

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRARIAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

HELİYEMARI VALENTIM ALTHAUS

EFICIÊNCIA DAS ESTIRPES *Azospirillum brasilense* Ab-V5 E HM053 NO  
DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DE MORANGO (*Fragaria x ananassa*, DUCH.  
CV. FLORIDA FESTIVAL)

PONTA GROSSA

2023

HELYEMARI VALENTIM ALTHAUS

Eficiência das estirpes *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e HM053 no desenvolvimento e produção de morango (*Fragaria x ananassa*, Duch. cv. Florida Festival)

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agronomia como requisito para obtenção do título de Doutora em Agronomia na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Agricultura.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub

PONTA GROSSA – PR  
2023

A467 Althaus, Helyemari Valentim  
Eficiência das estirpes *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e HM053  
no desenvolvimento e produção de morango (*Fragaria x ananassa*, Duch. cv.  
Florida Festival) / Helyemari Valentim Althaus. Ponta Grossa, 2023.  
110 f.

Tese (Doutorado em Agronomia - Área de Concentração: Agricultura),  
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub.

1. Biofertilizantes. 2. Biotecnologia. 3. Rizobactérias promotoras -  
crescimento vegetal. 4. Sustentabilidade. I. Ayub, Ricardo Antonio. II.  
Universidade Estadual de Ponta Grossa. Agricultura. III.T.

CDD: 634



## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Titulo da Tese: “ESTIRPES *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* NO DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DE MORANGO”.

Nome: **Helyemari Valentim Althaus**

Orientador: **Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub**

Aprovado pela Comissão Examinadora:

**Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub**

**Profª Drª Jesiane Stefania da Silva Batista**

**Prof. Dr. Daniel Ruiz Potma Gonçalves**

**Prof. Dr. Juliano Tadeu Vilela de Resende**

**Prof. Dr. Marcos Rogério Tótola**

Ponta Grossa, 22 de novembro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Antonio Ayub, Professor(a)**, em 27/11/2023, às 16:33, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Juliano Tadeu Vilela de Resende, Usuário Externo**, em 27/11/2023, às 16:54, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **MARCOS ROGERIO TOTOLA, Usuário Externo**, em 27/11/2023, às 17:56, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Ruiz Potma Goncalves, Professor(a)**, em 28/11/2023, às 10:12, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Jesiane Stefania da Silva Batista, Professor(a)**, em 28/11/2023, às 16:56, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador 1721527 e o código CRC AED518C1.

Dedico essa tese à minha família, aos meus amigos e as minhas gatas, em especial a minha mãe e vó Rosa, vocês são a maior e melhor parte do meu mundo.

*In memoriam* a minha gata, Wicka, minha patinha amiga, depois de vivermos 17 anos juntas, eu acreditava que você viveria para sempre.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, à Nossa Senhora Aparecida pela proteção divina e aos meus Santos de devoção, Santa Rita de Cassia, São Judas Tadeu e São Francisco de Assis.

Aos meus pais, pelo amor, carinho, confiança e dedicação em minha educação. Agradeço ao meu pai por me ensinar a gostar de histórias, à minha vó por me ensinar a acreditar nelas e à minha mãe por me mostrar que eu sou capaz de torna-las reais. Agradeço em especial à minha mãe pela ajuda em todas as etapas de desenvolvimento desse trabalho, pelos dias ao sol colhendo morangos, pelas madrugadas em claro, pela paciência e companheirismo, por ser a melhor mãe do universo. Também à minha vó Rosa, pelo imenso amor, carinho e por todas as orações nos dias difíceis. E às minhas gatas Zoe e Maya, pela patinha amiga, pelo romrom reconfortante e olhar de carinho em todos os momentos. Você são as minhas melhores ouvintes. Agradeço também às minhas gatas que partiram durante esse doutorado, Molly, Kyra e Wicka, vocês fazem muita falta.

Aos meus orientadores, os professores Ricardo Ayub e Carolina Galvão, pela oportunidade de realizar essa pesquisa, pela confiança e toda disponibilidade. Ao professor Rafael Etto por, junto dos meus orientados, me orientar e participar de exaustivas reuniões e desenvolvimento desse trabalho. E, a todos os professores, mestres dedicados, que, de alguma forma passaram pela minha jornada educativa, não fosse por vocês eu não chegaria até aqui. Um agradecimento especial à professora Cristina Ayub, quem me colocou na iniciação científica e, nessa nova etapa me recebeu com o mesmo carinho e confiança, obrigada pelo seu sorriso gentil e pelos dias de café.

