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1397-1406. 2011. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832011000400019>>. Acesso em: julho 2020.

BORKERT, C. M. et al. Nutrientes minerais na biomassa da parte aérea em culturas de cobertura de solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 1, p. 143-153, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003000100019>>. Acesso em: julho 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 13, 11 de 24 de março de 2011. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: julho 2020.

BRAZ, G. B. P. et al. Plantas daninhas como hospedeiras alternativas para *Pratylenchus brachyurus*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, n.3, p. 233-238, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0100-5405/2129>>. Acesso em: julho 2020.

BREMER, E.; VAN KESSEL, Chris. Plant-available nitrogen from lentil and wheat residues during a subsequent growing season. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, n. 4, p. 1155-1160, 1992. Disponível em: <<https://doi.org/10.2136/sssaj1992.03615995005600040025x>>. Acesso em: julho 2020.

CALEGARI, A.; A. MONDARDO, E. A. BULISANI, L. P. WILDNER, M. B. B. COSTA, P. B. ALCANTARA, S. MIYASAKA, AND T. J. C. AMADO. 1993. Adubação verde no sul do Brasil. Rio de Janeiro: Editora AS-PTA. 364 p.

CALEGARI, A.; CARLOS, J. A. D. Recomendações de plantio e informações gerais sobre o uso de espécies para adubação verde no Brasil. In: FILHO, O. F. L.; AMBROSANO, E. J.; ROSSI, F.; CARLOS, J. A. D. (Eds.). **Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil - Fundamentos e Prática** vol. 2. 1. ed. Brasília: Ed. Embrapa, 2014. cap. 27 p. 451-478.

CALEGARI, A. Leguminosas para adubação verde de verão no Paraná. Londrina: Ed. IAPAR, 1995.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.; ALVAREZ, V.; DE BARROS, M. F.; FONTES, R.; CANTARUTTI, R.; NEVES, J. (Eds.). Fertilidade do solo. Viçosa: Ed. UFV, 2007. p. 375-470.

CARDOSO, J. D.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S. Polyphasic approach for the characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 93, n. 5, p. 2035-2049, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3708-2>>. Acesso em: julho 2020.

CARLESI, S. et al. Green manure and phosphorus fertilization affect weed community composition and crop/weed competition in organic maize. **Renewable Agriculture and Food Systems**, Cambridge, p. 1-10, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S1742170519000115>>. Acesso em: julho 2020.

CARVALHO, A. M. et al. Cover plants with potential use for crop-livestock integrated systems in the Cerrado region. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 10, p. 1200-1205, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011001000012>>. Acesso em: julho 2020.

CARVALHO, M. A. C. et al. Produtividade do milho em sucessão a adubos verdes no sistema de plantio direto e convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 47-53, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2004000100007>>. Acesso em: julho 2020.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Boletim da Safra de Grãos-Junho 2020. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/graos>>. Acesso em: junho 2020.

CONCEIÇÃO, P. C. et al. Qualidade do solo em sistemas de manejo avaliada pela dinâmica da matéria orgânica e atributos relacionados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29,

n.5, p. 777-788, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-06832005000500013>>. Acesso em: julho 2020.

CORREIA, M. E. F.; ANDRADE, A. G. Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. (Eds.). Formação de serrapilheira e ciclagem de nutrientes. Porto Alegre: Ed. Gênese, 1999. p. 197-226.

COSTA, E. M. et al. Lima bean nodulates efficiently with *Bradyrhizobium* strains isolated from diverse legume species. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 73, n. 2, p. 125-133, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13199-017-0473-8>>. Acesso em: julho 2020.

COSTA, Elaine Martins. New *Bradyrhizobium* species from soils of different Brazilian regions: taxonomy and symbiotic efficiency. 2016. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

DEBERDT, P. et al. *Crotalaria spectabilis* and *Raphanus sativus* as previous crops show promise for the control of bacterial wilt of tomato without reducing bacterial populations. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 163, n. 5, p. 377-385, 2015. <https://doi.org/10.1111/jph.12333>

DEMINICIS, B. B. et al. Silagem de milho- Características agronômicas e considerações (Silage corn- Agronomic characteristics and considerations). **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**, Málaga, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2009.

DE OLIVEIRA-LONGATTI, S. M. et al. *Burkholderia fungorum* promotes common bean growth in a dystrophic oxisol. **Annals of microbiology**, Milão, v. 65, n. 4, p. 1825-1832, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13213-014-1020-y>>. Acesso em: julho 2020.

DE SOUZA, L. A. et al. 2011, Tolerance and phytoremediation potential of *Stizolobium aterrimum* associated to the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus etunicatum* in lead-contaminated soil.

Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v. 35, p. 1441–1451, 2011. doi:10.1590/S0100-06832011000400038

DIEKMANN, K. H.; DE DATTA, S. K.; OTTOW, J. C. G. Nitrogen uptake and recovery from urea and green manure in lowland rice measured by ¹⁵N and non-isotope techniques. **Plant and Soil**, The Hague, v. 148, n. 1, p. 91-99, 1993. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF02185388>>. Acesso em: julho 2020.

DUTRA, G. R. D. Adubos verdes: sua produção e modo de emprego. Campinas, Ed. IAC, 1919. (Relatório do Instituto Agrônomo de Campinas).

FAO. Food and agriculture organization of the united nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/CA2947EN/ca2947en.pdf/>>. Acesso em: maio 2020.

FAVARATO, L. F. et al. Crescimento e produtividade do milho-verde sobre diferentes coberturas de solo no sistema plantio direto orgânico. **Bragantia**, Campinas, v. 75, n. 4, p. 497-506, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.549>>. Acesso em: julho 2020.

FARIAS, T. P. et al. Rhizobia inoculation and liming increase cowpea productivity in Maranhão State. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá v. 38, n. 3, p. 387-395, 2016.

FERRAZ, L. et al. Host status of green manures for two isolates of *Pratylenchus brachyurus* in Brazil. **Nematology**, Leiden v. 9, n. 6, p. 799-805, 2007. doi:10.1163/156854107782331153

FINHOLDT, R. S. et al. Avaliação da biomassa e cobertura do solo de adubos verdes. **FAZU em Revista**, Uberaba, n.6, p.11-14, 2009.

FLORENTINO, L. A. et al. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 5, p. 667-676, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-90162009000500012>>. Acesso em: julho 2020.

FLORENTINO, L. A. et al. Diversity and potential use of rhizobia from nodules of *Gliricidia sepium*. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 37, n. 3, p. 320-338, 2014.

GIACOMINI, S. J. et al. Consorciação de plantas de cobertura antecedendo o milho em plantio direto: II - Nitrogênio acumulado pelo milho e produtividade de grãos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, n. 4, p. 751-762, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-06832004000400015>>. Acesso em: julho 2020.

GIACOMINI, S. J. et al. Liberação de fósforo e potássio durante a decomposição de resíduos culturais em plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1097-1104, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003000900011>>. Acesso em: julho 2020.

GOMES, M. D. S. et al. Alternativas para seleção de híbridos de milho envolvendo vários caracteres visando à produção de silagem. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 5, n. 3, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v5n03p%25p>>. Acesso em: julho 2020.

GROVER, J. K.; YADAV, S.; VATS, V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 81, n. 1, p. 81-100, 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00059-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00059-4)>. Acesso em: julho 2020.

GUIMARÃES, A. A. et al. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the Western Amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 78, n. 18, p. 6726-6733, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/AEM.01303-12>>. Acesso em: julho 2020.

GUIMARÃES, A. A. et al. High diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from several legume species and land uses in Brazilian tropical ecosystems. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 38, n. 6, p. 433-441, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.06.006>>. Acesso em: julho 2020.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, n. 2, p. 343-357, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0044-59672004000300002>>. Acesso em: julho 2020.

HARRIS, G. H.; HESTER, O. B. Quantifying the nitrogen contribution from alfalfa to soil and two succeeding crops using nitrogen-15. **Agronomy Journal**, Madison, v. 82, n. 1, p. 129-134, 1990. Disponível em: <<https://doi.org/10.2134/agronj1990.00021962008200010028x>>. Acesso em: julho 2020.

HAVLIN, J. L. et al. Soil fertility and fertilizers. India: Ed. Pearson Education, 2016.
HEINRICH, R. et al. Características químicas de solo e rendimento de fitomassa de adubos verdes e de grãos de milho, decorrente do cultivo consorciado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, n. 1, p. 71-79, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832005000100008>>. Acesso em: julho 2020.

HERNANI, L. C.; PADOVAN, M. P. Adubação verde na recuperação de solos degradados. In: FILHO, O. F. L.; AMBROSANO, E. J.; ROSSI, F.; CARLOS, J. A. D. (Eds.). **Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil - Fundamentos e Prática** vol. 1. 1. ed. Brasília: Ed. Embrapa, 2014. cap. 10 p. 371-398

HOEFSLOOT, G. et al. Biological nitrogen fixation is not a major contributor to the nitrogen demand of a commercially grown south african sugarcane cultivar. **Plant and Soil**, The Hague, v. 277, n. 1-2, p. 85-96, 2005.

JUNIOR, M. C. et al. Nutritional additives in high moisture corn silage. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.12, n.1, p.105-111, 2017. <https://doi.org/10.5039/agraria.v12i1a5413>

KAPPES, C. et al. Economic evaluation of maize in succession to different green manure, soil management and nitrogen doses. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 31, n. 1, p. 55-64, 2015.

KATZENSCHLAGER, R. et al. *Mucuna pruriens* in Parkinson's disease: a double blind clinical and pharmacological study. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, London, v. 75, n. 12, p. 1672-1677, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/jnnp.2003.028761>>. Acesso em: julho 2020.

LACERDA, A. M. et al. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 51, n. 293, p. 67-82, 2004.

LIMA FILHO, O. F. et al. Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil - fundamentos e prática vol. 1. 1. ed. Brasília: Ed. Embrapa, 2014a.

LIMA FILHO, O. F. et al. Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil - fundamentos e prática vol. 2. 1. ed. Brasília: Ed. Embrapa, 2014b.

LOPES, G. et al. Beneficial use of industrial by-products for phytoremediation of an arsenic-rich soil from a gold mining area. **International Journal of Phytoremediation**, Philadelphia v. 18, n. 8, p. 777-784, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1131240>>. Acesso em: julho 2020.

MAESTRE, F. T. et al. Watering, Fertilization, and slurry inoculation promote recovery of biological crust function in degraded soils. **Microbial Ecology**, New York, v. 52, n. 3, p. 365-377, 2006. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9017-0>>. Acesso em: julho 2020.

MARSCHNER, H. Marschner's mineral nutrition of higher plants. 3. ed. Oxford, UK: Ed. Academic press, 2011.

MARRA, L. M. et al. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 68, n. 5, p. 603-609, 2011. Disponível em: < <https://doi.org/10.1590/S0103-90162011000500015>>. Acesso em: julho 2020.

MATHEUS, R.; KANTUR, D.; BORA, N. Innovation of the fallow system with the legume cover crop a season for improved physical properties of soil degraded on dryland farming. **International Journal of Scientific and Technology Research**, Raipur, v. 7, n. 7, p. 107-111, 2018.

MATOS, E. S. et al. Decomposition and nutrient release of leguminous plants in coffee agroforestry systems. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 1, p. 141-149, 2011. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832011000100013>

MEDEIROS, E. V. et al. The combination of *Arachis pintoii* green manure and natural phosphate improves maize growth, soil microbial community structure and enzymatic activities. **Plant and soil**, The Hague, v. 435, n. 1-2, p. 175-185, 2019. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3887-z>>. Acesso em: julho 2020.

MELLO, R. et al. Características produtivas e qualitativas de híbridos de milho para produção de silagem. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 4, n. 1, p. 79-94, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v4n01p%25p>>. Acesso em: julho 2020.

MENDONÇA, E. S. et al. Biological Nitrogen Fixation by Legumes and N Uptake by Coffee Plants. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 41, 2017. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/18069657rbcs20160178>>. Acesso em: julho 2020.

MERCANTE, F. M. et al. Fixação biológica de nitrogênio em adubos verdes. In: FILHO, O. F. L.; AMBROSANO, E. J.; ROSSI, F.; CARLOS, J. A. D. (Eds.). **Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil - Fundamentos e Prática** vol. 1. 1ed. Brasília: Ed. Embrapa, 2014, cap. 8, p. 307-334.

MORAIS P. P. P.; GRANATO, I. S. C.; NETO, R. F. (2015). Milho silagem. In: GALVÃO, J. C. C.; BORÉM, A.; PIMENTEL, M. A. (Eds.) **Milho do plantio a colheita**. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2015. p. 224-241.

MOREIRA, F. M. S. Fixação biológica de nitrogênio em espécies arbóreas. In: ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Microrganismo de importância agrícola**. Brasília: Ed. EMBRAPA, 1994. p. 121-150.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Ed. UFLA, 2006.

MOREIRA, F. M. S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. (Eds.). **Manual de biologia dos solos tropicais: Amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: Ed. UFLA, 2010. p. 279-312.

MOREIRA, F. M. S. Nitrogen-fixing Leguminosae-nodulating bacteria. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Eds.). **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford: Ed. CAB International Publishing, 2006. p. 237-270.

MÔRO, G. V.; NETO, R. F. Importância e usos do milho no Brasil. In: BORÉM, A.; GALVÃO, J. C. C.; PIMENTEL, M. A. (Eds.). **Milho do plantio a colheita**. 1. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2015. p. 9-25.

NASCIMENTO, A. F.; MATTOS, J. L. S.; MENDONÇA, E. Decomposição da biomassa de adubos verdes no sudoeste de Mato Grosso e sua estimativa pelo modelo NDICEA. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Dois Vizinhos v.11, n. 4, p. 319-327, 2016.

NOGUEIRA, C. H. P. et al. Selectivity of bentazon and nicosulfuron in *Crotalaria spectabilis* intercropped with maize culture. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 32, n. 2, p. 381-389. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1983-21252019v32n211rc>>. Acesso em: julho 2020.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Viçosa: Ed. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Solos, 1999.

ODHIAMBO, J. J. Potential use of green manure legume cover crops in smallholder maize production systems in Limpopo province, South Africa. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 1, p. 107-112, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5897/AJAR10.599>>. Acesso em: julho 2020.

OKITO, A. et al. Nitrogen fixation by groundnut and velvet bean and residual benefit to a subsequent maize crop. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 12, p. 1183-1190, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2004001200004>>. Acesso em: julho 2020.

OLIVEIRA, D. P. et al. Acid tolerant *Rhizobium* strains contribute to increasing the yield and profitability of common bean in tropical soils. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 922-933, 2017. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162017000400007>>. Acesso em: julho 2020.

OLIVEIRA, D. P. et al. Liquid inoculation with rhizobia in the planting furrow of common bean under no-till is feasible under different soil and climatic conditions. **Crop Science**, Madison, v. 59, n. 5, p. 2178-2184, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.2135/cropsci2018.08.0522>>. Acesso em: julho 2020.

OUTLOOK GLOBALFERT - 1º Reporte Anual do Mercado de Fertilizantes, 2020. Disponível em: <<https://www.globalfert.com.br/outlook-globalfert/>>. Acesso em: julho 2020.

PATERTIANI, E. E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2005. p.491-552.

PAULINO, V. T. et al. Adubos verdes na alimentação de bovinos e na reforma das pastagens. In: FILHO, O. F. L.; AMBROSANO, E. J.; ROSSI, F.; CARLOS, J. A. D. (Eds.). **Adubação verde e**

plantas de cobertura no Brasil - Fundamentos e Prática vol. 2. 1. ed. Brasília: Ed. Embrapa, 2014. cap. 26 p.417-450.

PAZ, L. B. et al. Desempenho e produtividade do milho safrinha em consórcio com leguminosas em sistema orgânico. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 40, n. 4, p. 100-109, 2017. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.19084/RCA16240>>. Acesso em: julho 2020.

PAZIANI, S. F. et al. Características agronômicas e bromatológicas de híbridos de milho para produção de silagem¹. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 3, p. 411-417, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-35982009000300002>>. Acesso em: julho 2020.

PEREIRA COSTA, B. G. et al. Boron phytoremediation: *Stizolobium aterrimum* is tolerant and can be used for phytomanagement of boron excess in soils. **International Journal of Environmental Studies**, London, v. 76, n. 2, p. 329-337, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00207233.2018.1497883>>. Acesso em: julho 2020.

QUEIROZ, L. R. et al. Supressão de plantas daninhas e produção de milho-verde orgânico em sistema de plantio direto. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. 2, p. 263-270, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-83582010000200005>>. Acesso em: julho 2020.

RANGEL, W. M. et al. Leguminosae native nodulating bacteria from a gold mine As-contaminated soil: Multi-resistance to trace elements, and possible role in plant growth and mineral nutrition. **International Journal of Phytoremediation**, Philadelphia, v. 19, n. 10, p. 925-936, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1303812>>. Acesso em: julho 2020.

RANGEL, W. M. Phytoprotective effect of arbuscular mycorrhizal fungi species against arsenic toxicity in tropical leguminous species. **International Journal of Phytoremediation**, Philadelphia, v. 16, n. 7-8, p. 840-858, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/15226514.2013.856852>>. Acesso em: julho 2020.

ROSSI, F.; CARLOS J. A. D. Histórico da adubação verde no Brasil. In: FILHO, O. F. L.; AMBROSANO, E. J.; ROSSI, F.; CARLOS, J. A. D. (Eds.). **Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil - Fundamentos e Prática** vol. 1. 1. ed. Brasília: Ed. Embrapa, 2014. cap. 2 p. 37-58.

RUFINI, M. et al. Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro-comum em diferentes valores de pH. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília v. 46, n.1, p. 81-88, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011000100011>>. Acesso em: julho 2020.

RUFINI, M. et al. Estirpes de *Bradyrhizobium* em simbiose com guandu-anão em casa de vegetação e no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 3, p. 197-206, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014000300006>>. Acesso em: julho 2020.

RUFINI, M. et al. *Bradyrhizobium* spp. strains in symbiosis with pigeon pea cv. Fava-Larga under greenhouse and field conditions. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 40, p. 1-14, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/18069657rbcS20160156>>. Acesso em: julho 2020.

- SANTOS, E. A. Atividade rizosférica de solo tratado com herbicida durante processo de remediação por *Stizolobium aterrimum*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 40, n. 1, p. 1-7, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5216/pat.v40i1.4670>>. Acesso em: julho 2020.
- SANTOS, Í. A. F. M. et al. New rhizobial strains for velvet bean (*Stizolobium aterrimum*) evaluated under greenhouse and field conditions. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 41, n. 4, p. 428-438, 2017. <https://doi.org/10.1590/1413-70542017414012917> Acesso em: julho 2020.
- SCIVITTARO, W. B. et al. Transformações do nitrogênio proveniente de mucuna-preta e uréia utilizados como adubo na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 12, p. 1427-1433, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003001200009>>. Acesso em: julho 2020.
- SCIVITTARO, W. B. et al. Utilização de nitrogênio de adubos verde e mineral pelo milho¹. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, n. 4, p. 917-926, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-06832000000400023>>. Acesso em: julho 2020.
- SILVA, C. D. F. et al. Soil microbiological activity and productivity of maize fodder with legumes and manure doses. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 31, n. 4, p. 882-890, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1983-21252018v31n410rc>>. Acesso em: julho 2020.
- SILVA, E. C. et al. Aproveitamento do nitrogênio (¹⁵N) da crotalária e do milho pelo milho sob plantio direto em Latossolo Vermelho de Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n.3, p. 739-746, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000300004>>. Acesso em: julho 2020.
- SILVA, M. L. N. et al. Estabilidade e resistência de agregados de Latossolo Vermelho-Escuro cultivado com sucessão milho-adubo verde. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 1, p. 97-103, 1998.
- SOARES, A. L. L. et al. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 795-802, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-06832006000500005>>. Acesso em: julho 2020.
- SOARES, B. L. et al. Agronomic and economic efficiency of common-bean inoculation with rhizobia and mineral nitrogen fertilization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 40, e0150235. Epub August 15, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/18069657rbcS20150235>>. Acesso em: julho 2020.
- SOUTO, K. M. et al. Biodegradation of the herbicides imazethapyr and imazapic in rhizosphere soil of six plant species. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1790-1796, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782013001000010>>. Acesso em: julho 2020.
- SOUZA, J. L.; GUIMARÃES, G. P.; FAVARATO, L. F. Desenvolvimento de hortaliças e atributos do solo com adubação verde e compostos orgânicos sob níveis de N. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 33, n. 1, p. 19-26, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-053620150000100004>>. Acesso em: julho 2020.

SOUZA, L. S.; SOUZA, L. D.; CARVALHO, J. E. B. Adubação verde na física do solo. In: FILHO, O. F. L.; AMBROSANO, E. J.; ROSSI, F.; CARLOS, J. A. D. (Eds.). Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil - Fundamentos e Prática vol. 1. 1. ed. Brasília: Ed. Embrapa, 2014. cap. 9 p. 335-370.

STEVENSON, F. J. Humus chemistry: genesis, composition, reactions. 2 ed. New York: Ed. John Wiley & Sons, 1994.

TABALDI, L. A. et al. Cover crops and their effects on the biomass yield of *Serjania marginata* plants. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 4, p. 614-620, 2012. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782012000400006>>. Acesso em: julho 2020.

TENELLI, S. et al. Legume nitrogen credits for sugarcane production: implications for soil N availability and ratoon yield. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 113, n. 3, p. 307-322, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10705-019-09979-y>>. Acesso em: julho 2020.

VALADARES, R.V. et al. Fertilidade do solo e produtividade de milho em sistemas de adubação verde no norte de Minas Gerais. **Planta daninha**, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 505-516, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582012000300006>>. Acesso em: julho 2020.

WUTKE, E. B. et al. Bancos Comunitários de sementes de adubos verdes: cartilha para agricultores. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007.

WUTKE, E. B.; CALEGARI A.; WILDNER L. P. Espécies de adubos verdes e plantas de cobertura e recomendações para seu uso. In: FILHO, O. F. L.; AMBROSANO, E. J.; ROSSI, F.; CARLOS, J. A. D. (Eds.). **Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil - Fundamentos e Prática** vol. 1. 1. ed. Brasília: Ed. Embrapa, 2014. cap. 3 p. 59-167.

ZACCHEO, P. V. C. et al. Green manure in fruticulture: Aspects on soil quality and use in agriculture. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 17, p. 1469-1474, 2016. <https://doi.org/10.5897/AJAR2015.10416>

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1**New strains of *Bradyrhizobium* enrich plant biomass N content in *Crotalaria spectabilis* for use as a green manure**

Artigo formatado nas normas da revista Journal Agroecology and Sustainable Food Systems

Jacqueline Savana da Silva^{1a}, Dâmiany Pádua Oliveira^{1b}, Márcia Rufini^{1c}, Celso Leandro da Silva Júnior^{1d}, Maria Vitória Batista Duque Gutierrez Baptista^{1e}, Lourdes Claudia da Silva^{1f}, Osnar Obede da Silva Aragão^{1g}, Thiago de Assis Pereira^{1h}, Fatima Maria de Souza Moreira^{1i*}

¹ Federal University of Lavras/UFLA, Soil Science Department, Cx. Postal 3037, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brazil

Orcid: ^a0000-0002-2854-251X, ^b0000-0002-1817-4020, ^c0000-0002-0127-5722, ^d0000-0002-0863-9197, ^e0000-0002-0212-5347, ^f0000-0003-2088-2840, ^g0000-0003-1459-7445, ^h0000-0003-2606-6094, ⁱ0000-0003-0159-5811.

*Author for correspondence. E-mail: fmoreira@ufla.br

ABSTRACT: In spite of the chemical, physical, and biological benefits that *Crotalaria spectabilis* can provide to the soil, it is little used as a green manure crop by farmers who have a short time between crop seasons. However, inoculation with strains of legume-nodulating nitrogen-fixing bacteria that are efficient and competitive may be a strategy to enhance accumulation of N in *C. spectabilis* and allow adoption of this green manure crop even in situations of early cutting. The aims of this study were *i)* to evaluate the efficiency of inoculation of three *Bradyrhizobium* strains on *C. spectabilis* grown in a Oxisol, with their performance compared to that of non-inoculated controls (without and with mineral N) and with the approved strain BR2811; and *ii)* to determine the contribution of these treatments to N accumulation in the plant biomass of *C. spectabilis* in four periods of cutting for use as green manure. Experiments were carried out in pots and field. Inoculation with strains UFLA05-03, UFLA05-09, and UFLA05-14 on *C. spectabilis* is effective since it increases the production of N-enriched plant biomass, allowing its use as soil cover during the fallow period and for incorporation of the plant matter to benefit the following crop species.

Keywords: *Crotalaria*, nodulating nitrogen-fixing bacteria, legume species inoculant, strain selection

INTRODUCTION

Green manure is able to increase the productive capacity of soils in a sustainable manner, since it improves the soil physical, chemical, and biological characteristics (Aita et al., 2001; Aita and Giacomini 2003; Moreira, 2006; Finholdt et al., 2009; Mercante et al., 2014). Among the plant species most used for this practice is *Crotalaria spectabilis*, a Fabaceae that arose in South and North America, whose excellent production of fresh matter (15 to 30 t ha⁻¹), dry matter (3 to 8 t ha⁻¹), and estimated N (100 to 160 kg ha⁻¹) lead to increases of up to 100% in the yield of successive crops (Souza et al., 2008; Albuquerque et al., 2013; Calegari and Carlos 2014; Wutke et al., 2014; Nogueira et al., 2019; Tenelli et al., 2019). The mean flowering period of this species is 120 days, which can be a limiting factor for its use as a green manure crop on the part of producers who do not have that much time between crop seasons.

Even so, the use of *C. spectabilis* should be encouraged since it not only has good characteristics as a green manure crop but can also contribute to control of plant diseases, such as nematodes and bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) (Ferraz et al., 2007; Wutke et al., 2014; Deberdt et al., 2015; Braz et al., 2016), act in phytoremediation of arsenic-contaminated soils (Lopes et al., 2016; Rangel et al., 2017), and provide benefits to the soil physical structure (Abreu et al.,

2004), as well as its use for soil cover (Amado et al., 2014; Tenelli et al., 2019) and in intercropping (Mendonça et al., 2017; Souza et al., 2019).

C. spectabilis is also able to take advantage of biological nitrogen fixation (BNF) when in symbiosis with legume-nodulating nitrogen-fixing bacteria (LNNFB), a process that provides numerous benefits to plant production (Moreira and Siqueira, 2006). Resende et al. (2003) showed that more than 80% of the N in *C. spectabilis* originates from BNF. Mendonça et al. (2017) evaluated N dynamics in intercropping between *C. spectabilis* and coffee and found that of the total of N accumulated (93.42 kg ha^{-1}) in the soil, 34.10 kg ha^{-1} was derived from BNF, and 48.8% of the N originating from BNF was transferred to the coffee plants.

Studies on selection of strains efficient in LNNFB for *C. spectabilis* are few and are limited to only axenic conditions (Florentino et al., 2014; Rangel et al., 2017). However, promising results in relation to the symbiotic efficiency of *Bradyrhizobium* strains with *C. spectabilis* under axenic conditions indicate that their biotechnological potential should be determined under field conditions (Rangel et al., 2017).

Currently, there are only two strains approved by the Brazilian Ministry of Agriculture (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA) as inoculants for *C. spectabilis*, both belonging to the genus *Bradyrhizobium*: BR 2003/SEMIA 6156 (*Bradyrhizobium japonicum*) and BR 2811/SEMIA 6158 (*B. elkanii*). However, the absence of publications that corroborate this recommendation generates questions regarding the criteria adopted in the recommendation process, which, according to MAPA, was restricted to tests in pots with soil (BRAZIL, 2011). In addition, diverse environmental factors and traits of the symbionts can affect success in symbiosis. Therefore, in selection studies, the LNNFB strains must be tested in regard to their efficiency in fixing N_2 and their competitiveness for infection sites against native microorganisms under edaphic and climatic conditions in the field, with the aim of obtaining suitable inoculants (Moreira and Siqueira, 2006).

Given the diverse advantages of the use of *C. spectabilis* as a green manure crop, the lack of articles published on its symbiosis with LNNFB, and lack of information on the best time for cutting and incorporation related to N accumulation in the plant biomass, the evaluation of inoculation of *C. spectabilis* with efficient strains of LNNFB is warranted as a strategy to enhance accumulation of N by the plant through BNF. The hypothesis is that this strategy will allow earlier cutting of *C. spectabilis*, which may contribute to its use by growers that have only a short time available for green manure crops between commercial crop seasons. Also, that the new strains tested present high symbiotic efficiency in pots and fields as they did under axenic conditions.

Thus, the aims of this study were *i*) to evaluate the symbiotic and agronomic efficiency of inoculation of three strains of *Bradyrhizobium* on *C. spectabilis* in pots and in the field in a oxisol (Latossolo) seeking to corroborate possible recommendation as inoculants for this species; and *ii*) to determine, the contribution of these treatments to N accumulation in the plant biomass of *C. spectabilis* in four periods of cutting for the purpose of determining possible and ideal periods for its incorporation in the soil.

2. MATERIALS AND METHODS

Three experiments with *Crotalaria spectabilis* for use as a green manure crop were performed from October 2017 to April 2018. The first experiment was conducted to estimate the density of the native populations of nodulating nitrogen-fixing bacteria of *C. spectabilis* in the soil of an experimental area of the Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil, from which the soil for the experiment in pots was taken and where the field experiment was conducted. The latter two experiments were conducted with the aim of evaluating the symbiotic and agronomic efficiency of the LNNFB previously selected as based on good results in axenic studies (Rangel et al., 2017).

The soil used was classified as a oxisol (Latossolo) of known fertility (Table 1) in an area with a history of growing grasses and non-inoculated common bean.

2.1 Most probable number of LNNFB in the soil of the experiment (MPN)

For estimation of the native populations of LNNFB present in the soil of the experiment, the most probable number (MPN) method was used. Before the field experiment was set up, soil samples were collected from five points of the experimental area in the 0-20 cm layer to compose a single sample that was used for serial dilutions in decimal form. The experiment was conducted in a greenhouse of the Department of Soil Science/UFLA in a completely randomized design, with three replications, using “long neck” dark bottles with 500 mL capacity containing sterilized Hoagland and Arnon (1950) nutrient solution. Before planting, the *C. spectabilis* seeds were scarified in 98% sulfuric acid for 5 minutes, washed successively in sterilized distilled water, and left to soak for 20 minutes. After that, they were pre-germinated in sterilized Petri dishes containing moistened cotton and incubated for two days at a temperature of 28°C. After planting, the pre-germinated seeds were inoculated with 1 mL of the soil suspensions from the serial dilutions from 10^{-1} to 10^{-6} . A positive control was included with the strain BR 2811 approved by MAPA for *C. spectabilis*, as well as two negative controls without inoculation (one with 5.25 g L⁻¹ and the other with 52.5 g L⁻¹ of mineral

N).

The experiment was conducted at a mean temperature of 23.6°C and 73% relative humidity. The plants were collected at 30 days after planting, at which time root nodulation was evaluated considering the presence or absence of nodules in each dilution.

2.2 Symbiotic efficiency of LNNFB

The experiments to evaluate the symbiotic efficiency of the LNNFB were conducted in pots with soil and in the field. In the two experiments, three strains of *Bradyrhizobium* (UFLA 05-03, UFLA 05-09, and UFLA 05-14) that proved to be efficient in previous studies (Rangel et al., 2017), and the strain *Bradyrhizobium* BR 2811 were tested, as well as two non-inoculated controls, without mineral N (WoN) and with mineral N (WN). Information on the strains used in these experiments is provided in Table 2.

The inoculants were prepared in liquid 79 medium (Fred and Waksman, 1928) at 28°C and constant shaking (110 rpm) for 96 hours (log phase of the bacterial growth). For field experiments, the inoculum was transferred to turf sterilized in an autoclave at the proportion of 3:2 (w:v) of turf and inoculum. The quality of the inoculants was monitored by counting the number of colony forming units (CFU), respecting the minimum legal number of 10^9 per mL of inoculant.

2.2.1 Experiment in pots with non-sterile soil

The experiment was conducted in a greenhouse in the period from October 2017 to March 2018. A randomized block experimental design was used with four replications for each one of the two periods of evaluation. The plants were grown in 3 dm³ pots [evaluated at 60 days after sowing (DAS)] and in 5 dm³ pots (evaluation at flowering at 140 DAS). The soil used for filling the pots was collected from the tillable layer (0-20 cm); clods were broken up, and the soil was homogenized and sieved through a 4 mm mesh size.

The fertilization adopted in the pots in all six treatments (element, quantity in mg dm⁻³: P, 300; K, 200; Ca, 200; Mg, 50; S, 50; B, 0.8; Cu, 1.5; Fe, 2; Mn, 3; Mo, 0.10; and Zn, 4) followed the recommendations of Malavolta et al. (1989). The soluble sources used were calcium phosphate monobasic (monohydrate) Ca(H₂PO₄)₂.H₂O; potassium chloride KCl; magnesium sulfate heptahydrate (MgSO₄).7H₂O; boric acid H₃BO₃; copper sulfate pentahydrate (CuSO₄).5H₂O; iron (III) chloride FeCl₃; manganese chloride tetrahydrate (MnCl₂).4H₂O; sodium molybdate dihydrate

(Na_2MoO_4). $2\text{H}_2\text{O}$; and zinc sulfate heptahydrate (ZnSO_4). $7\text{H}_2\text{O}$. The control treatment without inoculation and with mineral N received $300 \text{ mg NH}_4\text{NO}_3 \text{ dm}^{-3}$, divided into three applications.

Preparation of the seeds followed the same procedure adopted in 2.1 (MPN). Four seeds were sown per pot and, at five days after emergence (DAE), the plants were thinned, leaving two seedlings per pot. In the treatments with bacterial strains, each seed received 1 mL of inoculant. The pots were irrigated daily to maintain soil moisture near field capacity (60% of total pore volume). The mean values of minimum and maximum temperatures registered during the period of conducting the experiment were 19.4 and 31.5 °C, respectively.

Collections of the experiment in pots with soil occurred at 60 and 140 DAS. For each period of evaluation, all the plants from each plot (two plants per pot) were collected, considering the four replications of each treatment. The following determinations were made: number of nodules (NN), nodule dry matter (NDM), indirect chlorophyll measurement (ICM), plant height (PH), root dry matter (RDM), shoot dry matter (SDM), shoot N content (SNC) and shoot N accumulation (SNA). The ICM was obtained through readings made with the Minolta SPAD-502 on the last fully developed leaf of each plant (15 readings per plant). Plant height was measured with a measuring tape. To obtain the NDM, RDM, and SDM, the nodules, roots, and shoots were placed in a forced air circulation laboratory oven at 60°C until obtaining constant weight. The SNC was determined by the semi-micro Kjeldahl (total nitrogen) method, according to Sarruge and Haag (1979). The SNA was calculated by multiplying the SDM by the SNC and dividing by 100.

2.2.2 Field experiment

The field experiment was conducted in the rainy crop season (November 2017 to April 2018) so to evaluate growth parameters of *C. spectabilis* in different times. A split-plot in time arrangement was adopted, consisting of four collection times (60, 90, 120, and 150 DAS) in each one of the six treatments already described, with four replications for each split treatment.

Each experimental unit (10.8 m^2) was constituted by four 4.5-m rows, spaced at 0.6 m, and the center rows were used for data collection. Soil tillage consisted of plowing, disking, and furrowing for demarcation of the rows. None of the plots received base fertilization since this is not a common practice for green manure crops in the region. The mineral nitrogen control treatment (WN) received $70 \text{ kg N-urea ha}^{-1}$, applying half at sowing and the other half in side dressing at 20 DAE.

Seeds were sown manually immediately after seed inoculation, adopting the density of 35 seeds per linear meter (Filho et al., 2014). The mean rainfall and temperature during the growing

period are shown in Figure 1. Weeds were controlled by manually weeding and ants were controlled by ant bait whenever necessary. No other control of pests or diseases was necessary.

A five-plant sample (rows 2 and 3) per split-plot was removed at random in each collection period for determination of NN, NDM, SDM, SNC, and SNA. For determine the NN, the roots of the plants were collected with the aid of a shovel, respecting the volume of soil explored by the root system. The nodules were carefully detached from their roots, washed and dried in an oven with forced air circulation. The methods of these evaluations followed those described in the experiments in pots with soil.

2.3 Statistical analyses

Evaluation of population density of native LNNFB was interpreted according to the table of McCrady (Dobereiner et al., 1995). Analysis of variance was carried out on the data from the two efficiency experiments after the tests of normality (Shapiro-Wilks), homoscedasticity of variances (Breusch-Pagan), and independence (Dubin-Watson) had first been carried out on the data on the R software (R Development Core Team, 2019). To fulfill the presuppositions of analysis of variance, the data of all the variables were first transformed into $\log(y)$. When there was a significant effect by the F test [$p < 0.05$ or $p < 0.10$ (Brasil, 2011)], the mean values of the treatments (strains tested) were contrasted with those of the controls of each trial (WN, WoN and BR 2811) by Dunnett's test at the same level of significance. Controls were also evaluated between them. For evaluation over time, linear regression equations were fitted for the overall mean of NN and NDM (non-significant interaction between treatments and collection time) and exponential for SDM and SNA (significant interaction between treatments and collection time).

3. RESULTS

3.1 Evaluation of the density of native populations of LNNFB

The native community of LNNFB in the soil of the experiment (used in trials in pots with soil and in the field) able to nodulate *C. spectabilis* was 2.5×10^3 cells per gram of soil.

3.2 Evaluation of symbiotic efficiency in pots with non-sterile soil

There was a significant effect of the treatments. The mean values of NN, NDM, PH, ICM, RDM, SDM, and SNA of the two trails are shown in Tables 3 and 4. The variables NDM, RDM,

SDM, and SNA were affected by collection of the plants at 60 DAS (Table 3). For NDM, there was no difference between the mean values of WoN and of the other controls, and BR2811 exceeded the results of WN. The UFLA 05-03 strain exhibited mean NDM similar to that of BR2811 and superior to that of the WoN and WN controls. The mean of the UFLA 05-09 strain exceeded only the mean value of WN, and was similar to that of the other controls. The mean of the UFLA 05-14 strain did not differ from that of the WN or WoN controls, and also did not differ from that of the BR 2811 strain. For RDM, BR2811 and WN were similar to each other and were higher than the results of SN. For SDM, BR2811 did not differ from WoN and both were lower than WN. For SNA, BR2811 did not differ from WoN, and both were lower than WN. The UFLA 05-03 strain had a mean value higher than that of the WoN control and of the BR 2811 strain, with values statistically similar to that of the WN treatment. The mean values obtained by the UFLA 05-09 and UFLA 05-14 strains did not differ from those of the WN or WoN controls or of the BR 2811 strain.

In collection of plants at flowering (140 DAS), there was significant difference among the treatments only for the variables NN and NDM (Table 4). For NN, the results of BR2811 exceeded the results of WN, and the results of WoN did not differ from the other controls. The NN obtained from the UFLA 05-14 strain exceeded that from WN ($p < 0.05$) and did not differ statistically from that of the other controls. The NDM of this same strain (UFLA 05-14) exhibited a mean value superior to that of the native LNNFB (WoN) ($p < 0.05$) and did not differ from that of the other controls evaluated. The UFLA 05-03 strain had a lower mean value ($p < 0.10$) than that of the BR 2811 strain and did not differ from the mean values of the other controls. Furthermore for NDM, there was no significant difference between the WN and BR2811 controls, and both were higher than the results of WoN.