Aos meus amigos, que jamais deixaram de acreditar em mim, as vezes, mais que eu mesma. Em especial ao Khalyd, meu melhor amigo, irmão de alma, companheiro para todas as aventuras, agradeço por estar sempre ao meu lado, pelo incentivo, pelas brincadeiras e pelas conversas filosóficas, por ser essa pessoa tão especial. Também à Thais, minha amiga, das brincadeiras da infância a vida adulta, obrigada pelo carinho, pela presença sempre constante, obrigada por realizar meu sonho de ser madrinha, nosso Heitor, ainda tão pequeno, não entende a vida correndo ao redor dele, mas um dia ele vai compreender, que toda dedicação depositada nessa pesquisa, também é para mudar o mundo por ele. Agradeço a Grazi pela preocupação e confiança e a todos os meus amigos, a vida não teria graça sem vocês.

Aos meus colegas de laboratório, que nesses anos todos tornaram-se uma segunda família. Especialmente à Camila, que por toda nossa jornada, se tornou minha gêmea de doutorado, compartilhando as alegrias, dúvidas, tristezas e conquistas. Obrigada pelas tardes de conversa, pela ajuda com os cuidados dos morangos, pelos almoços compartilhados, que nossos

caminhos possam sempre seguir juntos. Agradeço ao Willian e à Laís por toda ajuda ‘molecular’, por discutir meus resultados, nem sempre esclarecedores e por não me deixar desanimar com eles. À Daiane, que mesmo distante nunca deixou de me apoiar. Ao Murilo, pelo esforço e trabalho com os morangueiros no campo. À Cris, Duda e ao Breno por me fazerem rir mesmo quando eu não estava bem, por compartilhar os meios de cultura e por toda parceria nesses anos. À Lígia, por me ouvir, pelos conselhos, pela ajuda no processamento das raízes dos morangueiros, por toda conversa e incentivo. Aos meus alunos de iniciação científica que me ajudaram em vários momentos.

E, por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e à PETROBRAS pelo suporte financeiro. À Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), pelo ensinamento e suporte e aos freis da Paróquia Bom Jesus por cederem um espaço para o desenvolvimento dos experimentos a campo.

Obrigada!

“Ninguém que é curioso é idiota. As pessoas que não fazem perguntas permanecem ignorantes para o resto de suas vidas.”

Neil DeGrasse Tyson

## RESUMO

ALTHAUS, H. V. **Eficiência das estirpes *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e HM053 no desenvolvimento e produção de morango (*Fragaria x ananassa*, Duch. cv. Florida Festival).** Orientador: Ricardo Antonio Ayub. Ponta Grossa, 2023. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2023.

Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (RPCV) destacam-se devido à sua capacidade em estimular o crescimento das plantas através da fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, proteção contra patógenos, solubilização de minerais, entre outros. O morango é um pequeno fruto de elevado valor comercial, apreciado mundialmente pelas suas características organolépticas e nutracêuticas, no entanto, a sua produção é intensiva e requer elevados aportes de fertilizantes nitrogenados e pesticidas. O gênero *Azospirillum* é um dos mais promissores RPCV, mas sua utilização associada a diferentes doses de nitrogênio ainda é pouco explorada no cultivo do morango em condições de campo. Para compreender o efeito do *Azospirillum* como biofertilizante na cultura do morango, foram realizados dois experimentos utilizando as estirpes de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e HM053, associadas a diferentes doses de nitrogênio. O experimento I foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, enquanto o experimento II foi conduzido em blocos inteiramente casualizados, ambos em fatorial triplo (3x4x2), em casa de vegetação e em campo, respectivamente, onde as duas estirpes foram associadas as doses de 0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg) de nitrogênio e inoculadas por aspersão foliar ou no solo, próximo as raízes. Em ambos os experimentos foram avaliadas as características de crescimento dos morangueiros, a produção e qualidade dos frutos. No experimento em casa de vegetação, observou-se que os morangueiros apresentaram respostas favoráveis quando inoculados com *A. brasilense* HM053 ou Ab-V5. A associação de HM053 com 25% ou 50% de nitrogênio proporcionou os melhores parâmetros de crescimento. Com base nos resultados obtidos no Experimento II, observou-se que os morangueiros responderam positivamente à inoculação com *A. brasilense* Ab-V5 e HM053. Os melhores resultados foram encontrados para combinação de *A. brasilense* HM053 com a aplicação das menores doses de nitrogênio. A utilização de 25% da dose recomendada de nitrogênio associada a essa estirpe levou a um aumento de aproximadamente 9,5% na produtividade dos morangueiros em comparação com as plantas sem inoculação e dose completa de nitrogênio. Em ambos os experimentos as doses de 0 a 50% de nitrogênio, associadas, principalmente a estirpe HM053, mostraram resultados promissores, indicando uma redução de 50% a 75% no uso de adubos nitrogenados. Concluindo, a substituição de parte dos fertilizantes nitrogenados necessários ao cultivo do morango por bactérias do gênero *Azospirillum* poderia reduzir os custos de produção, aumentar a produtividade e promover uma agricultura mais sustentável.