3.3 Evaluation of agronomic efficiency in the field

The NN and NDM variables were not affected by the treatments or by the interaction of the treatments with the plant collection times. However, they were affected by the collection times ($p < 0.05$), and to explain the response of the treatments over time, regression curves were fitted (Figure 2). For the NN variable, a first order linear model was used, indicating that this variable undergoes an increase over time. For NDM, a second order linear model best explained its response. The increase in NDM occurred up to 104 days, when it reached a weight of 154.56 g per plant, subsequently decreasing over time.

The effect of the treatments on SDM and SNA depended on the time of collection, with significant differences ($p < 0.10$) occurring in the collections carried out at 60 and 150 DAS (Table 5). At 60 DAS for SDM, WN was higher than the mean values of the other controls; BR2811 was similar to WoN. The UFLA 05-03 strain exceeded WoN and BR 2811, but not WN; the UFLA 05-09 strain had a mean value similar to those of the controls WoN and BR 2811, but was lower than that of the WN control; and the UFLA 05-14 strain had a mean value lower than those of all the controls evaluated. At 150 DAS (full flowering), BR2811 and WN did not differ from each other, both were higher than the mean values of WoN. The strains UFLA 05-03 and UFLA 05-14 had mean SDM values higher than those of the three controls; the UFLA 05-09 strain was higher than the WoN control, and was similar to the other controls.

In relation to the SNA variable, there was a significant difference ($p < 0.10$) among the treatments in the collections at 60, and 150 DAS (Table 6). In the first collection (60 DAS), WN was greater than the mean values of the other controls, and BR2811 was equal to the results of the WoN. The SNA provided by the strains UFLA 05-03 and UFLA 05-09 was similar to those of the controls WoN and BR 2811, but not exceeding that of WN. The SNA of the UFLA 05-14 strain was lower than that of all the controls.. In the last collection period, at 150 DAS (full flowering), BR2811 was equal to WN, and both were greater than the results of WoN. All the strains tested led to higher SNA than the WoN control; the UFLA 05-03 strain also outperformed the results of the controls the BR 2811 strain and of WN, whereas the UFLA 05-09 and UFLA 05-14 strains presented similar SNA averages of these two experimental controls.

Furthermore, in regard to SDM and SNA, there was significant difference ($p < 0.05$) of the time of collection within each treatment evaluated. Thus, regression curves were fitted to explain the response of each treatment over time. The exponential model best represents the response of the treatments on these variables since they exhibited an accentuated increase over the time of evaluation (Figures 3 and 4).

4. DISCUSSION

In the soil where the experiments were set up, native LNNFB were found capable of nodulating *Crotalaria spectabilis*. This may be related to the edaphic and climatic conditions that allowed them to establish themselves and survive. The mean density (2.5×10^3 cells per gram of soil) obtained in the current study is within the range found in other studies with promiscuous grain legumes (Soares et al., 2006 a,b; Oliveira et al., 2019) and with pigeon pea, a species also used as a

green manure crop (Rufini et al., 2016) in the same region as the experimental area. Based on the results of the WoN control in the symbiotic efficiency experiments, good performance of the native LNNFB on *C. spectabilis* was observed, at least in the initial periods of field evaluation.

As already explained, in greenhouse evaluations for the collection made at 60 DAS, there was a significant difference among the treatments for the NDM, RDM, SDM and SNA variables, which did not occur in the evaluations made at 140 DAS. The results of the last collection may have been affected by space limitations for the roots due to the dimensions of the pots. Although the plants were well developed, it was necessary to wait for them to reach the flowering stage to perform the evaluation. This was also noted in the results of the ICM, in which higher readings were observed at 60 DAS than at 140 DAS. If it were not for the limitation of space for plant development, good results would likely have been observed in the second collection since good performance of the strains was observed in the field in a similar period.

The strains UFLA 05-03, UFLA 05-09, and UFLA 05-14 provided high SDM and SNA production in the field, in the collection made at 150 DAS (flowering); their results were superior to those of the native LNNFB, and even superior or equal to those of the control with mineral N and of the reference strain BR 2811. These results indicate that these strains have high BNF efficiency when inoculated on *C. spectabilis*.

In the field, nodule production by *C. spectabilis* increased over time; however, the weight of 154.56 mg was the maximum increase (at 104 DAS), declining after that, just when there was a significant decrease in rainfall. This response may be related to senescence of the nodules over time, which leads to reduction in their density. However, it is important to emphasize that the remaining nodules were efficient in fixing atmospheric N, which was confirmed by the results of SDM and SNA.

When each treatment is evaluated separately, an increase is found in SDM and in SNA over time, i.e., the quantity of dry matter produced, as well as the N accumulated in this material, increases at each collection made. This response obeys an exponential model, and it is important to emphasize that within the time interval evaluated, this production reaches its high point at 150 DAS, coinciding with the flowering of *C. spectabilis*. There are advantages in growing this green manure crop for this period of time, which, although it is long, would avoid infestation of the area by *C. spectabilis* due to seed dispersal after fructification. In addition, in this period, the three strains tested showed efficiency in symbiosis with *C. spectabilis*.

The strains UFLA 05-03, UFLA 05-09, and UFLA 05-14 also showed high symbiotic efficiency with *C. spectabilis* in studies in pots with sterilized nutrient solution (Rangel et al., 2017). These strains, which were isolated from nodules of the plant species itself present in an area contaminated with arsenic (gold mining area), had dry matter weight and shoot N accumulation higher than or equal to that of the control with mineral N and the strain approved as an inoculant, BR 2811. The authors concluded that these strains had biotechnological potential and suggested confirmation of their efficiency under more complex growing conditions, such as those carried out in this study.

The contribution of the BNF promoted by *C. spectabilis* had also been shown by the ^{15}N technique. Mendonça et al. (2017) evaluated N levels in leaves of coffee intercropped with species of green manure crops. The results showed that the total N accumulation by *C. spectabilis* was 93.42 kg ha^{-1} , of which 34.1 kg ha^{-1} was derived from BNF, which, in turn, contributed approximately 50% of the N transferred to the coffee plant. Thus, the authors concluded that *C. spectabilis* is a leguminous crop with high potential for transferring N to the coffee plant and recommended its use in intercropping with coffee. Considering that the seeds of *C. spectabilis* were not inoculated and that fertilization through the soil likely inhibited the action of native LNNFB, there is reason to believe that even better results could have been obtained.

The results of SNA of the native LNNFB indicate that they were efficient in BNF up to the time of collection of 120 DAS. However, a LNNFB community efficient in BNF is not always the rule under the diverse edaphic and climatic conditions in Brazil. Resende et al. (2003) estimated that BNF contributed 16 kg ha^{-1} of N to the biomass of *C. spectabilis* grown for 71 days, but these plants had not been inoculated with LNNFB of proven efficiency. It can therefore be concluded that the BNF occurred through the native community present in the soil. This comparison shows the importance of ensuring the inoculation of the green manure crop with strains of proven efficiency, since an efficient native community cannot always be relied upon. In addition, the practicality and the low cost of inoculation should also be considered, since evaluation of the efficiency of the native LNNFB communities requires more complex experimental conditions at higher cost.

The results of the present study show that the strains tested (mainly UFLA 05-03) are efficient in BNF and promote the growth of *C. spectabilis*, and the practice of inoculating this species is recommended for enriching its shoots in N. The results also indicate that as long as the area has an efficient native LNNFB community, the cutting and incorporation of this green manure crop can be performed at 90 DAS, without the need for inoculation. However, as the grower does not evaluate the symbiotic efficiency of the native LNNFB populations, inoculation of the green manure crop with

the selected strain is recommended, above all because of the surprising gain in SDM and SNA after 120 DAS.

CONCLUSIONS

The density of the native rhizobia community of the *Latosolo Vermelho* (2.5×10^3 cells per gram of soil) effectively fixed nitrogen in symbiosis with *Crotalaria spectabilis* up to 120 days after sowing. In addition, it was similar to those that nodulate other promiscuous legumes found under the local edaphic and climatic conditions.

The UFLA 05-03 strain tested exhibited greater capacity in fixing N_2 than the BR2811 strain currently approved as an inoculant for *C. spectabilis*, as well as greater capacity than the native communities. The strains tested also accumulated more nitrogen than the control with mineral N fertilization.

Inoculation of *C. spectabilis* seeds with the UFLA 05-03, UFLA 05-09, and UFLA 05-14 strains is a real alternative for increasing production of biomass enriched with N to serve as a green manure crop.

The influence of the tested strains, mainly from UFLA 05-03, occurs in flowering.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (CAPES/PROEX AUXPE 593/2018), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Process: 304527/2016-5; Process: 431504/2016-4), and the Fundação de Amparo e Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig) (PACSS/PPGCS - 2009–2012) for financial support and for granting scholarships. This research is associated with the Brazilian National Institute of Science and Technology (Soil Biodiversity/INCT-CNPq).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

Abreu, S. L., J. M. Reichert, and D. J. Reinert. 2004. Mechanical and biological chiseling to reduce compaction of a sandy loam alfisol under no-tillage. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 28 (3):519-531. doi:10.1590/S0100-06832004000300013.

Aita, C., C. J. Basso, C. A. Ceretta, C. N. Gonçalves, and C. O. da Ros. 2001. Cover crops as a source of nitrogen to corn. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 25 (1):157-165. doi:10.1590/S0100-06832001000100017.

Aita, C., and S. J. Giacomini. 2003. Crop residue decomposition and nitrogen release in single and mixed cover crops. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 27 (4):601-612. doi:10.1590/S0100-06832003000400004.

Albuquerque, A.W. D., J. R. Santos, G. Moura Filho, and L. S. Reis. 2013. Cover crops and nitrogen fertilization in corn production under no-tillage system. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 17 (7):721-726. doi:10.1590/S1415-43662013000700005.

Alvarez, V. V. H., R. F. Novais, N. F. Barros, R. B. Cantarutti, and A. S. Lopes. 1999. Interpretação dos resultados das análises de solos. In *Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais - 5º Aproximação*, ed. A. C. Ribeiro, P. T. G. Guimarães, and V. H. Alvarez V, 25-32. Viçosa, MG: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais.

Amado, T. J. C., J. E. Fiorin, U. Arns, R. S. Nicoloso, and A. O. Ferreira. 2014. Adubação verde na produção de grãos e no sistema de plantio direto. In: *Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil - Fundamentos e Prática 2*, ed. O. F. L. Filho, E. J. Ambrosano, F. Rossi, and J. A. D. Carlos, 81-125. Brasília, DF: Embrapa.

Brazil. 2011. Instrução normativa nº 13 de 24 de março de 2011. Anexo protocolo oficial para avaliação da viabilidade e eficiência agrônômica de cepas, inoculantes e tecnologias relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio em leguminosas. *Diário Oficial União Repúb. Fed. Brasil*, nº 58 de 25 de março de 2011. Gov. Brazil. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf>

Braz, G. B. P., J. R. R. S. Oliveira, J. Constantin, R. T. Raimondi, L. M. Ribeiro, A. Gemelli, and H. K. Takano. 2016. Weeds as alternative hosts for *Pratylenchus brachyurus*. *Summa Phytopathologica* 42 (3):233-238. doi:10.1590/0100-5405/2129.

Calegari, A., and J. A. D. Carlos. 2014. Recomendações de plantio e informações gerais sobre o uso de espécies para adubação verde no Brasil. In: Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil - Fundamentos e Prática 2, ed. O. F. L. Filho, E. J. Ambrosano, F. Rossi, and J. A. D. Carlos, 451-478. Brasília, DF: Embrapa.

Deberdt, P., E. Gozê, R. Coranson-Beaudu, B. Perrin, P. Fernandes, P. Lucas, and A. Ratnadass. 2015. *Crotalaria spectabilis* and *Raphanus sativus* as previous crops show promise for the control of bacterial wilt of tomato without reducing bacterial populations. *Journal of Phytopathology* 163 (5):377-385. doi:10.1111/jph.12333.

Döbereiner, J., V. L. D. Baldani, and J. I. Baldani. 1995. Contagem de microorganismos diazotróficos. In: Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas, ed. J. Döbereiner, V. L. D. Baldani, and J. I. Baldani, 39-42. Brasília, DF: CNPAB-Embrapa.

Ferraz, L., L. Motta, M. Inomoto, K. Siqueira, and A. Machado. 2007. Host status of green manures for two isolates of *Pratylenchus brachyurus* in Brazil. *Nematology* 9 (6):799-805. doi:10.1163/156854107782331153.

Filho, A. P., E. J. Ambrosano, and P. H. C. Luz. 2014. Espécies de adubos verdes e plantas de cobertura e recomendações para seu uso. In: Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil - fundamentos e prática 1, ed. O. F. L. Filho, E. J. Ambrosano, F. Rossi, and J. A. D. Carlos, 61-167. Brasília, DF: Embrapa.

Finholdt, R. S., A. M. Assis, F. F. Bisinotto, V. M. Aquino Júnior, and L. O. Silva. 2009. Green fertilizers potential of production: biomass and soil cover. *FAZU em Revista* (06):11-14.

Florentino, L. A., A. V. Rezende, A. C. Mesquita, A. R. S. Lima, J. Marques, and J.M. Miranda. 2014. Diversity and potential use of rhizobia from nodules of *Gliricidia sepium*. *Revista de Ciências Agrárias* 37 (3):320-338.

Franco, A. A. 1984. Contribution of biologically-fixed nitrogen to food crop production in Brazil. In: Nitrogen management in farming systems in humid and subhumid tropics, ed. B. T. Kang, J. van der Heide, 147–166. Ibadan, Nigeria: International Institute of Tropical Agriculture.

Fred, E. B., and S.A. Waksman, eds. 1928. Laboratory manual of General Microbiology: with Special Reference to the Microorganisms of the Soil. New York, United States of America: McGraw-Hill.

Hoagland, D. R., and D. I. Arnon, eds. 1950. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley, California: Agricultural Experiment Station.

Lopes, G., P. A. A. Ferreira, F. G. Pereira, N. Curi, W. M. Rangel, and L. R. G. Guilherme. 2016. Beneficial use of industrial by-products for phytoremediation of an arsenic-rich soil from a gold mining area. *International Journal of Phytoremediation* 18 (8):777-784. doi:10.1080/15226514.2015.1131240.

Malavolta, E., G. C. Vitti, and S. A. Oliveira, eds. 1989. Evaluation of the nutritional state of plants: principles and applications. Piracicaba, Brazil: POTAFOS.

Mendonça, E. S., P. C. G. Lima, G. P. Moura, W. Melo, and F. V. Andrade. 2017. Biological nitrogen fixation by legumes and N uptake by coffee plants. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 41. doi:10.1590/18069657rbcS20160178.

Menna, P., M. Hungria, F. G. Barcellos, E. V. Bangel, P. N. Hess, and E. Martínez-Romero. 2006. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Systematic and Applied Microbiology*, 29 (4):315-332. doi:10.1016/j.syapm.2005.12.002.

Mercante, F. M., M. Hungria, I. C. Mendes, F. B. Reis Júnior, and S. A. Diva. 2014. Fixação biológica de nitrogênio em adubos verdes. In: Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil - Fundamentos e Prática 1, ed. O. F. L. Filho, E. J. Ambrosano, F. Rossi, and J. A. D. Carlos, 307-334. Brasília, DF: Embrapa.

Moreira, F. M. S. 2006. Nitrogen-fixing Leguminosae-nodulating bacteria. In: Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems, ed. F. M. S. Moreira, J. O. Siqueira, and L. Brussaard, 237-270. Wallingford, Oxon: CAB International Publishing.

Moreira, F. M. S., and J.O. Siqueira, eds. 2006. Microbiologia e bioquímica do solo. 2a ed. Lavras, Brasil: Editora UFPA.

Nogueira, C. H. P., N. Correia, L. J. P. Gomes, and P. S. A. H. Ferreira. 2019. Selectivity of bentazon and nicosulfuron in *Crotalaria spectabilis* intercropped with maize culture. *Revista Caatinga* 32 (2):381-389. doi:10.1590/1983-21252019v32n211rc.

Oliveira, D. P., T. A. Pereira, M. Rufini, F. A. D. Martins, C. L. Silva Junior, M. V. B. D. G. Baptista, J. S. Silva, P. A. C. Oliveira, O. O. S. Aragão, M. J. B. Andrade, and F. M. S. Moreira. 2019. Liquid inoculation with rhizobia in the planting furrow of common bean under no-till is feasible under different soil and climatic conditions. *Crop Science* 59 (5):2178-2184. doi:10.2135/cropsci2018.08.0522.

Rangel, W. M., S.M. Oliveira Longatti, P. A. A. Ferreira, D. S. Bonaldi, A. A. Guimarães, S. Thijs, N. Weyens, J. Vangronsveld, and F. M. S. Moreira. 2017. Leguminosae native nodulating bacteria from a gold mine As-contaminated soil: Multi-resistance to trace elements, and possible role in plant growth and mineral nutrition. *International Journal of Phytoremediation* 19 (10):925-936. doi:10.1080/15226514.2017.1303812.

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

Resende, A. S., R. P. Xavier, D. M. Quesada, S. Urquiaga, B. J. R. Alves, and R. M. Boddey. 2003. Use of green manures in increasing inputs of biologically fixed nitrogen to sugar cane. *Biology and Fertility of Soils* 37 (4):215-220. doi:10.1007/s00374-003-0585-6.

Rufini, M., D. P. Oliveira, A. Trochmann, B. L. Soares, M. J. B. D. Andrade, and F. M. S. Moreira. 2016. *Bradyrhizobium* spp. strains in symbiosis with pigeon pea cv. Fava-Larga under greenhouse and field conditions. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 40. doi:10.1590/18069657rbc20160156.

Sarruge, J. R., and H. P. Haag, eds. 1979. *Análises químicas em plantas*. Boletim técnico. Piracicaba, Brasil: Escola Superior Agricultura Luiz de Queiroz.

Soares, A. L. D. L., P. A. A. Ferreira, J. P. A. R. Pereira, H. M. M. D. Vale, A. S. Lima, M. J. B. D. Andrade, and F. M. D. S. Moreira. 2006. Agronomic efficiency of selected rhizobia strains and diversity of native nodulating populations in Perdões (MG - Brazil). II – beans. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 30 (5):803-811. doi:10.1590/S0100-06832006000500006.

Soares, A. L. L., J. P. A. R. Pereira, P. A. A. Ferreira, H. M. M. Vale, A. S. Lima, M. J. B. Andrade, and F. M. S. Moreira. 2006. Agronomic efficiency of selected rhizobia strains and diversity of native nodulating populations in Perdões (MG - Brazil). I – cowpea. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 30 (5):795-802. doi:10.1590/S0100-06832006000500005.

Souza, E. D., M. A. C. Carneiro, and V. L. Banyas. 2008. Biomass and nitrogen accumulation in cover crops species used in Brazilian Cerrado. *Acta Scientiarum Agronomy* 30 (4):525-531. doi:10.4025/actasciagron.v30i4.5313.

Souza, S. S., P. A. Couto Júnior, J. A. Flôres, F. L. C. Mingotte, and L. B. Lemos. 2019. Maize cropping systems and response of common bean in succession subjected to nitrogen fertilization. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 49. doi:10.1590/1983-40632019v49i55718.

Tabaldi, L. A., M. C. Vieira, N. A. H. Zárate, L. R. Silva, W. L. F. Gonçalves, M. F. Pilecco, A. S. Nazari, R. P. Gassi, and M. P. Padovan. 2012. Cover crops and their effects on the biomass yield of *Serjania marginata* plants. *Ciência Rural* 42 (4):614-620. doi:10.1590/S0103-84782012000400006.

Tenelli, S., R. Otto, S. A. Q. Castro, C. E. B. Sánchez, T. M. S. Sattolo, M. Y. Kamogawa, P. H. Pagliari, and J. L. N. Carvalho. 2019. "Legume nitrogen credits for sugarcane production: implications for soil N availability and ratoon yield". *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 113 (3):307-322. doi:10.1007/s10705-019-09979-y.

Wutke, E. B., A. Calegari, and L. P. Wildner. 2014. Espécies de adubos verdes e plantas de cobertura e recomendações para seu uso. In: *Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil - Fundamentos e Prática 1*, ed. O. F. L. Filho, E. J. Ambrosano, F. Rossi, and J. A. D. Carlos, 61-167. Brasília, DF: Embrapa.

Table 1: Chemical and physical properties of soil samples, taken at the 0.00-0.20 m depth layer, and geographic coordinates of the experimental area in Lavras-MG.

Characteristics ¹		Results	
		Red oxissol	Interpretation ²
pH H ₂ O (1:2,5)	-	6.0	M
P	mg dm ⁻³	28.51	VG
K	mg dm ⁻³	136.20	VG
Ca	cmolc dm ⁻³	2.38	M
Mg	cmolc dm ⁻³	0.92	G
Al	cmolc dm ⁻³	0.06	VL
H + Al	cmolc dm ⁻³	2.45	L
SB	cmolc dm ⁻³	3.65	G
T	cmolc dm ⁻³	6.10	M
t	cmolc dm ⁻³	3.71	M
m	%	1.62	VL
V	%	59.82	M
Organic Matter	dag kg ⁻¹	1.88	M
Sand	g kg ⁻¹	520	CS
Silt	g kg ⁻¹	100	CS
Clay	g kg ⁻¹	380	CS
Geographic coordinates	21° 14' 45'' S, 44° 59' 59'' W		
Altitude	920 m		
Climate (Koppen)	Cwa (humid subtropical)		

¹pH in water (v/v 1:2.5); P and K: extractor Mehlich-1; Ca, Mg, Al: extractor 1 mol L⁻¹ KCl; H+Al: potential acidity, extracted by calcium acetate 0.5 mol L⁻¹ at pH 7; SB: sum of bases; T: cation exchange capacity at pH 7; t: cation exchange capacity; m: aluminum saturation; V: base saturation; OM: organic matter, Walkey-Black method; sand, silt, and clay: pipette method.

²CS, clayey soil, G, good; L, low; M, medium; VG, very good; VL, very low (according to Alvarez V. et al. 1999).

Table 2: Identification of strains inoculated in *C. spectabilis* in pots with soil and at field conditions.

Original code/ SEMIA	Host plant	Identification	Reference
BR 2811 (SEMIA 6158) ¹	<i>C. juncea</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Franco (1984); Menna et al. (2006)
UFLA 05-03	<i>C. spectabilis</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Rangel et al. (2017)
UFLA 05-09	<i>C. spectabilis</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Rangel et al. (2017)
UFLA 05-14	<i>C. spectabilis</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Rangel et al. (2017)

¹Strain approved by Brazilian Ministry of Supply, Livestock and Agriculture for *C. spectabilis*

Table 3: Contrast of mean values for number of nodules (NN), nodule dry matter (NDM), plant height (PH), indirect chlorophyll measurement (ICM), root dry matter (RDM), shoot dry matter (SDM) and shoot N accumulation (NAS) of *C. spectabilis* cultivated in pots with non-sterile soil (greenhouse), at 60 DAS.

Number of nodules (unit plant ⁻¹)						
Treatments	BR2811	WN	WoN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14
BR 2811	473.75					
WN	ns	241.34				
WoN	ns	ns	188.75			
UFLA 05-03	ns	ns	ns	243.00		
UFLA 05-09	ns	ns	ns	---	352.87	
UFLA 05-14	ns	ns	ns	---	---	214.10
CV(%) = 29.08						
Nodule dry matter (mg plant ⁻¹)						
Treatments	BR 2811	WN	WoN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14
BR 2811	287.00					
WN	*	107.12				
WoN	ns	ns	175.50			
UFLA 05-03	ns	**	*	468.37		
UFLA 05-09	ns	*	ns	---	281.00	
UFLA 05-14	ns	ns	ns	---	---	280.75
CV(%) = 9.06						
Plant height (m)						
Treatments	BR 2811	WN	WoN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14
BR 2811	0.54					
WN	ns	0.60				
WoN	ns	ns	0.58			
UFLA 05-03	ns	ns	Ns	0.66		
UFLA 05-09	ns	ns	Ns	---	0.58	
UFLA 05-14	ns	ns	Ns	---	---	0.59
CV(%) = 23.40						
Indirect chlorophyll measurement						
Treatments	BR 2811	WN	WoN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14
BR 2811	35.97					
WN	ns	43.56				
WoN	ns	ns	44.17			
UFLA 05-03	ns	ns	Ns	45.19		
UFLA 05-09	ns	ns	Ns	---	40.55	
UFLA 05-14	ns	ns	Ns	---	---	44.62
CV(%) = 6.13						
Root dry matter (g plant ⁻¹)						

Treatments	BR 2811	WN	WoN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14
BR 2811	10.16					
WN	ns	10.52				
WoN	*	*	6.04			
UFLA 05-03	ns	ns	Ns	8.39		
UFLA 05-09	ns	ns	Ns	---	7.11	
UFLA 05-14	ns	ns	Ns	---	---	7.15
CV(%) = 13.41						
Shoot dry matter (g plant ⁻¹)						
Treatments	BR 2811	WN	WoN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14
BR 2811	11.16					
WN	**	19.15				
WoN	ns	**	11.15			
UFLA 05-03	ns	ns	Ns	13.44		
UFLA 05-09	ns	ns	Ns	---	11.39	
UFLA 05-14	ns	ns	Ns	---	---	11.82
CV(%) = 6.45						
Shoot N accumulation (mg plant ⁻¹)						
Treatments	BR 2811	WN	WoN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14
BR 2811	309.22					
WN	**	522.57				
WoN	ns	**	297.21			
UFLA 05-03	**	ns	**	477.35		
UFLA 05-09	ns	ns	Ns	---	402.58	
UFLA 05-14	ns	ns	Ns	---	---	352.19
CV(%) = 4.16						

When there was a significant effect by the F test ($p < 0.05$ or $p < 0.10$), the mean values of the treatments (strains tested) were contrasted with those of the controls of trial (WN, WoN, and BR 2811) by Dunnett's test at the same level of significance. The mean values of the experimental controls were also compared between them. WN: non-inoculated control with mineral N (300 mg dm⁻³ of NH₄NO₃); WoN: non-inoculated control without mineral N; ** significant effect at 5% probability; * significant effect at 10% probability; ns: no significant effect; CV(%): coefficient of variation, in %.

Table 4: Contrast of mean values for number of nodules (NN), nodule dry matter (NDM), plant height (PH), indirect chlorophyll measurement (ICM), root dry matter (RDM), shoot dry matter (SDM) and shoot N accumulation (NAS) of *C. spectabilis* cultivated in pots with non-sterile soil (greenhouse), at 140 DAS.

Number of nodules (unit plant ⁻¹)						
Treatments	BR 2811	WN	WoN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14
BR 2811	621.37					
WN	**	144.87				
WoN	ns	ns	389.50			
UFLA 05-03	ns	ns	Ns	189.75		
UFLA 05-09	ns	ns	Ns	---	409.37	
UFLA 05-14	ns	**	Ns	---	---	978.62
CV(%) = 11.30						
Nodule dry matter (mg plant ⁻¹)						
Treatments	BR 2811	WN	WoN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14
BR 2811	1948.50					
WN	ns	1725.75				
WoN	**	**	624.5			
UFLA 05-03	*	ns	Ns	719.25		
UFLA 05-09	ns	ns	Ns	---	886.25	
UFLA 05-14	ns	ns	**	---	---	1981.12
CV(%) = 6.34						
Plant height (m)						
Treatments	BR 2811	WN	WoN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14
BR 2811	1.54					
WN	ns	1.47				
WoN	ns	ns	1.59			
UFLA 05-03	ns	ns	Ns	1.59		
UFLA 05-09	ns	ns	Ns	---	1.54	
UFLA 05-14	ns	ns	Ns	---	---	1.58
CV(%) = 22.28						
Indirect chlorophyll measurement						
Treatments	BR 2811	WN	WoN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14
BR 2811	33.55					
WN	ns	34.26				
WoN	ns	ns	29.10			
UFLA 05-03	ns	ns	Ns	31.30		
UFLA 05-09	ns	ns	Ns	---	33.70	
UFLA 05-14	ns	ns	Ns	---	---	33.72
CV(%) = 8.71						
Root dry matter (g plant ⁻¹)						
Treatments	BR 2811	WN	WoN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14

BR2811	71.32					
WN	ns	62.65				
WoN	ns	ns	65.49			
UFLA 05-03	ns	ns	Ns	69.92		
UFLA 05-09	ns	ns	Ns	---	91.98	
UFLA 05-14	ns	ns	Ns	---	---	82.19
CV(%) = 9.54						

Shoot dry matter (g plant⁻¹)

Treatments	BR 2811	WN	WoN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14
BR 2811	144.16					
WN	ns	144.41				
WoN	ns	ns	109.95			
UFLA 05-03	ns	ns	Ns	135.84		
UFLA 05-09	ns	ns	Ns	---	144.11	
UFLA 05-14	ns	ns	Ns	---	---	138.57

CV(%) = 6.37

Shoot N accumulation (mg plant⁻¹)

Treatments	BR 2811	WN	WoNSN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14
BR 2811	3493.16					
WN	ns	4205.92				
WoN	ns	ns	2876.00			
UFLA 05-03	ns	ns	Ns	3460.61		
UFLA 05-09	ns	ns	ns	---	3948.54	
UFLA 05-14	ns	ns	Ns	---	---	4151.63

CV(%) = 3.80

When there was a significant effect by the F test ($p < 0.05$ or $p < 0.10$), the mean values of the treatments (strains tested) were contrasted with those of the controls of trial (WN, WoN, and BR 2811) by Dunnett's test at the same level of significance. The mean values of the experimental controls were also compared between them. WN: non-inoculated control with mineral N (300 mg dm^{-3} of NH_4NO_3); WoN: non-inoculated control without mineral N; ** significant effect at 5% probability; * significant effect at 10% probability; ns: no significant effect; CV(%): coefficient of variation, in %.

Table 5: Mean values of shoot dry matter (SDM) of *C. spectabilis* cultivated in conventional planting area, evaluated at 60, 90, 120 e 150 DAS.

Shoot dry matter (g plant ⁻¹) - 60 DAS						
Treatments	BR 2811	WN	WoN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14
BR 2811	4.73					
WN	*	7.78				
WoN	ns	*	5.13			
UFLA 05-03	*	*	*	6.34		
UFLA 05-09	ns	*	ns	---	5.07	
UFLA 05-14	*	*	*	---	---	3.98
Shoot dry matter (g plant ⁻¹) - 90 DAS						
Treatments	BR 2811	WN	WoN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14
BR 2811	16.35					
WN	ns	13.21				
WoN	ns	ns	12.56			
UFLA 05-03	ns	ns	Ns	17.46		
UFLA 05-09	ns	ns	ns	---	15.37	
UFLA 05-14	ns	ns	Ns	---	---	13.52
Shoot dry matter (g plant ⁻¹) - 120 DAS						
Treatments	BR 2811	WN	WoN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14
BR 2811	43.40					
WN	ns	36.73				
WoN	ns	ns	40.69			
UFLA 05-03	ns	ns	Ns	45.56		
UFLA 05-09	ns	ns	Ns	---	45.78	
UFLA 05-14	ns	ns	Ns	---	---	37.40
Shoot dry matter (g plant ⁻¹) - 150 DAS						
Treatments	BR 2811	WN	WoN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14
BR 2811	70.74					
WN	ns	72.11				
WoN	*	*	47.07			
UFLA 05-03	*	*	*	92.37		
UFLA 05-09	ns	ns	*	---	78.60	
UFLA 05-14	*	*	*	---	---	86.05
CV 1(%) = 9.4; CV 2(%)= 8.6						

When there was a significant effect by the F test ($p < 0.10$), the mean values of the treatments (strains tested) were compared with those of the controls of trial (WN, WoN, and BR 2811) by Dunnett's test at the same level of significance. The mean values of the experimental controls were also compared between them. WN: non-inoculated control with mineral N (70 kg N-urea ha⁻¹); applying half at sowing and the other half in side dressing at 20 DAE; WoN: non-inoculated control without mineral N; * significant effect at 10% probability; ns: no significant effect; CV(%): coefficient of variation, in %.

Table 6: Contrast of mean values of shoot N accumulation (SNA) of *C. spectabilis* cultivated in conventional planting area, evaluated at 60, 90, 120 e 150 DAS.

Shoot N accumulation (mg plant ⁻¹) - 60 DIAS						
Treatments	BR 2811	WN	WoN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14
BR 2811	193.58					
WN	*	304.00				
WoN	ns	*	186.67			
UFLA 05-03	ns	*	ns	222.74		
UFLA 05-09	ns	*	ns	---	191.67	
UFLA 05-14	*	*	*	---	---	151.87
Shoot N accumulation (mg plant ⁻¹) - 90 DIAS						
Treatments	BR 2811	WN	WoN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14
BR 2811	725.09					
WN	ns	470.53				
WoN	ns	ns	399.13			
UFLA 05-03	ns	ns	ns	528.82		
UFLA 05-09	ns	ns	ns	---	530.91	
UFLA 05-14	ns	ns	ns	---	---	369.65
Shoot N accumulation (mg plant ⁻¹) - 120 DIAS						
Treatments	BR 2811	WN	WoN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14
BR 2811	1116.35					
WN	ns	952.97				
WoN	ns	ns	6950.27			
UFLA 05-03	ns	ns	ns	41402.13		
UFLA 05-09	ns	ns	ns	---	1594.75	
UFLA 05-14	ns	ns	ns	---	---	1011.40
Shoot N accumulation (mg plant ⁻¹) - 150 DIAS						
Treatments	BR 2811	WN	WoN	UFLA 05-03	UFLA 05-09	UFLA 05-14
BR 2811	2004.18					
WN	ns	1763.68				
WoN	*	*	1418.37			
UFLA 05-03	*	*	*	2955.97		
UFLA 05-09	ns	ns	*	---	2503.98	
UFLA 05-14	ns	ns	*	---	---	2711.88
CV1(%) = 5.5; CV2(%) = 4.8						

When there was a significant effect by the F test ($p < 0.10$), the mean values of the treatments (strains tested) were compared with those of the controls of trial (WN, WoN, and BR 2811) by Dunnett's test at the same level of significance. The mean values of the experimental controls were also compared between them. WN: non-inoculated control with mineral N (70 kg N-urea ha⁻¹); applying half at sowing and the other half in side dressing at 20 DAE. WoN: non-inoculated control without mineral N; * significant effect at 10% probability; ns: no significant effect; CV%: coefficient of variation, in %.

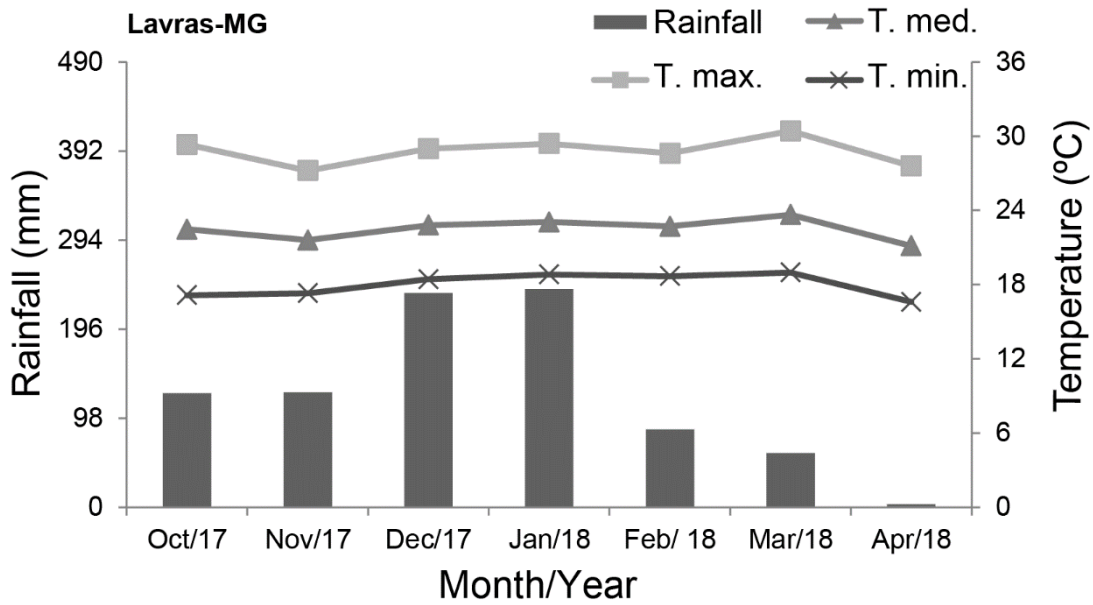


Figure 1 Monthly variation of maximum, mean, and minimum temperatures and rainfall during the period of conducting the experiments. The pot experiment lasted from October 2017 to March 2018 and the field experiment from November 2017 to April 2018.

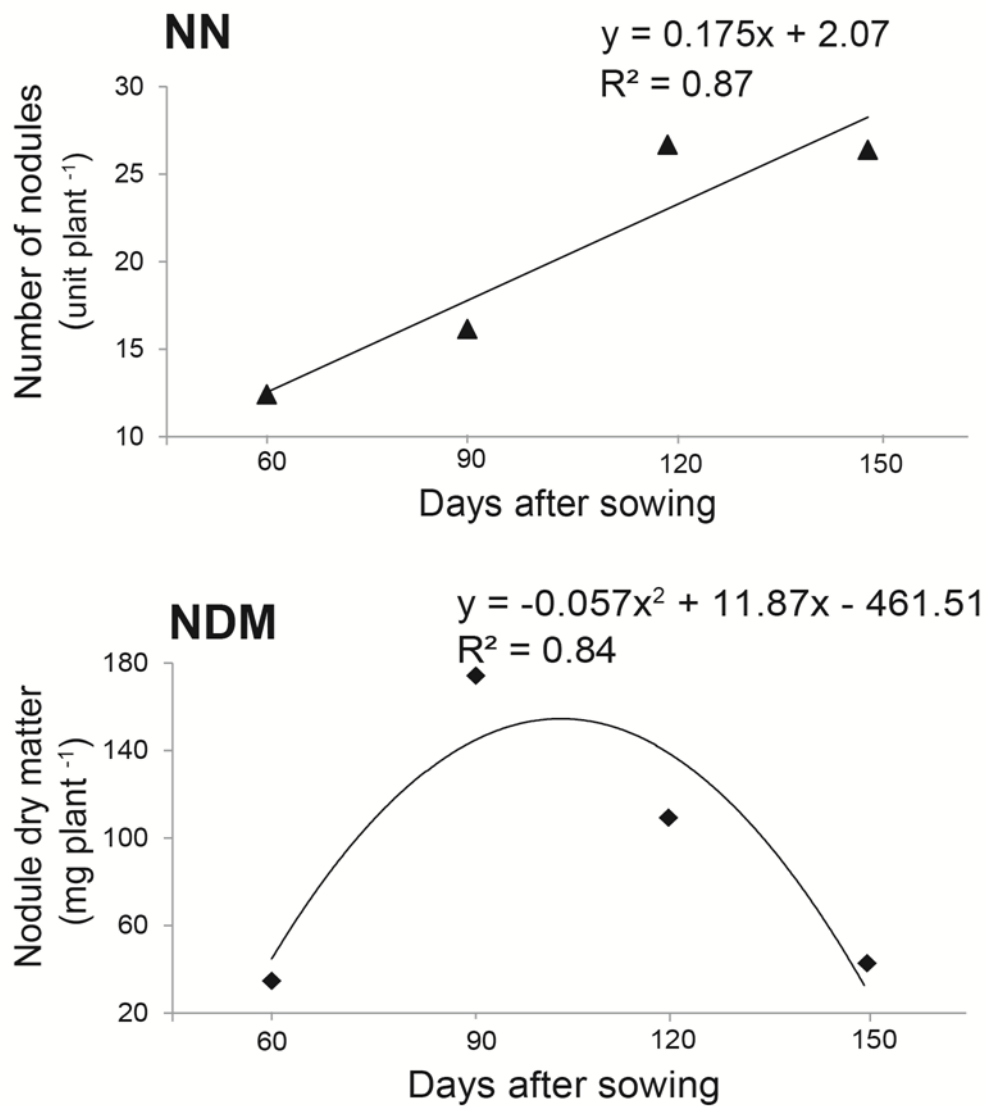


Figure 2 Number of nodules (NN) and nodule dry matter (NDM) of *Crotalaria spectabilis* cultivated in conventional planting area, evaluated at 60, 90, 120 e 150 days after sowing. Mean of four replications of the treatments: inoculation of strains UFLA 05-03, UFLA 05-09, UFLA 05-14 e BR 2811 and non-inoculated controls: without (WoN) and with (WN) 70 kg N-urea ha⁻¹.