**Palavras-chave:** Biofertilizantes; Biotecnologia; Sustentabilidade; Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal;

## ABSTRACT

ALTHAUS, H. V. **Efficiency of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and HM053 on the Development and Production of Strawberry (*Fragaria x ananassa*, Duch. cv. Florida Festival)**. Advisor: Ricardo Antonio Ayub. Ponta Grossa, 2023. Thesis (Ph.D. in Agronomy) – Graduate Program in Agronomy, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2023.

Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) stand out due to their ability to stimulate plant growth through biological nitrogen fixation, production of phytohormones, protection against pathogens, mineral solubilization, among others. Strawberries are small fruits of high commercial value, globally appreciated for their organoleptic and nutraceutical characteristics, however, their production is intensive and requires high inputs of nitrogen fertilizers and pesticides. The genus *Azospirillum* is one of the most promising PGPR, but its use associated with different doses of nitrogen is still poorly explored in strawberry cultivation under field conditions. To understand the effect of *Azospirillum* as a biofertilizer in strawberry cultivation, two experiments were conducted using *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and HM053, associated with different doses of nitrogen. Experiment I was conducted in a completely randomized design, while Experiment II was conducted in completely randomized blocks, both in a triple factorial (3x4x2), in a greenhouse and in the field, respectively, where the two strains were associated with doses of 0, 25% (185 mg), 50% (370 mg), and 100% (740 mg) of nitrogen and inoculated by foliar spraying or in the soil, near the roots. In both experiments, the growth characteristics of the strawberry plants, fruit production, and quality were evaluated. In the greenhouse experiment, it was observed that the strawberry plants showed favorable responses when inoculated with *A. brasilense* HM053 or Ab-V5. The association of HM053 with 25% or 50% nitrogen provided the best growth parameters. Based on the results obtained in Experiment II, it was observed that the strawberry plants responded positively to inoculation with *A. brasilense* Ab-V5 and HM053. The best results were found for the combination of *A. brasilense* HM053 with the application of the lowest doses of nitrogen. The use of 25% of the recommended nitrogen dose associated with this strain led to an increase of approximately 9.5% in the productivity of the strawberry plants compared to non-inoculated plants and full nitrogen dose. In both experiments, doses from 0 to 50% of nitrogen, mainly associated with the HM053 strain, showed promising results, indicating a reduction of 50% to 75% in the use of nitrogen fertilizers. In conclusion, replacing part of the nitrogen fertilizers needed for strawberry cultivation with bacteria of the genus *Azospirillum* could reduce production costs, increase productivity, and promote more sustainable agriculture.