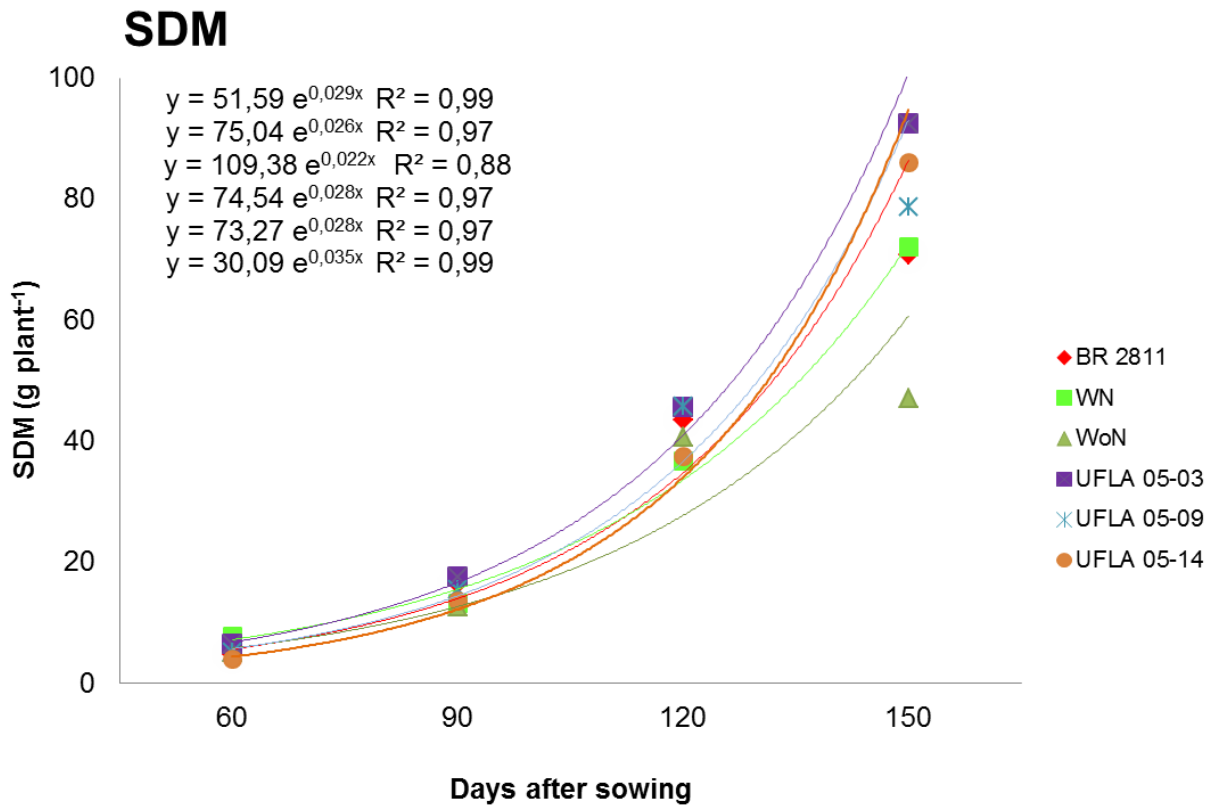


Figure 3 Shoot dry matter (SDM) of *C. spectabilis* at different treatments: [inoculation of LNNFB strains and non-inoculated controls: without (WoN) and with (WN) 70 kg N-urea ha⁻¹] in conventional planting area, evaluated at 60, 90, 120 e 150 days after sowing.

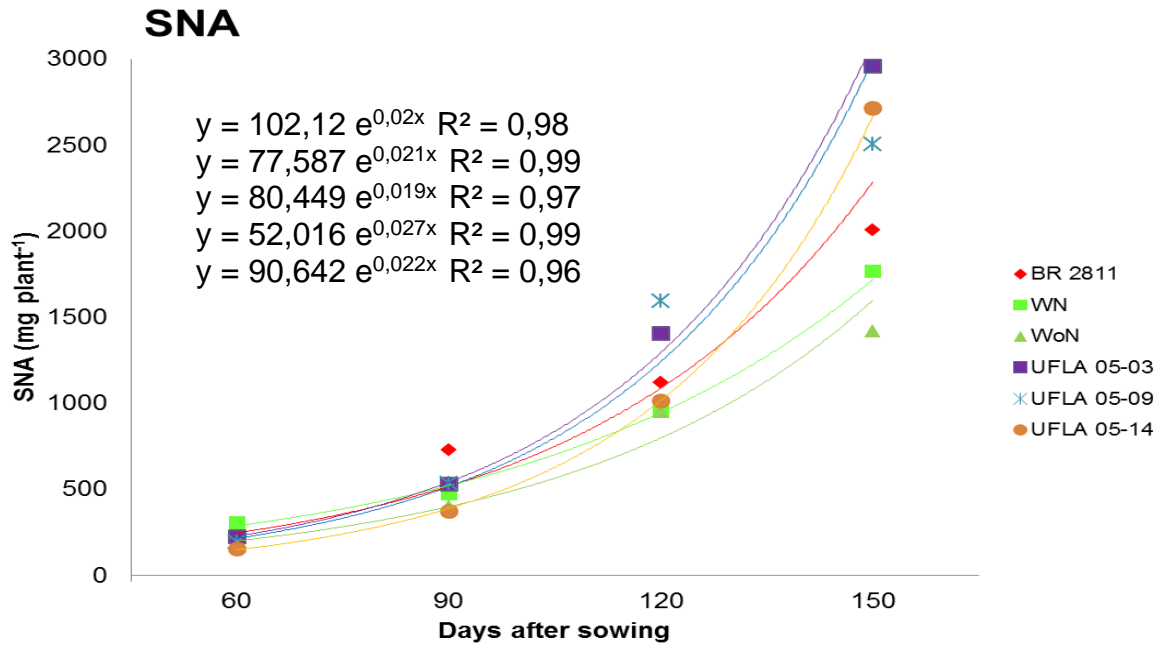


Figure 4 Shoot N accumulation (SNA) of *C. spectabilis* at different treatments: [inoculation of LNNFB strains and non-inoculated controls: without (WoN) and with (WN) 70 kg N-ureia ha⁻¹] in conventional planting area, evaluated at 60, 90, 120 e 150 days after sowing.

ARTIGO 2**Eficiência simbiótica e agronômica de novas estirpes de *Bradyrhizobium* em mucuna-preta e suas contribuições como adubo verde no milho para silagem**

Artigo formatado nas normas da Revista Agronomy for Sustainable Development

Jacqueline Savana da Silva^{1a}, Dâmiany Pádua Oliveira^{1b}, Márcia Rufini^{1c}, Celso Leandro da Silva Júnior^{1d}, Maria Vitória Batista Duque Gutierrez Baptista^{1e}, Lourdes Claudia da Silva^{1f}, Carlos Júnior Guimarães Lamounier^{1g}, Priscilla Águida Cassiano de Oliveira^{1h}, Élberis Pereira Botrel²ⁱ, Fatima Maria de Souza Moreira^{1j*}

¹ Departamento de Ciência do Solo, ²Departamento de Agricultura, ^{1,2} Universidade Federal de Lavras/UFLA, Cx. Postal 3037, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Email: ^ajacsavana@yahoo.com.br, ^bdamiany.padua.oliveira@gmail.com, ^cmarciarufini@gmail.com, ^dcelsosilva03@gmail.com, ^emariavitoriabdg@gmail.com, ^flourdesclaudia1@gmail.com, ^gcarlos.lamounier@estudante.ufla.br, ^hpri-agda@hotmail.com, ⁱelberis@dag.ufla.br, ^{j*}fmoreira@ufla.br

1 Resumo

2 A utilização de *Stizolobium aterrimum* (mucuna-preta) como adubo verde tem sido incentivada na agricultura
3 para promover o enriquecimento da fitomassa em nitrogênio e aumentar a produtividade da cultura
4 subsequente. Se a capacidade dessa leguminosa de fixar nitrogênio pela simbiose com estirpes selecionadas
5 de rizóbio for considerada, esse incremento pode ser potencializado. Diante disso, foram objetivos desse
6 estudo: *i*) avaliar as eficiências simbiótica e agrônômica de novas estirpes de *Bradyrhizobium* em mucuna-
7 preta, em vasos com solo e em campo, visando corroborar sua indicação como inoculantes para essa espécie;
8 e, *ii*) verificar a contribuição da mucuna-preta inoculada como adubo verde no milho silagem subsequente. Os
9 três experimentos foram realizados em Lavras-MG, sempre em delineamento experimental de blocos ao acaso,
10 com quatro repetições. As eficiências das estirpes foram comparadas às de dois controles não-inoculados (sem
11 e com N-mineral) e à da estirpe BR2811, aprovada como inoculante para a espécie. As avaliações na mucuna-
12 preta ocorreram aos 60 e 100 dias após sua semeadura (DAS) em vasos com solo não estéril e aos 170 DAS
13 (florescimento) em campo. Ainda em campo, a contribuição como adubo verde inoculado e com adubação de
14 arranque foi avaliada na eficiência agrônômica do milho silagem subsequente, sendo os resultados comparados
15 aos de quatro controles sem palhada, sendo eles: pousio pleno sem adubação; pousio com adubação de arranque
16 e sem adubação de cobertura; pousio com adubação de arranque + 60 kg de N-ureia ha⁻¹ na adubação de
17 cobertura; e pousio com adubação de arranque + 120 kg de N-ureia ha⁻¹ na adubação de cobertura. A adubação
18 de arranque foi equivalente a 300 kg ha⁻¹ do fertilizante formulado 08-28-16. Concluiu-se que: *a*) os rizóbios
19 nativos são competentes na simbiose com a mucuna-preta, mas têm eficiência de FBN menor que a das novas
20 estirpes inoculadas, que aumentaram a produtividade de fitomassa enriquecida em N destinada à adubação
21 verde; *b*) comparados aos controles sob pousio com adubação de arranque, palhadas de mucuna-preta com
22 adubação de arranque e inoculadas com as estirpes UFLA05-19, UFLA05-20, BR2811 e INPA104A ou
23 fertilizada com 70 kg N-ureia ha⁻¹ incrementam a produtividade do milho silagem; entretanto, se consideradas
24 vantagens ambientais e econômicas da adubação verde e da biotecnologia de inoculação estas são mais
25 recomendadas.

26 **Palavras-chave** *Stizolobium aterrimum*, fixação biológica de nitrogênio, rizóbio, seleção de estirpes

27 1 Introdução

28

29 A adubação verde é uma técnica agrícola milenar que proporciona benefícios químicos, físicos e
30 biológicos ao sistema solo-planta. As leguminosas estão entre as espécies mais utilizadas como adubo verde,
31 contribuindo para grande aporte de nitrogênio (N) no solo, o qual pode ser maximizado pelo processo de
32 fixação biológica de nitrogênio (FBN) com estirpes selecionadas por sua maior eficiência neste processo.
33 Considerada como 'rainha' das leguminosas (Wutke et al. 2014), a mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum*) é
34 uma espécie vegetal muito utilizada como adubo verde (Ambrosano et al. 2011; 2013; Andrade Neto et al.

1 2010; Borkert et al. 2003; Queiroz et al. 2010; Matos et al. 2011; Tabaldi et al. 2012) por apresentar
2 produtividade de fitomassa de até 9 t ha⁻¹ e fixação de N₂ de até 157 kg N ha⁻¹ano⁻¹ (Santos et al., 2017; Wutke
3 et al., 2014). Por vantagens como essas, seu emprego sob condições tropicais tem sido estimulado (Ambrosano
4 et al. 2011; 2013; Andrade Neto et al. 2010; Queiroz et al. 2010; Zaccheo et al. 2016), beneficiando culturas
5 subsequentes, como o milho (Amado et al. 2007; Conceição et al. 2005; Okito et al. 2004; Scivittaro et al.
6 2000).

7 O cultivo do milho destinado à produção de silagem exerce grande importância para a pecuária
8 brasileira e para o estado de Minas Gerais, que detém uma parcela expressiva da bacia leiteira nacional
9 (CONAB 2020). O cultivo da mucuna-preta previamente ao milho, como adubo verde, pode incrementar a
10 produtividade da silagem, além de propiciar amplos benefícios ao sistema solo-planta. A biotecnologia da
11 inoculação com rizóbios eficientes na FBN pode elevar o fornecimento de N ao milho e, conseqüentemente,
12 contribuir para o enriquecimento nutricional da silagem, pelo maior aporte de N no adubo verde. Essa prática
13 na cultura do milho, no entanto, ainda é pouco comum e carece de maior difusão. Até o momento, a estirpe
14 BR2811 (SEMIA6158), de *Bradyrhizobium elkanii*, é a única aprovada como inoculante para mucuna-preta
15 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); mas resultados de pesquisas têm indicado
16 potencial de FBN também de outras estirpes nessa leguminosa. É o caso das estirpes UFLA05-18, UFLA05-
17 19 e UFLA05-20 isoladas da própria mucuna-preta oriunda de mina de ouro contaminada com arsênio, cuja
18 eficiência superior à da estirpe BR2811 e à do N-mineral foi comprovada em vasos Leonard contendo substrato
19 e solução nutritiva esterilizados (Rangel et al. 2017). Com igual competência, as estirpes UFLA03-144,
20 UFLA04-212 e INPA104A foram isoladas de *Vigna unguiculata* (caupi), *Macroptilium atropurpureum*
21 (siratro) e *Campsiandra surinamensis*, respectivamente, em área de agricultura e floresta (INPA104A) e
22 também testadas em condições axênicas, igualmente demonstraram ser promissoras em caupi, siratro ou fava
23 (*Phaseolus lunatus*) (Costa et al. 2017; Florentino et al. 2009; Guimarães et al. 2012; 2015) devendo também
24 ser avaliadas em mucuna-preta. Considerando esses bons resultados, é importante validar essas estirpes
25 também em condições de campo, com vistas a consolidar sua recomendação como inoculante para mucuna-
26 preta.

27 Diante disso, foram objetivos desse trabalho: *i*) avaliar as eficiências simbiótica e agrônômica de
28 estirpes de *Bradyrhizobium* em mucuna-preta cultivada em Latossolo Vermelho, em vasos com solo e campo;
29 e, *ii*) verificar a contribuição da mucuna-preta inoculada com as estirpes em fase de seleção como adubo verde
30 no milho silagem subsequente, cultivado em um Latossolo Vermelho-Amarelo de Lavras-MG.

31

32 2 Material e métodos

33

34 Três experimentos com mucuna-preta destinada à adubação verde foram realizados no período de
35 setembro de 2017 a junho de 2018, em Lavras-MG (920 m de altitude e classificação climática Cwa -

1 subtropical úmido). Dois deles foram conduzidos em Latossolo Vermelho (um em vasos e outro em campo),
2 visando determinar as eficiências simbiótica e agronômica de bactérias fixadoras de N₂ nodulíferas (BFNN),
3 pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, em mucuna-preta; e um terceiro experimento em campo, em
4 Latossolo Vermelho-Amarelo, de modo a verificar a contribuição da palhada de mucuna-preta inoculada sob a
5 eficiência agronômica do milho silagem. As comunidades de rizóbios nativos capazes de nodular a mucuna-
6 preta no Latossolo Vermelho e Latossolo Vermelho-Amarelo era de aproximadamente $1,1 \times 10^2$ e $0,9 \times 10^2$
7 células por grama de solo, respectivamente, estimadas com a mesma metodologia empregada por Rufini et al.
8 (2011).

9 Os inoculantes foram preparados em meio 79 líquido (Fred and Waksman 1928), a 28°C e agitação de
10 110 rpm durante 96 horas. Para os experimentos de campo, o inóculo foi transferido para turfa esterilizada em
11 autoclave, na proporção 3:2 (m:v) de turfa e inóculo. A qualidade dos inoculantes foi monitorada por meio de
12 contagem em meio de cultura 79 sólido do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), respeitando-
13 se o número mínimo legal de 10^9 UFC por mL ou g de inoculante.

14

15 **2.1 Eficiência simbiótica e agronômica de estirpes de *Bradyrhizobium* em mucuna-preta**

16

17 **2.1.1 Avaliação da eficiência simbiótica em vasos com solo não estéril**

18

19 O experimento foi conduzido em casa de vegetação no período de outubro de 2017 a fevereiro de 2018.
20 A mucuna-preta foi cultivada em vasos de 3 dm³ por 60 dias após sua semeadura (DAS) e em vasos de 5 dm³
21 por 100 DAS. O solo utilizado foi classificado como Latossolo Vermelho (Tabela 1) coletado de área com
22 histórico de cultivo de gramíneas e feijão não inoculado. Os tratamentos foram constituídos pelas estirpes de
23 BFNN UFLA05-18, UFLA05-19 e UFLA05-20, em fase de seleção para mucuna-preta (Tabela 2), e pela
24 estirpe BR2811, aprovada para a produção de inoculantes para a cultura, além de dois controles não inoculados
25 (sem e com N mineral). O delineamento foi em blocos ao acaso, com quatro repetições para cada uma das
26 épocas de avaliação (60 e 100 DAS).

27 A adubação adotada nos vasos (300; 200; 200; 50; 50; 0,8; 1,5; 2; 3; 0,10 e 4 mg dm⁻³ de P, K, Ca,
28 Mg, S, B, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn, respectivamente) seguiu as recomendações de Malavolta et al. (1989). As
29 fontes solúveis utilizadas foram: fosfato de cálcio monobásico (monohidratado) Ca(H₂PO₄)₂.H₂O; cloreto de
30 potássio KCl; sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄).7H₂O; ácido bórico H₃BO₃; sulfato de cobre
31 pentahidratado (CuSO₄).5H₂O; cloreto férrico FeCl₃; cloreto de manganês tetra hidratado (MnCl₂).4H₂O;
32 molibdato de sódio diidratado (Na₂MoO₄).2H₂O e sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO₄).7H₂O. O
33 tratamento controle sem inoculação e com N mineral recebeu também 300 mg NH₄NO₃ dm⁻³, parcelados em
34 três aplicações.

1 Antes da semeadura, as sementes foram escarificadas em ácido sulfúrico 98% por 15 minutos, lavadas
2 sucessivamente em água destilada esterilizada e deixadas de molho por 20 minutos. Foram semeadas quatro
3 sementes por vaso e, aos cinco dias após a emergência (DAE), o desbaste foi realizado deixando-se duas
4 plântulas por vaso. Nos tratamentos com estirpes, cada semente recebeu 1 mL de inoculante. Os vasos foram
5 irrigados diariamente para manter a umidade do solo próxima à capacidade de campo, de 60% do volume total
6 de poros ocupados. As médias das temperaturas mínima e máxima registradas durante o período de condução
7 do experimento foi de 19,4 e 31,5 °C, respectivamente.

8 As coletas ocorreram aos 60 e 100 DAS. Para cada época de avaliação foram coletadas todas as plantas
9 de cada parcela (duas plantas por vaso), contemplando as quatro repetições de cada tratamento, para a
10 determinação do número (NN) e massa seca de nódulos (MSN), leitura indireta de clorofila (LIC), altura da
11 planta (AP), massa seca da raiz (MSR) e fitomassa seca da parte aérea (FSPA). O acúmulo de N na parte aérea
12 (ANPA) foi determinado na coleta realizada aos 60 DAS por meio da multiplicação do teor de N [obtido pelo
13 método semi-microkjedhal (Sarruge and Haag 1979)] pela FSPA. A LIC foi obtida por meio de leituras
14 realizadas com o aparelho Minolta SPAD-502 na última folha completamente desenvolvida de cada planta (15
15 leituras por planta). Para obtenção das MSN, MSR e FSPA, os nódulos, as raízes e a parte aérea foram
16 depositados em estufa de ar forçado a 60°C, até a obtenção de peso constante.

17

18 **2.1.2 Avaliação da eficiência agronômica de estirpes de *Bradyrhizobium* em campo**

19

20 O experimento foi conduzido na safra das águas/2017 (setembro de 2017 a janeiro de 2018), em
21 Lavras-MG, na mesma área onde foi coletado o solo utilizado no experimento em vasos (21° 14' 45" S e 44°
22 59' 59" W). O delineamento experimental foi blocos ao acaso, com quatro repetições. Os tratamentos
23 inoculados foram constituídos pelas sete estirpes detalhadas na Tabela 2, além de controles não inoculados sem
24 (SN) e com (CN) 70 kg N-ureia ha⁻¹, sendo metade desse N aplicado na semeadura e outra metade em
25 cobertura, aos 20 DAE.

26 Cada parcela (10,8 m²) foi constituída de quatro linhas com 4,5 m de comprimento, espaçadas em 0,6
27 m, e a área útil correspondeu às fileiras centrais. O preparo convencional do solo correspondeu à aração,
28 gradagem e sulcamento para demarcação das linhas. Nenhuma das parcelas recebeu adubação de base por não
29 ser prática comum aos cultivos de adubos verdes na região.

30 A semeadura manual foi realizada imediatamente após a inoculação das sementes, empregando-se a
31 densidade de quatro sementes por metro linear (Wutke et al. 2014). Os registros de precipitação e temperatura
32 do período de cultivo encontram-se na Figura 1. As plantas espontâneas e formigas foram controladas,
33 respectivamente, por meio de capinas manuais e iscas formicidas, sempre que necessário. Não foi necessário
34 o controle de outras pragas ou de doenças.

1 Na ocasião do florescimento da mucuna-preta, aos 170 DAS, retirou-se aleatoriamente de cada parcela
2 uma amostra de cinco plantas (linhas 2 e 3) para determinação do NN, MSN, FSPA e ANPA. Para a
3 determinação do NN as raízes das plantas foram coletas com o auxílio de uma pá, respeitando o volume de
4 solo explorado pelo sistema radicular. Os nódulos foram cuidadosamente destacados de suas raízes, lavados e
5 secos em estufa de circulação forçada de ar. As demais metodologias das avaliações seguiram as mesmas
6 descritas em 2.1.1.

7

8 **2.2 Eficiência agrônômica do milho silagem sob palhada de mucuna-preta inoculada**

9

10 O experimento foi conduzido em campo, de novembro de 2017 a junho de 2018 no Centro de
11 Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Agropecuária da UFLA (21° 12' S e 44° 58' W), em Lavras-
12 MG, em um Latossolo Vermelho-Amarelo (Tabela 1). As plantas de mucuna-preta submetidas à inoculação
13 com as sete estirpes descritas na tabela 2 (UFLA03-144, UFLA04-212, UFLA05-18, UFLA05-19, UFLA05-
14 20, INPA104A e BR2811) e aos dois controles sem (SN) e com (CN) 70 kg N-ureia ha⁻¹ foram cultivadas. Aos
15 80 DAS foram determinados NN, MSN e FSPA das plantas de mucuna. As metodologias das dessas avaliações
16 seguiram as mesmas descritas em 2.1.2.

17 Posteriormente, as plantas de mucuna-preta foram dessecadas com glifosato (Roundup®, 3 L ha⁻¹) e
18 2,4-diclorofenoxyacético (2,4 D Nortox®, 1 L ha⁻¹) e, em seguida, roçadas para posterior semeadura do milho
19 safrinha sob a palhada remanescente. Além da palhada dos tratamentos anteriormente detalhados, foram
20 acrescidos quatro outros tratamentos controles sem palhada, sendo eles: pousio sem adubação de plantio ou de
21 cobertura (POUSIO); pousio com adubação de arranque e sem adubação de cobertura (P+A); pousio com
22 adubação de arranque + 60 kg N-ureia ha⁻¹ em cobertura (P+A+1/2C) e pousio com adubação de arranque +
23 120 kg N-ureia ha⁻¹ em cobertura (P+A+C).

24 O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso, com quatro repetições. As parcelas com
25 milho foram constituídas de seis linhas com 6 m de comprimento, espaçadas em 0,6 m, respeitando-se a mesma
26 delimitação utilizada para o cultivo da mucuna-preta. Foram utilizadas sementes do híbrido silagem 9004 Pro
27 (KWS Riber Semente), semeado mecanicamente e objetivando-se um estande final de aproximadamente 60
28 mil plantas ha⁻¹.

29 Com exceção do tratamento POUSIO, todos os demais tratamentos, incluídos aqueles sob palhada de
30 mucuna-preta, receberam adubação de arranque (A) com 300 kg ha⁻¹ do fertilizante formulado 08-28-16 no
31 momento da semeadura do milho. A adubação de cobertura dos tratamentos POUSIO ocorreu quando as
32 plantas de milho atingiram o estágio vegetativo V8: pousio sem adubação de plantio ou de cobertura
33 (POUSIO); pousio com adubação de arranque e sem adubação de cobertura (P+A); pousio com adubação de
34 arranque + 60 kg N-ureia ha⁻¹ em cobertura (P+A+1/2C) e pousio com adubação de arranque + 120 kg N-ureia
35 ha⁻¹ em cobertura (P+A+C) (Fancelli 2015). As plantas espontâneas foram controladas com capinas manuais

1 sempre que necessário. O controle de pragas e doenças se deu com uma aplicação dos inseticidas metomil
2 (Brilhante BR®, 300 mL ha⁻¹) e lufenurom (Match®, 300 mL ha⁻¹) e do fungicida
3 trifloxistrobina/protioconazol (Fox®, 200 ml ha⁻¹) + éster metílico de óleo de soja (Áureo®, 0,25% v/v), além
4 de uma aplicação dos inseticidas lambda-cialotrina + tiametoxam (Engeo Pleno®, 250 mL ha⁻¹) e
5 clorantraniliprole + lambda-cialotrina (Ampligo®, 150 mL ha⁻¹).

6 No estágio VT do milho (Fancelli, 2015), na altura da folha índice, foram realizadas leituras indiretas
7 de clorofila (LIC-Mi) com o aparelho Minolta SPAD-502 em 5 plantas (15 leituras por planta) por parcela. Em
8 R3/R4 (Fancelli 2015), quando a linha de leite atingiu entre 1/3 a 2/3 da altura do grão, foram coletadas
9 aleatoriamente dez plantas nas linhas centrais de cada unidade experimental para determinação da altura do
10 milho, produtividade de silagem, teor de proteína (TPB-MS) e N acumulado (ANPA-MS) na silagem de milho.
11 A produtividade final de silagem foi calculada a partir da fitomassa fresca do milho, ajustando a umidade para
12 650 g kg⁻¹. O TPB-MS foi calculado multiplicando-se o teor de N [obtido pelo método semi-microkjedhal
13 (Sarruge and Haag 1979)] por 6,25; e o ANPA-MS, multiplicando-se esse mesmo teor de N pela produtividade
14 de silagem.

15

16 **2.3 Análises estatísticas**

17

18 A avaliação da densidade das comunidades de rizóbios nativos foi interpretada de acordo com a Tabela
19 de Mc Crady (Dobereiner et al. 1995). Os demais dados obtidos foram submetidos à análise de variância após
20 terem sido previamente submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilks), homocedasticidade de
21 variâncias (Breusch-Pagan) e independência (Dubin-Watson) no software *R* (R Development Core Team
22 2019). Para atender aos pressupostos da análise de variância, os dados de MSN de ambas as coletas do
23 experimento em vasos com solo (item 2.1.1) e o NN do experimento de eficiência agrônômica em campo da
24 mucuna-preta inoculada (item 2.1.2) como também do item 2.1.2 foram transformados para $(y+0,5)^{0,5}$ e \sqrt{y}
25 respectivamente. A MSN desse último, e o TPB-MS e ANPA-MS do experimento de eficiência agrônômica
26 do milho (item 2.2) foram previamente transformados em $\log(y)$. Quando houve efeito significativo pelo teste
27 F [$p < 0,05$ ou $p < 0,10$ (Brasil 2011)], as médias dos tratamentos testados foram contrastadas com as dos
28 controles de cada experimento pelo teste de Dunnett, ao mesmo nível de significância. As médias dos controles
29 experimentais também foram contrastadas entre si seguindo os mesmos critérios já mencionados.

30

31 **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

32

33 **3.1 Eficiência simbiótica e agrônômica de estirpes de *Bradyrhizobium* em mucuna-preta**

34

1 3.1.1 Avaliação da eficiência simbiótica em vasos com solo não estéril

2

3 As médias de NN, MSN, MSR, LIC, FSPA e ANPA determinadas aos 60 DAS encontram-se na Tabela
4 3. Não houve diferença significativa entre os três controles (SN, CN e estirpe BR2811) quanto às variáveis
5 NN, MSN, MSR e LIC. As médias de FSPA e ANPA do controle CN superaram as da estirpe BR2811 e do
6 controle SN, sendo estes últimos semelhantes entre si. Com exceção do NN da estirpe UFLA05-20 que se
7 assemelhou ao da BR2811, os resultados de NN das estirpes de código UFLA superaram o dos controles. Não
8 houve diferença significativa na MSN e MSR entre os tratamentos avaliados. A LIC dos tratamentos
9 inoculados com as estirpes UFLA05-18 e UFLA05-20 foi superior à dos tratamentos CN e BR2811, sendo a
10 leitura da UFLA05-20 superior também ao tratamento SN. As médias de FSPA das estirpes UFLA05-19 e
11 UFLA05-20 foram semelhantes às dos tratamentos SN e BR2811; no entanto as médias dessas duas estirpes
12 UFLA não superaram a do tratamento CN. A FSPA da estirpe UFLA05-18 foi superior à da BR2811 e
13 semelhante às dos tratamentos CN e SN. As estirpes UFLA05-18 e UFLA05-20 acumularam a mesma
14 quantidade de N na parte aérea que os tratamentos BR2811 e SN. A UFLA05-19 foi a que mais se destacou
15 em relação ao ANPA, uma vez que acumulou mesma quantidade de N que os tratamentos BR2811 e CN, sendo
16 superior ao SN.

17 Os resultados das avaliações realizadas aos 100 DAS estão apresentados na Tabela 4. Não houve
18 diferença significativa entre os três controles sobre nenhuma das variáveis. Assim como aos 60 DAS, a MSN
19 e MSR dos tratamentos se assemelharam às dos controles. Os resultados de NN e LIC da estirpe UFLA05-18
20 se assemelharam aos da BR2811 e superaram os dos tratamentos CN e SN. O NN das estirpes UFLA05-19 e
21 UFLA05-20 se sobressaiu ao dos três controles. A FSPA da estirpe UFLA05-19 foi maior que a dos
22 tratamentos BR2811 e SN, e semelhante à do CN. A ausência de resposta na MSR dos tratamentos pode estar
23 relacionada à dimensão dos vasos, interferindo na exploração das raízes. Todavia, essa possível limitação não
24 comprometeu o desenvolvimento vegetal.

25 A presença de nódulos nas plantas dos controles SN e CN aos 60 e 100 DAS é indicativo da existência
26 de comunidades nativas de rizóbios. Apesar de pouco numerosos ($1,1 \times 10^2$ células de rizóbio por grama de
27 solo) em relação às concentrações de células nos inoculantes, e com NN inferiores aos tratamentos inoculados,
28 esses rizóbios nativos mostraram-se também eficientes na FBN em mucuna-preta, sobretudo aos 100 DAS,
29 quando não se diferiram da estirpe BR2811 e do controle CN em nenhuma das variáveis analisadas. Chada e
30 Polli (1988) e Rodrigues et al. (1994) também observaram bons resultados de rizóbios nativos nessa
31 leguminosa. Por sua vez, o desempenho desses rizóbios nativos situou-se abaixo do das estirpes UFLA05-18
32 (aos 100 DAS) e UFLA05-20 (aos 60 DAS) na LIC e da UFLA05-19 na FSPA (aos 100 DAS) e ANPA (aos
33 60 DAS). A superioridade de valores dessas inoculações com relação aos da estirpe BR2811, destacando-se a
34 UFLA05-18 e a UFLA05-19 e a similaridade e até superioridade com relação aos do controle nitrogenado
35 (CN) mostra a importância da seleção de estirpes eficientes na FBN, que resultem em aumento na produção

1 de fitomassa e no enriquecimento em N da mucuna-preta com fins de adubação verde. A reafirmação de bons
2 resultados das inoculações em campo, apresentados a seguir, fortalecerá a uma possível recomendação das
3 estirpes junto ao MAPA.

4

5 **3.1.2 Avaliação da eficiência agrônômica em campo**

6

7 Os resultados de eficiência agrônômica das BFNN inoculadas em mucuna-preta aos 170 DAS
8 encontram-se na Tabela 5. Não houve diferença significativa entre os contrastes dos três controles sobre
9 nenhuma das variáveis. O NN da estirpe UFLA05-20 superou o de todos os controles. As médias de MSN das
10 estirpes UFLA05-19, UFLA05-20 e UFLA04-212 superaram a do CN. A produção de FSPA com a inoculação
11 da estirpe UFLA05-18 foi equivalente à BR2811 e superior à dos controles CN e SN. A estirpe UFLA05-18
12 também promoveu maior acúmulo de N na parte aérea em relação aos tratamentos BR2811, CN e SN. A estirpe
13 UFLA05-20 apresentou ANPA semelhante aos dos controles BR2811 e CN, e superior ao controle SN.

14 Novamente ressalta-se a importância da inoculação com estirpes eficientes na FBN, como a UFLA05-
15 18 e UFLA05-20. É sabido que 70% do N acumulado na mucuna-preta é proveniente do processo de fixação
16 de N₂ (Giller 2001), mas também que nem sempre esse acúmulo é conseguido apenas com o desempenho das
17 comunidades nativas, tornando-se necessário o emprego de inoculantes contendo estirpes selecionadas.

18 Os atuais bons resultados de simbiose da mucuna-preta com as estirpes UFLA05-18, UFLA05-19 e
19 UFLA05-20 em vasos com solo não estéril e em campo, destacando-se esta última, corroboram os observados
20 por Rangel et al. (2017) em condições axênicas e agregam importantes informações quanto ao comportamento
21 dessas estirpes sob condições de competição e estresse, indicando serem promissoras aos fins de contribuição
22 na adubação verde.

23

24 **3.2 Avaliação da eficiência agrônômica do milho silagem sob palhada de mucuna-preta inoculada**

25

26 Os resultados de NN, MSN e FSPA das plantas de mucuna plantadas anteriormente ao milho
27 encontram-se na Tabela 6. Não houve diferença significativa dos controles experimentais quando comparados
28 entre si, ou quando comparados com as estirpes INPA 104A, UFLA 03-144 e UFLA 04-212 para nenhuma
29 das variáveis avaliadas. As demais estirpes apresentaram maior nodulação que os controles, exceto a UFLA
30 05-20 que assemelhou-se a BR 2811. Não houve diferença significativa entre os tratamentos avaliados para
31 MSN. A estirpe UFLA 05-19 se destacou na produção de FSPA, uma vez que superou a produção obtida pelos
32 rizóbios nativos, pelo controle nitrogenado e assemelhou-se aos resultados obtidos pela BR 2811. As demais
33 estirpes apresentaram FSPA semelhante aos controles experimentais. Os resultados de eficiência agrônômica
34 do milho silagem sob palhada de mucuna-preta encontram-se na Tabela 7. As médias das variáveis LIC-Mi,

1 TPB-MS e ANPA-MS do POUSIO ficaram abaixo das médias dos tratamentos P+A, P+A+1/2C e P+A+C.
2 Esses quatro controles sem palhada de mucuna-preta não diferiram quanto à altura do milho e produtividade
3 de silagem. Os valores médios de LIC-Mi de todos os tratamentos com palhada de mucuna-preta superaram o
4 do POUSIO; não houve diferença significativa de nenhum desses tratamentos com os controles P+A+1/2C e
5 P+A+C, e os tratamentos M+UFLA05-19+A e M+CN+A destacaram-se por apresentarem LIC-Mi superiores
6 ao do P+A.

7 As baixas precipitações durante a condução do experimento (Figura 1) influenciaram no crescimento
8 do milho e em outras variáveis-resposta. Especificamente com relação à altura do milho, os tratamentos não
9 atingiram a faixa de 190 e 260 cm recomendada para a produção de silagem (Morais et al. 2015). A escassez
10 hídrica possivelmente influenciou os tratamentos, sobretudo os controles com ureia em cobertura, que, pela
11 inexistência de palhada em superfície, que conservaria umidade no solo, teve dificultada a assimilação do N
12 proveniente da ureia. Em consequência desse menor crescimento, registrou-se efeito de concentração de N na
13 silagem dos controles (Tabela 7). Por sua vez, a palhada de mucuna-preta favoreceu o crescimento do milho,
14 onde todas as plantas com esse tratamento superaram os controles P+A, P+A+C, e apenas as plantas de
15 M+UFLA04-212+A e M+SN+A não ultrapassaram as medidas do controle P+A+1/2C, mas sim mantiveram
16 altura equivalente a deste controle. Vale ressaltar que nem sempre a maior altura da planta se relaciona a uma
17 silagem de qualidade, uma vez que aumenta a percentagem de colmo na fitomassa total a ser ensilada, podendo,
18 inclusive, prejudicar suas características bromatológicas (Mello et al. 1999). Além disso, a redução do ANPA-
19 MS pode ser resultado de efeito de diluição de N pelo maior crescimento do milho.

20 Os valores de TPB-MS dos tratamentos com palhada de mucuna-preta foram semelhantes ao do
21 controle P+A. Os teores dos tratamentos M+UFLA03-144+A, M+UFLA04-212+A, M+UFLA05-18+A,
22 M+UFLA05-19+A, M+BR2811+A, M+INPA104A+A, M+CN+A e M+SN+A foram equivalentes (ao do
23 P+A+1/2C) ou inferiores (ao do P+A+C, com exceção do M+CN+A) aos dos pousios com ureia em cobertura
24 (Tabela 7), confirmando o efeito diluição de N pelo maior crescimento das plantas. Com exceção do POUSIO,
25 os demais TPB-MS situaram-se próximos aos da faixa de proteína bruta adequada na silagem, que é de 7 a
26 10% (Morais et al. 2015). O TPB-MS do tratamento M+UFLA05-20+A atingiu a máxima percentagem do
27 estudo, de 10,47%, igualando-se estatisticamente aos controles P+A, P+A+1/2C e P+A+C, e superando o
28 POUSIO.

29 Os controles P+A, P+A+1/2C e P+A+C apresentaram ANPA-MS semelhantes entre si. Todos os
30 tratamentos avaliados acumularam mais N que o POUSIO. Com exceção do M+UFLA05-20+A, os
31 tratamentos com mucuna-preta + arranque apresentaram ANPA-MS igual aos controles P+A, P+A+1/2C e
32 P+A+C. Já o tratamento M+UFLA05-20+A destacou-se por acumular mais N que o P+A, o P+A+1/2C e
33 igualar-se ao P+A+C.