**Keywords:** Biofertilizers; Biotechnology; Sustainability; Plant growth-promoting rhizobacteria;

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** (A) Estágios de desenvolvimento do morangueiro; (B) Morangueiro da cultivar Florida Festival com aproximadamente um ano e meio; (C) Fruto do morangueiro Florida Festival. .... 18
- Figura 2:** Mecanismos diretos e indiretos de ação das rizobactérias promotoras do crescimento vegetal. .... 21
- Figura 3:** (A) Plantas matrizes de morangueiro cultivar Florida Festival entregues pela empresa Multiplanta Tecnologia Vegetal; (B) Inoculação no solo, próximo as raízes; (C) Inoculação por aspersão foliar. .... 29
- Figura 4:** Implementação do canteiro na Paróquia Bom Jesus; (A) montagem do canteiro e instalação da linha de irrigação; (B) Cobertura do canteiro com lona coextrusada dupla face; (C) Cortes em forma de cruz para transplântio das mudas; (D) Morangueiros 30 dias. .... 31
- Figura 5:** Croqui do experimento em casa de vegetação..... 32
- Figura 6:** Croqui simplificado do experimento realizado no campo..... 33
- Figura 7:** Diagrama de cromaticidade do espaço de cor Cie L\*C\*H..... 35
- Figura 8:** Titulometria com NaOH indicando a coloração do suco de morango antes (esquerda) e após (direita) o ponto de viragem do indicador fenolftaleína..... 36
- Figura 9:** Curva analítica do ensaio de Folin-Ciocalteu para determinação do teor de compostos fenólicos totais em amostras de frutos de morango. .... 37
- Figura 10:** Curva analítica do ensaio de sequestro do radical ABTS+ para determinação da atividade antioxidante em amostras de frutos de morango. .... 38
- Figure 11:** Shoot length (A) and number of leaves (B) of strawberries inoculated with *Azospirillum brasilense* Ab-V5, *Azospirillum brasilense* HM053 and without inoculation (W/I). .... 45
- Figura 12:** Altura em centímetros (A) e Número de folhas por planta (B) dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), na safra de 2021..... 61
- Figura 13:** Altura em centímetros dos morangueiros inoculadas com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), ao final da safra de 2022. .... 63
- Figura 14:** Número de folhas dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes

|  |    |
|--|----|
| doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), ao final da safra de 2022.....  | 64 |
| <b>Figura 15:</b> Massa seca (A) e massa fresca (B) da parte aérea (g) dos morangueiros inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, ou <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)). .....   | 65 |
| <b>Figura 16:</b> Comprimento das raízes (cm) dos morangueiros inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, ou <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg))......   | 66 |
| <b>Figura 17:</b> Efeito das diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) na massa fresca (g) (A) e massa seca (g) (B) das raízes dos morangueiros inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, ou <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 eou sem inoculação (S/I), em duas formas de inoculação (aspersão foliar e no solo, próximo as raízes). ..... | 68 |
| <b>Figura 18:</b> Biomassa total (g) dos morangueiros inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, ou <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg))......  | 69 |
| <b>Figura 19:</b> Média do número de frutos por planta (A), peso médio dos frutos (g) (B) e produtividade (t.ha) (C) obtidos nos morangueiros inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, ou <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), na safra de 2021. ....        | 71 |
| <b>Figura 20:</b> Média do número de frutos por planta (A), peso médio dos frutos (g) (B) e produtividade (t.ha) (C) dos morangueiros inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, ou <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), na safra de 2022. ....                | 73 |
| <b>Figura 21:</b> Ângulo de tonalidade (°hue) (A), saturação de cor (Croma) (B) e luminosidade (C) dos frutos de morangueiros inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, ou <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) na safra de 2021....                           | 75 |
| <b>Figura 22:</b> Ângulo de tonalidade (°hue) (A), saturação de cor (Croma) (B) e luminosidade (C) dos frutos dos morangueiros inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, ou <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) na safra de 2022....                          | 77 |
| <b>Figura 23:</b> Teor de sólidos solúveis (°Brix) dos frutos dos morangueiros inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, ou <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 ou sem inoculação  |    |