34 Ainda que submetidas à restrição hídrica, alguns dos tratamentos se sobressaíram na produtividade de
35 silagem e no conteúdo de N nela acumulado. É o caso de M+UFLA05-20+A, M+BR2811+A e

1 M+INPA104A+A, cujas produtividades de silagem superaram as dos controles POUSIO, P+A, P+A+1/2C e
2 P+A+C. O ANPA-MS do tratamento M+UFLA05-20+A, que superou até o P+A+1/2C, manteve a mesma
3 superioridade na altura do milho, TPB-MS e produtividade de silagem. Com exceção da média obtida com o
4 tratamento M+SN+A (que não diferiu dos quatro controles sem mucuna-preta), as produtividades de silagem
5 dos demais tratamentos com mucuna-preta superaram a do POUSIO; as médias com os tratamentos
6 M+UFLA05-19+A e M+CN+A foram superiores às do P+A e P+A+1/2C e ainda equivalentes à do P+A+C;
7 as médias do tratamento M+UFLA03-144+A se assemelharam às do P+A e P+A+C e superaram a do
8 P+A+1/2C; e as dos tratamentos M+UFLA04-212+A e M+UFLA05-18+A não diferiram dos três controles
9 sob pousio adubado (P+A, P+A+1/2C e P+A+C).

10 Em síntese, os resultados sob mucuna-preta que superaram os do P+A demonstram influência positiva
11 dessa palhada para o cultivo do milho silagem, mesmo que não oriunda de inoculações com rizóbio
12 selecionado. Além de servir como adubo, a palhada agrega em proteção e recuperação da estrutura física do
13 solo (Bonini and Alves 2011; Matheus et al. 2018; Silva et al. 1998), na conservação de água no solo (Souza
14 et al. 2014), na biodegradação de herbicidas (Santos et al. 2010; Souto et al. 2013; Wutke et al. 2014), na
15 fitorremediação de solos contaminados (Hernani and Padovan 2014; Rangel et al. 2017) e no controle de
16 plantas espontâneas (Matheus et al. 2018; Wutke et al. 2014).

17 A inoculação com estirpes mais eficientes na FBN incrementa a produtividade do milho silagem. A
18 superioridade dos resultados dos tratamentos M+UFLA05-19+A, M+UFLA05-20+A, M+BR2811+A e
19 M+INPA104A+A comparados aos controles sob pousio deixam claro a importância do plantio sob palhada de
20 mucuna-preta inoculada com estirpes selecionadas na produtividade de milho silagem.

21

22 4 CONCLUSÕES

23

24 Rizóbios nativos são competentes na simbiose com a mucuna-preta, mas têm eficiência em fixar
25 nitrogênio abaixo da obtida por meio de inoculações com estirpes selecionadas, que aumentam a produtividade
26 de fitomassa enriquecida em N destinada à adubação verde.

27 Comparados aos controles sob pousio adubado, palhadas de mucuna-preta com adubação de
28 arranque e inoculadas com as estirpes UFLA05-19, UFLA05-20, BR2811 e INPA104A ou de mucuna-preta
29 fertilizada com 70 kg N-ureia ha⁻¹ incrementam a produtividade do milho silagem; entretanto, se consideradas
30 vantagens ambientais e econômicas, a biotecnologia de inoculação é mais viável.

31

32 **Agradecimentos** Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
33 (CAPES) (CAPES/PROEX AUXPE 593/2018), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
34 Tecnológico (CNPq) (Processo: 304527/2016-5; Processo: 431504/2016-4; Processo: 140757/2016-3) e a

1 Fundação de Amparo e Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig) (PACCSS/PPGCS - 2009–2012) pelo apoio
2 financeiro e pela concessão de bolsas de estudo. Essa pesquisa é associada ao Instituto Nacional de Ciência e
3 Tecnologia (Biodiversidade do Solo/INCT-CNPq).

4 **Contribuição dos autores** Conceitualização: J.S.S., D.P.O., É.P.B., and F.M.S.M.; metodologia: J.S.S.,
5 D.P.O., and É.P.B.; análise formal: J.S.S., D.P.O., and M.R.; investigação: J.S.S., D.P.O., M.R., C.L.S.J.,
6 M.V.B.D.G.B., L.C.S., C.J.G.L., and P.Á.C.O.; recursos: J.S.S., and F.M.S.M.; curadoria de dados: J.S.S.,
7 and D.P.O.; redação do rascunho original: J.S.S.; redação: revisão e edição: J.S.S., D.P.O., M.R., É.P.B., and
8 F.M.S.M.; visualização: J.S.S., and F.M.S.M.; supervisão: J.S.S., and F.M.S.M.; administração do projeto:
9 J.S.S., and F.M.S.M.; aquisição de financiamento: F.M.S.M.

10
11 **Conflito de interesses** O autores declaram não existir conflitos de interesses.

12 13 **Referências**

14 Alvarez V.V.H., Novais R.F., Barros N.F., Cantarutti R.B., Lopes, A.S. (1999) Interpretação dos resultados
15 das análises de solos. In Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais - 5º
16 Aproximação. Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, Viçosa, pp. 25-32

17 Amado TJC, Conceição PC, Bayer C, Eltz FLF (2007) Soil Quality Evaluated by "Soil Quality Kit" in two
18 long-term soil management experiments in Rio Grande do Sul State, Brazil. Rev Bras Ciênc Solo 31:109-
19 121. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832007000100012>

20 Ambrosano EJ, Cantarella H, Ambrosano GMB, Schammas EA, Dias FLF, Rossi F, Trivelin PCO, Muraoka
21 T, Sachs RCC, Azcón R (2011) Productivity of sugarcane after previous legumes crop. *Bragantia* 70:810-
22 818. <https://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052011000400012>

23 Ambrosano EJ, Foltran DE, Camargo MS, Rossi F, Schammas EA, Silva EC, Ambrosano GMB, Dias FLF
24 (2013) Mass and nutrient accumulation by green manures and sugarcane plant yield grown in succession, in
25 two locations of Sao Paulo, Brazil. *Rev Bras Agroecol* 8:199-209.

26 Andrade Neto RC, Miranda NO, Duda GP, Góes GB, Lima AS (2010) Growth and yield of forage sorghum
27 cv. BR 601 under green manure. *Rev Bras Eng Agríc Ambient* 14:124-130.
28 <https://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662010000200002>

- 1 Bonini SB, Alves MC (2011) Recovery of soil physical properties by green manure, liming, gypsum and
2 pasture and spontaneous native species¹. Rev Bras Ciênc Solo, 35:1397-1406.
3 <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832011000400019>
- 4 Borkert CM, Gaudêncio CA, Pereira JE, Pereira LR, Oliveira Júnior A (2003) Mineral nutrients in the shoot
5 biomass of soil cover crops. Pesqui Agrop Bras 38:143-153. [https://doi.org/10.1590/S0100-](https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003000100019)
6 [204X2003000100019](https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003000100019)
- 7 BRAZIL (2011) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 13 de 24 de
8 março de 2011. Aprova as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos
9 inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos microorganismos autorizados e
10 recomendados para produção de inoculantes no Brasil, na forma dos anexos I, II e III, desta instrução
11 normativa. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, 25 mar. 2011. Seção 1.
12 [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf)
13 [agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf). Accessed 30 July 2020
- 14 Chada SS, Polli H (1988) Nodulation of promising tropical legumes for green manuring in a phosphorus
15 deficient soil. Pesqui Agrop Bras 23:1197-1202.
- 16 CONAB (2020) Companhia Nacional de Abastecimento. Leite e derivados. [https://www.conab.gov.br/info-](https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-leite)
17 [agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-leite](https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-leite).
18 Accessed 30 June 2020
- 19 Conceição PC, Amado TJC, Mielniczuk J, Spagnollo E (2005) Soil organic matter and other attributes as
20 indicators to evaluate soil quality in conservation systems. Rev Bras Ciênc Solo 29:777-788.
21 <https://doi.org/10.1590/S0100-06832005000500013>
- 22 Costa EM, Almeida PR, Lima W, Farias TP, Moreira FMS (2017) Lima bean nodulates efficiently with
23 *Bradyrhizobium* strains isolated from diverse legume species. Symbiosis 73:125-133.
24 <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0473-8>
- 25 Döbereiner J, Baldani VLD, Baldani JI (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas
26 não-leguminosas. Embrapa SPI, Brasília
- 27 Fancelli A.L. (2015) Ecofisiologia, fenologia e implicações básicas de manejo. In: Milho do plantio a
28 colheita. Editora UFV, Viçosa, pp. 50-76

- 1 Florentino LA, Guimarães AP, Rufini M, Silva KD, Moreira FMS (2009) *Sesbania virgata* stimulates the
2 occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species *Sci Agric*
3 66:667-676. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162009000500012>
- 4 Fred EB, Waksman SA (1928) *Laboratory manual of General Microbiology: with Special Reference to the*
5 *Microorganisms of the Soil*. McGraw-Hill, New York
- 6 Giller KE (2001) *Nitrogen fixation in tropical cropping systems*. Cabi, London
- 7 Guimarães AA, Florentino LA, Almeida KA, Lebbe L, Silva KB, Willems A, Moreira FMS (2015) High
8 diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from several legume species and land uses in Brazilian tropical
9 ecosystems. *Syst Appl Microbiol* 386:433–441. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.06.006>
- 10 Guimarães AA, Jaramillo PMD, Nóbrega RSA, Florentino LA, Silva KB, Moreira FMS (2012) Genetic and
11 symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the Western Amazon by
12 using cowpea as the trap plant. *Appl Environ Microbiol* 78:6726-6733. [https://doi.org/10.1128/AEM.01303-](https://doi.org/10.1128/AEM.01303-12)
13 [12](https://doi.org/10.1128/AEM.01303-12)
- 14 Hernani L.C., Padovan M.P. (2014) Adubação verde na recuperação de solos degradados. In: *Adubação*
15 *verde e plantas de cobertura no Brasil - fundamentos e prática v. 1*. Embrapa, Brasília, pp. 371-398
- 16 Malavolta E, Vitti GC, Oliveira SA (1989) *Evaluation of the nutritional state of plants: principles and*
17 *applications*. POTAFOS, Piracicaba
- 18 Matheus R, Kantur D, Bora N (2018) Innovation of the fallow system with the legume cover crop a season
19 for improved physical properties of soil degraded on dryland farming. *Int J Sci Technol Res* 7:107-111.
- 20 Matos ES, Mendonça ES, Cardoso IM, Lima PC, Freese D (2011) Decomposition and nutrient release of
21 leguminous plants in coffee agroforestry systems. *Rev Bras Ciênc Solo* 35:141-
22 149. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832011000100013>
- 23 Melo WMC, Pinho RGV, Pinho EVRV, Carvalho MLM, Fonseca AH (1999) Effect of split nitrogen
24 fertilization upon the performance of corn cultivars for silage production. *Ciênc Agrotec* 23:608-616.
- 25 Morais P.P.P., Granato I.S.C., Neto R. F. (2015) Milho silagem. In: *Milho do plantio a colheita*. Editora
26 UFV, Viçosa, pp. 224-241
- 27 Moreira FMS, Siqueira JO (2006) *Microbiologia e Bioquímica do solo*. Editora UFLA, Lavras

- 1 Okito A, Alves BJR, Urquiaga S, Boddey RM (2004) Nitrogen fixation by groundnut and velvet bean and
2 residual benefit to a subsequent maize crop. *Pesqui Agropecu Bras* 39:1183-1190.
3 <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2004001200004>
- 4 Queiroz LR, Galvão JCC, Cruz JC, Oliveira MF, Tardin FD (2010) Weed Suppression and Organic Green
5 Corn Production in No Tillage System. *Plant Daninha* 28:263-270. <https://doi.org/10.1590/S0100->
6 [83582010000200005](https://doi.org/10.1590/S0100-83582010000200005)
- 7 Rangel WM, Oliveira Longatti SM, Ferreira PA, Bonaldi DS, Guimarães AA, Thijs S, Moreira FMS (2017)
8 Leguminosae native nodulating bacteria from a gold mine As contaminated soil: Multi-resistance to trace
9 elements, and possible role in plant growth and mineral nutrition. *Int J Phytoremediat* 19:925-936.
10 <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1303812>
- 11 R Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical
12 Computing. <https://www.R-project.org/>. Accessed 30 July 2020.
- 13 Rodrigues EFG, De-Polli H, Eira PA (1994) Inoculation, liming and fertilization of *Mucuna aterrima* and
14 *Canavalia ensiformis* in a red-yellow podzolic soil. *Pesqui Agropecu Bras* 29:807-814.
- 15 Rufini M, Ferreira PAA, Soares BL, Oliveira DP, Andrade MJB, Moreira FMS (2011) Symbiosis of nitrogen
16 fixing bacteria with common bean in different pH values. *Pesqui Agropecu Bras* 46: 81-88.
- 17 Santos EAD, Dutra C, M, Ferreira L R, Reis RM, França AC, Santos JB (2010) Rhizosphere activity of soil
18 treated with herbicide during remediation process by *Stizolobium aterrimum*. *Pesqui Agropecu Trop* 40.
19 <https://dx.doi.org/10.5216/pat.v40i1.4670>
- 20 Santos ÍAFM, Junior L, Andrade M, Galdino AC, Fracetto FJC, Fracetto GGM (2017) New rhizobial strains
21 for velvet bean (*Stizolobium aterrimum*) evaluated under greenhouse and field conditions. *Ciênc Agrotecnol*
22 41:428-438. <https://doi.org/10.1590/1413-70542017414012917>
- 23 Sarruge JR, Haag HP (1979) Análises químicas em plantas. Escola Superior Agricultura Luiz de Queiroz,
24 Piracicaba
- 25 Scivittaro WB, Muraoka T, Boaretto AE, Trivelin PCO (2000) Use of nitrogen from green manure and urea
26 by corn. *Rev Bras Ciênc Solo* 24:917-926. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832000000400023>
- 27 Silva MLN, Blancaneaux P, Curi N, Lima JM, Sá JIG, Marques M, Carvalho AM (1998) Aggregates
28 stability and resistance dark-red latosol (oxisol) under corn-green manure succession. *Pesqui Agropecu Bras*,
29 33:97-103.

- 1 Souto KM, Jacques RJS, Avila LAD, Machado SLDO, Zanella R, Refatti JP (2013) Biodegradation of the
2 herbicides imazethapyr and imazapic in rhizosphere soil of six plant species. *Ciênc Rural* 43:1790-1796.
3 <https://doi.org/10.1590/S0103-84782013001000010>
- 4 Souza S.S., Souza L.D., Carvalho J.E.B. (2014) Adubação verde na física do solo. In: Adubação verde e
5 plantas de cobertura no Brasil - fundamentos e prática vol. 1. Embrapa, Brasília, pp. 335-369
- 6 Tabaldi LA, Vieira MC, Zárate NAH, Silva LR, Gonçalves WL, Farias P, Márcio F, Anelise SN, Gassi, RP,
7 Padovan MP (2012) Cover crops and their effects on the biomass yield of *Serjania marginata* plants. *Ciênc*
8 *Rural* 42:614-620. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782012000400006>
- 9 Wutke E.B., Calegari A., Wildner L.P. (2014) Espécies de adubos verdes e plantas de cobertura e
10 recomendações para seu uso. In: Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil - fundamentos e prática v.
11 1. Embrapa, Brasília, pp. 61-167
- 12 Zaccheo PVC, Neves CSVJ, Mariano DC, Zorzenoni TO, Higashibara LR, Piccinin GG, Okumura RS
13 (2016) Green manure in fruticulture: Aspects on soil quality and use in agriculture. *Afr J Agric Res* 11:1469-
14 1474. <https://doi.org/10.5897/AJAR2015.10416>
- 15
- 16
- 17

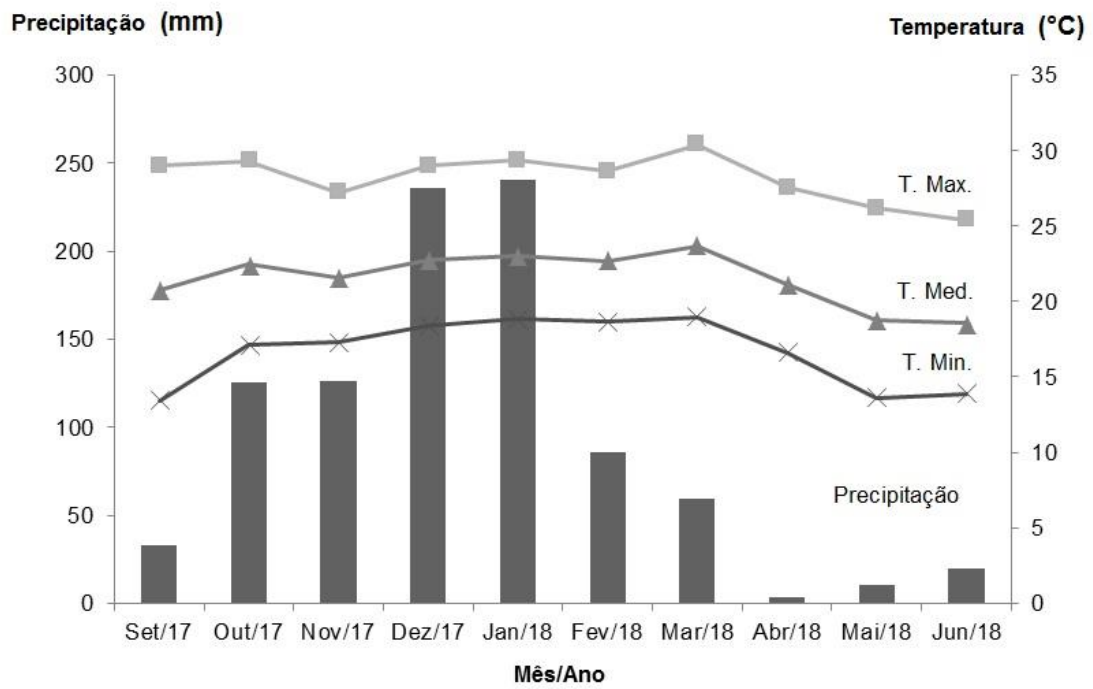


Figura 1 Gráfico de médias mensais de precipitação e temperatura durante o período de instalação dos experimentos de campo.

Tabela 1 Características químicas e físicas e classe textural de amostra de solo coletada na profundidade de 0 a 20 cm, antes da implantação dos experimentos em vasos com solo e campo.

Características¹	Unidade	Latossolo Vermelho	Latossolo Vermelho-Amarelo
pH em H ₂ O (1:2,5)	-	6,0 AM ²	5,8 AM
P (Fósforo Mehlich I)	mg dm ⁻³	28,51 MB	24,10 MB
K (Potássio Mehlich I)	mg dm ⁻³	136,85 MB	46,92 MB
Ca	cmolc dm ⁻³	2,38 M	3,7 B
Mg	cmolc dm ⁻³	0,92 B	0,6 MB
Al	cmolc dm ⁻³	0,06 MBa	0,1 MB
H + Al	cmolc dm ⁻³	2,45 Ba	4,5 M
SB	cmolc dm ⁻³	3,65 B	4,4 B
T	cmolc dm ⁻³	6,10 M	8,9 B
t	cmolc dm ⁻³	3,71 M	2,2 B
m	%	1,62 MBa	1,62 MBa
V	%	59,82 M	50,00 M
Matéria Orgânica	dag kg ⁻¹	1,88 M	3,10 M
Areia	g kg ⁻¹	520	330
Silte	g kg ⁻¹	100	80
Argila	g kg ⁻¹	380	590
Classe Textural		Argiloso	Argiloso

¹SB: Soma de bases trocáveis; t: Capacidade efetiva de trocas de cátions; T: Capacidade de troca de cátions a pH 7; m: Índice de saturação por alumínio trocável; V: Índice de saturação por bases; MO: Matéria Orgânica. ²Interpretação de acordo com Alvarez V. et al. (1999): AM=acidez média, MB=teor muito bom, B= bom, M=médio, MBa=muito baixo, Ba=baixo.

Tabela 2 Identificação das estirpes de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio Nodulíferas testadas em mucuna-preta em vasos com solo não estéril e em campo.

Código original	Identificação	Referência
BR2811 (SEMIA6158) ^{1,2,3}	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Menna et al. (2006)
UFLA05-18 ^{2,3}	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Rangel et al. (2017)
UFLA05-19 ^{2,3}	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Rangel et al. (2017)
UFLA05-20 ^{2,3}	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Rangel et al. (2017)
INPA 104 A ³	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Guimarães et al. (2015)
UFLA04-212 ³	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Florentino et al. (2009)
UFLA03-144 ³	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Guimarães et al. (2012)

¹Estirpe aprovada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA como inoculante para mucuna-preta. Estirpes utilizadas nos ensaios em vaso com solo não estéril² e em campo³.

Tabela 3 Valores médios de número (NN) e massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR), leitura indireta de clorofila (LIC), fitomassa seca (FSPA) e acúmulo de N na parte aérea (ANPA) de mucuna-preta, inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium* comparadas a controles, e cultivada em vasos com Latossolo Vermelho por 60 dias após sua semeadura.

Número de Nódulos (NN) (unidade por planta)						
Tratamento	BR 2811	CN	SN	UFLA 05-18	UFLA 05-19	UFLA 05-20
BR 2811	34,75					
CN	ns	7,75				
SN	ns	ns	16,63			
UFLA 05-18	**	**	**	108,13		
UFLA 05-19	**	**	**	---	76,38	
UFLA 05-20	ns	**	**	---	---	58,38
Coeficiente de Variação (%) =31,42						
Massa Seca de Nódulos (MSN)^a (g planta⁻¹)						
Tratamento	BR 2811	CN	SN	UFLA 05-18	UFLA 05-19	UFLA 05-20
BR 2811	2,00					
CN	ns	1,18				
SN	ns	ns	2,20			
UFLA 05-18	ns	ns	ns	1,15		
UFLA 05-19	ns	ns	ns	---	2,16	
UFLA 05-20	ns	ns	ns	---	---	0,75
Coeficiente de Variação (%) =25,37						
Massa Seca de Raiz (MSR) (g planta⁻¹)						
Tratamento	BR 2811	CN	SN	UFLA 05-18	UFLA 05-19	UFLA 05-20
BR 2811	7,52					
CN	ns	8,49				
SN	ns	ns	9,34			
UFLA 05-18	ns	ns	ns	7,80		
UFLA 05-19	ns	ns	ns	---	9,84	
UFLA 05-20	ns	ns	ns	---	---	8,86
Coeficiente de Variação (%) =20,04						
Leitura Indireta de Clorofila (LIC)						
Tratamento	BR 2811	CN	SN	UFLA 05-18	UFLA 05-19	UFLA 05-20
BR 2811	40,60					
CN	ns	40,45				
SN	ns	ns	41,69			
UFLA 05-18	**	**	ns	46,86		
UFLA 05-19	ns	ns	ns	---	45,26	
UFLA 05-20	**	**	*	---	---	47,16
Coeficiente de Variação (%) =7,58						

Fitomassa Seca da Parte Aérea (FSPA) (g planta⁻¹)						
Tratamento	BR 2811	CN	SN	UFLA 05-18	UFLA 05-19	UFLA 05-20
BR 2811	11,80					
CN	**	16,80				
SN	ns	**	13,10			
UFLA 05-18	**	ns	ns	14,96		
UFLA 05-19	ns	**	ns	---	13,01	
UFLA 05-20	ns	**	ns	---	---	11,98
Coeficiente de Variação (%) = 11,29						
Acúmulo de Nitrogênio na Parte Aérea (ANPA) (mg planta⁻¹)						
Tratamento	BR 2811	CN	SN	UFLA 05-18	UFLA 05-19	UFLA 05-20
BR 2811	339,18					
CN	**	510,64				
SN	ns	**	267,41			
UFLA 05-18	ns	**	ns	292,45		
UFLA 05-19	ns	ns	**	---	431,74	
UFLA 05-20	ns	**	ns	---	---	348,54
Coeficiente de Variação (%) = 14,56						

Tratamentos comparados aos controles não-inoculados [sem (SN) e com 300 mg NH₄NO₃ dm⁻³ (CN)] e ao controle inoculado com a estirpe BR2811, por meio do teste de Dunnet (p<0.5 ou p<0.10). Os controles experimentais também foram comparados entre si. Ns: Não significativo. ** e *: Significativo aos níveis de 5 e 10% de significância, respectivamente. ■Dados transformados em (y+0,5)^{0,5}.

Tabela 4 Valores médios de número (NN) e massa seca de nódulos (MSN), leitura indireta de clorofila (LIC), massa seca de raiz (MSR) e fitomassa seca da parte aérea (FSPA) de mucuna-preta, inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* comparadas a controles, e cultivada em vasos com Latossolo Vermelho por 100 dias após sua semeadura.

Número de Nódulos (NN) (unidade por planta)						
Tratamento	BR 2811	CN	SN	UFLA 05-18	UFLA 05-19	UFLA 05-20
BR 2811	36,50					
CN	ns	23,00				
SN	ns	ns	17,88			
UFLA 05-18	ns	**	**	61,13		
UFLA 05-19	**	**	**	---	76,88	
UFLA 05-20	**	**	**	---	---	90,25
Coeficiente de Variação (%) = 30,75						
Massa Seca de Nódulos (MSN)^a (g planta ⁻¹)						
Tratamento	BR 2811	CN	SN	UFLA 05-18	UFLA 05-19	UFLA 05-20
BR 2811	4,97					
CN	ns	3,87				
SN	ns	ns	5,88			
UFLA 05-18	ns	ns	ns	4,37		
UFLA 05-19	ns	ns	ns	---	2,66	
UFLA 05-20	ns	ns	ns	---	---	3,392
Coeficiente de Variação (%) = 18,27						
Massa Seca de Raiz (MSR) (g planta ⁻¹)						
Tratamento	BR 2811	CN	SN	UFLA 05-18	UFLA 05-19	UFLA 05-20
BR 2811	31,38					
CN	ns	37,27				
SN	ns	ns	25,87			
UFLA 05-18	ns	ns	ns	22,42		
UFLA 05-19	ns	ns	ns	---	34,50	
UFLA 05-20	ns	ns	ns	---	---	36,21
Coeficiente de Variação (%) = 40,40						
Leitura Indireta de Clorofila (LIC)						
Tratamento	BR 2811	CN	SN	UFLA 05-18	UFLA 05-19	UFLA 05-20
BR 2811	38,43					
CN	ns	33,55				
SN	ns	ns	33,65			
UFLA 05-18	ns	*	*	41,80		
UFLA 05-19	ns	ns	ns	---	39,00	
UFLA 05-20	ns	ns	ns	---	---	38,08
Coeficiente de Variação (%) = 10,16						
Fitomassa Seca da Parte Aérea (FSPA)						

(g planta ⁻¹)						
Tratamento	BR 2811	CN	SN	UFLA 05-18	UFLA 05-19	UFLA 05-20
BR 2811	26,44					
CN	ns	41,64				
SN	ns	ns	25,26			
UFLA 05-18	ns	ns	ns	42,54		
UFLA 05-19	*	ns	**	---	45,72	
UFLA 05-20	ns	ns	ns	---	---	32,26

Coeficiente de Variação (%) = 26,75

Tratamentos comparados aos controles não-inoculados [sem (SN) e com 300 mg NH₄NO₃ dm⁻³ (CN)] e ao controle inoculado com a estirpe BR2811, por meio do teste de Dunnet (p<0.5 ou p<0.10). Os controles experimentais também foram comparados entre si. Ns: Não significativo. ** e *: Significativo aos níveis de 5 e 10% de significância, respectivamente. ■Dados transformados em (y+0,5)^{0,5}.

Coeficiente de Variação (%) = 26,13

Acúmulo de Nitrogênio na Parte Aérea (ANPA)									
(kg ha ⁻¹)									
Tratamento	BR 2811	CN	SN	INPA 104A	UFLA03-144	UFLA 04212	UFLA 05-18	UFLA 05-19	UFLA 05-20
BR 2811	314,35								
CN	ns	279,61							
SN	ns	ns	203,14						
INPA 104A	ns	ns	ns	225,31					
UFLA03-144	ns	ns	ns	---	289,96				
UFLA 04-212	ns	ns	ns	---	---	176,31			
UFLA 05-18	*	**	**	---	---	---	496,19		
UFLA 05-19	ns	ns	ns	---	---	---	---	289,49	
UFLA 05-20	ns	ns	*	---	---	---	---	---	386,36

Coeficiente de Variação (%) = 32,56

Tratamentos comparados aos controles não-inoculados [sem (SN) e com 70 kg N-ureia ha⁻¹ (CN)] e ao controle inoculado com a estirpe BR2811, por meio do teste de Dunnet ($p < 0.5$ ou $p < 0.10$). Os controles experimentais também foram comparados entre si. Ns: Não significativo. ** e *: Significativo aos níveis de 5 e 10% de significância, respectivamente. Dados transformados em $(y+0,5)^{0,5}$ e $\log(y)$.

Tabela 6 Valores médios de número (NN), massa seca de nódulos (MSN), fitomassa seca da parte aérea (FSPA) de plantas de mucuna-preta, inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium* comparadas a controles, e coletadas aos 80 DAS em um Latossolo Vermelho Amarelo.

Número de nódulos (NN)[■]									
(unidade por planta)									
Tratamento	BR 2811	CN	SN	INPA 104A	UFLA 03-144	UFLA 04-212	UFLA 05-18	UFLA 05-19	UFLA 05-20
BR 2811	5,63								
CN	ns	2,6 3							
SN	ns	ns	3,2 1						
INPA104A	ns	ns	ns	6,75					
UFLA 03-144	ns	ns	ns	---	1,25				
UFLA 04-212	ns	ns	ns	---	---	4,88			
UFLA 05-18	*	**	**	---	---	---	36,13		
UFLA 05-19	**	**	**	---	---	---	---	46,38	
UFLA 05-20	ns	**	**	---	---	---	---	---	24,25
Coeficiente de variação (%) = 50,7									
Massa seca de nódulos (MSN)									
(g.planta⁻¹)									
Tratamento	BR 2811	CN	SN	INPA 104A	UFLA 03-144	UFLA 04-212	UFLA 05-18	UFLA 05-19	UFLA 05-20
BR 2811	1,33								
CN	ns	0,8							
SN	ns	ns	1,0 0						
INPA 104A	ns	ns	ns	1,50					
UFLA 03-144	ns	ns	ns	---	0,44				
UFLA 04-212	ns	ns	ns	---	---	0,47			
UFLA 05-18	ns	ns	ns	---	---	---	2,54		
UFLA 05-19	ns	ns	ns	---	---	---	---	2,54	
UFLA 05-20	ns	ns	ns	---	---	---	---	---	2,43
CV% = 79,63									
Fitomassa seca de parte aérea (FSPA)									
(g.planta⁻¹)									
Tratamento	BR 2811	CN	SN	INPA 104A	UFLA 03-144	UFLA 04-212	UFLA 05-18	UFLA 05-19	UFLA 05-20
BR 2811	53,30								
CN	ns	44, 32							
SN	ns	ns	42, 94						
INPA104A	ns	ns	ns	31,11					
UFLA 03-144	ns	ns	ns	---	33,75				
UFLA 04-212	ns	ns	ns	---	---	49,44			
UFLA 05-18	ns	ns	ns	---	---	---	34,02		
UFLA 05-19	ns	**	**	---	---	---	---	88,60	

UFLA 05-20	ns	ns	ns	---	---	---	---	---	29,31
------------	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-------

CV%= 43,03

Os tratamentos foram comparados através de contrastes (Dunnet) contra os controles CN, SN e BR 2811. Os controles também foram comparados entre si.

CN= Tratamento não inoculado e adubado com 70 kg ha⁻¹ de N-ureia (½ na semeadura e ½ na cobertura, aos 35 dias após a emergência); SN= testemunha sem inoculação e sem adubação nitrogenada;

■Dados transformados para \sqrt{y} ; **significativo a 5% de probabilidade; *significativo a 10% de probabilidade; Ns: não significativo;

Cv% = Coeficiente de variação, em %

Tabela 7 Valores médios de leitura indireta de clorofila do milho (LIC-Mi) no estágio VT e em R3/R4, de altura das plantas (AP), produtividade, teor de proteína bruta (TPB-MS) e acúmulo de N da parte aérea do milho silagem (ANPA-MS) cultivado sob palhada de mucuna-preta inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium* comparadas a controles, em campo, em um Latossolo Vermelho-Amarelo de Lavras-MG.

Leitura indireta de clorofila no milho (LIC-Mi)													
Tratamento	P+A+C	P+A	P+A+1/2C	POUSIO	M+UFLA03-144+A	M+UFLA04-212+A	M+UFLA05-18+A	M+UFLA05-19+A	M+UFLA05-20+A	M+BR2811+A	M+CN+A	M+SN+A	M+INPA104A+A
P+A+C	25,50												
P+A	ns	22,50											
P+A+1/2C	ns	ns	24,60										
POUSIO	**	*	**	18,02									
M+UFLA03-144+A	ns	ns	ns	**	26,32								
M+UFLA04-212+A	ns	ns	ns	**	---	25,90							
M+UFLA05-18+A	ns	ns	ns	**	---	---	25,37						
M+UFLA05-19+A	ns	*	ns	**	---	---	---	26,77					
M+UFLA05-20+A	ns	ns	ns	**	---	---	---	---	24,20				
M+BR2811+A	ns	ns	ns	**	---	---	---	---	---	25,60			
M+CN+A	ns	*	ns	**	---	---	---	---	---	---	26,70		
M+SN+A	ns	ns	ns	**	---	---	---	---	---	---	---	25,47	
M+INPA104A+A	ns	ns	ns	**	---	---	---	---	---	---	---	---	26,37
Coeficiente de Variação (%) = 8,69													
Altura das Plantas (AP) (cm)													
Tratamento	P+A+C	P+A	P+A+1/2C	POUSIO	M+UFLA03-144+A	M+UFLA04-212+A	M+UFLA05-18+A	M+UFLA05-19+A	M+UFLA05-20+A	M+BR2811+A	M+CN+A	M+SN+A	M+INPA104A+A
P+A+C	109,01												
P+A	ns	102,99											
P+A+1/2C	ns	ns	117,30										
POUSIO	ns	ns	ns	115,42									
M+UFLA03-144+A	**	**	*	**	146,65								
M+UFLA04-212+A	**	**	ns	*	---	145,00							
M+UFLA05-18+A	**	**	**	**	---	---	149,50						
M+UFLA05-19+A	**	**	*	**	---	---	---	146,80					
M+UFLA05-20+A	**	**	**	**	---	---	---	---	155,80				
M+BR2811+A	**	**	**	**	---	---	---	---	---	157,90			
M+CN+A	**	**	**	**	---	---	---	---	---	---	155,20		
M+SN+A	**	**	ns	*	---	---	---	---	---	---	---	143,30	
M+INPA104A+A	**	**	**	**	---	---	---	---	---	---	---	---	153,65
Coeficiente de Variação (%) = 10,98													

P+A	ns	64,1											
		2											
P+A+1/2C	ns	ns	62,86										
POUSIO	**	**	**	34,98									
M+UFLA03-144+A	ns	ns	ns	**	76,04								
M+UFLA04-212+A	ns	ns	ns	**	---	72,41							
M+UFLA05-18+A	ns	ns	ns	**	---	---	69,26						
M+UFLA05-19+A	ns	ns	ns	**	---	---	---	79,08					
M+UFLA05-20+A	ns	**	**	**	---	---	---	---	132,2				
M+BR2811+A	ns	ns	ns	**	---	---	---	---	---	80,54			
M+CN+A	ns	ns	ns	**	---	---	---	---	---	---	85,2		
M+SN+A	ns	ns	ns	**	---	---	---	---	---	---	---	68,0	
												6	
M+INPA104A+A	ns	ns	ns	**	---	---	---	---	---	---	---	---	80,78

Coefficiente de Variação (%) = 5,88

Tratamentos comparados por meio do teste de Dunnet ($p < 0.5$ ou $p < 0.10$) aos controles sem palhada de mucuna-preta - POUSIO: pousio sem adubação de plantio ou de cobertura; P+A: pousio com adubação de arranque e sem adubação de cobertura; P+A+1/2C: pousio com adubação de arranque e com 60 kg ha^{-1} de ureia em cobertura e P+A+C: pousio com adubação de arranque e com 120 kg ha^{-1} de ureia em cobertura. A adubação de plantio (arranque), equivalente a 300 kg ha^{-1} do fertilizante formulado 08-28-16, foi utilizada em todos os tratamentos, exceto no POUSIO. Os controles experimentais também foram comparados entre si. M = palhada de mucuna-preta cultivada com diferentes tratamentos: não-inoculados [sem (SN) e com $70 \text{ kg N-ureia ha}^{-1}$ (CN)] e inoculados (estirpes: UFLA03-144, UFLA04-212, UFLA05-18, UFLA05-19, UFLA05-20, INPA104A e BR2811). Ns: Não significativo. ** e *: Significativo aos níveis de 5 e 10% de significância, respectivamente. ■Dados transformados em $\log(y)$.

MATERIAL SUPLEMENTAR



Figura S1 Imagens de nódulos, flores e plantas de *S. aterrium*.

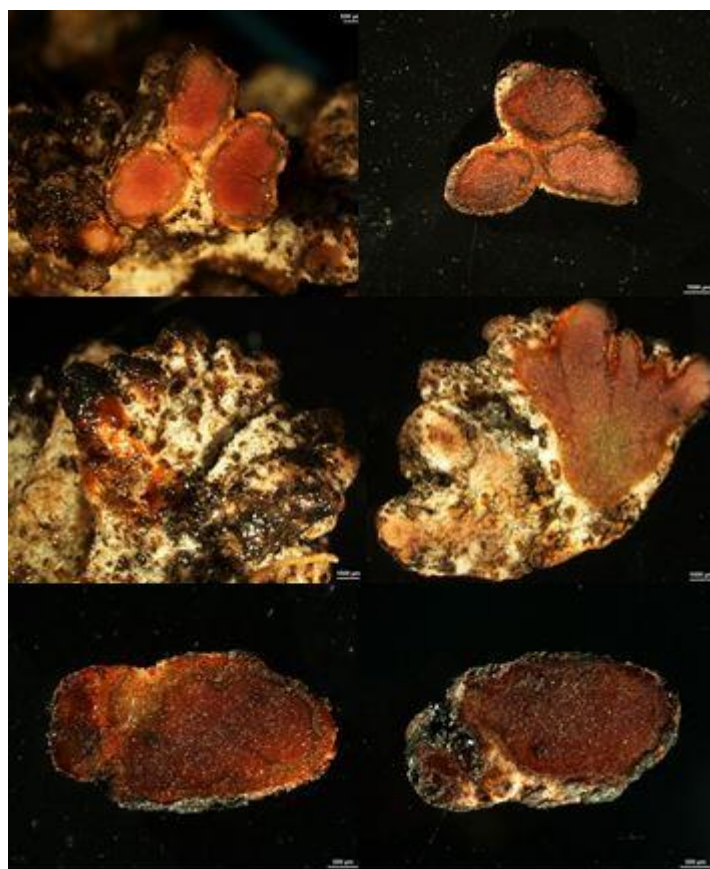


Figura S2 Imagens de cortes de nódulos de *S. aterrium* visualizados em lupa.