|  |    |
|--|----|
| (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) na safra de 2021. ....  | 79 |
| <b>Figura 24:</b> Efeito das diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) na acidez titulável (% ácido cítrico) (A) e relação sólidos solúveis/acidez titulável (SS/AT) (B) dos frutos dos morangueiros inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, ou <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 ou sem inoculação (S/I), aplicados por aspersão foliar ou no solo, na safra de 2021. .... | 81 |
| <b>Figura 25:</b> Teor de sólidos solúveis (°Brix) dos frutos dos morangueiros inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, ou <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) na safra de 2022. ....  | 82 |
| <b>Figura 26:</b> Efeito das diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) na acidez titulável (% ácido cítrico) (A) e relação sólidos solúveis/acidez titulável (SS/AT) (B) dos frutos dos morangueiros inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, ou <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 ou sem inoculação (S/I), aplicados por aspersão foliar ou no solo, na safra de 2022. .... | 84 |
| <b>Figura 27:</b> Efeito das diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) no teor de Compostos fenólicos (mg de ácido gálico equivalente. 100 g de massa fresca) dos frutos dos morangueiros inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, ou <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 ou sem inoculação (S/I), aplicados por aspersão foliar ou no solo, na safra de 2021. ....            | 86 |
| <b>Figura 28:</b> Teor de Antocianinas (mg.100g de peso fresco) dos frutos dos morangueiros inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, ou <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), na safra de 2021. ....  | 87 |
| <b>Figura 29:</b> Efeito das diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) na atividade antioxidante (AAO) em relação ao radical DPPH nos frutos dos morangueiros inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, ou <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 ou sem inoculação (S/I), aplicados por aspersão foliar ou no solo, na safra de 2021. ....  | 88 |
| <b>Figura 30:</b> Efeito das diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) no Teor de Antocianinas (mg.100 g de peso fresco) dos frutos dos morangueiros inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, ou <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 ou sem inoculação (S/I), aplicados por aspersão foliar ou no solo, na safra de 2022. ....   | 90 |
| <b>Figura 31:</b> Efeito das diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) na atividade antioxidante (AAO) em relação ao radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) dos frutos dos morangueiros inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, ou <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 ou sem inoculação (S/I), aplicados por aspersão foliar ou no solo, na safra de 2022. ....         | 91 |

**Figura 32:** Atividade antioxidante (AAO) em relação ao radical ABTS+ (2,2'-azinobis-3-  
etilbenzoatiazolina-6-ácido sulfônico) dos frutos dos morangueiros inoculados com  
*Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação  
(S/D), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e  
100% (740, mg)), na safra de 2022. .... 92

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Table 1:</b> Chemical properties of the soil collected at Capão da Onça Farm School (FESCON, UEPG).....   | 43 |
| <b>Table 2:</b> Experimental treatments applied, strains, nitrogen concentration, and inoculation method.....  | 43 |
| <b>Table 3:</b> Fresh weight (A) and dry weight (B) of the strawberries inoculated with <i>Azospirillum brasilense</i> strains Ab-V5 and HM053 by leaf aspersion or in the soil, and strawberries without inoculation (W/I), associated with four different nitrogen doses.....  | 46 |
| <b>Table 4:</b> Root length of strawberries inoculated by leaf aspersion or in the soil with <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 or without inoculation (W/I), associated with four different nitrogen concentrations. ....   | 47 |
| <b>Table 5:</b> Total biomass of strawberries inoculated by leaf aspersion or in the soil with <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 or without inoculation (w/i), associated with four different nitrogen concentrations. ....   | 48 |
| <b>Tabela 6:</b> Propriedades químicas do solo da paróquia Bom Jesus, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. ....   | 55 |
| <b>Tabela 7:</b> Tratamentos aplicados, estirpes utilizadas, concentração de nitrogênio e forma de inoculação dos microrganismos.....  | 56 |
| <b>Tabela 8:</b> Interação entre os microrganismos inoculados e a forma de aplicação na altura dos morangueiros ao final da safra de 2022.....   | 63 |
| <b>Tabela 9:</b> Massa fresca (g) (A) e Massa seca (g) (B) das raízes dos morangueiros inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, ou <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 e sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) em duas formas de inoculação (aspersão foliar e no solo, próximo as raízes). ....  | 67 |
| <b>Tabela 10:</b> Acidez titulável (% ácido cítrico) (A) e relação sólidos solúveis/acidez titulável (SS/AT) (B) dos frutos dos morangueiros inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, ou <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), em duas formas de inoculação (aspersão foliar e no solo, próximo a raiz), na safra de 2021. .... | 80 |
| <b>Tabela 11:</b> Acidez titulável (% de ácido cítrico) (A) e relação sólidos solúveis/acidez titulável (SS/AT) (B) dos frutos dos morangueiros inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, ou <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), em duas formas de aplicação, na safra de 2022. ....   | 83 |
| <b>Tabela 12:</b> Teor de Compostos Fenólicos (mg ácido gálico equivalente.100g de massa fresca) nos frutos de morangueiros inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, ou  |    |

*Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), em duas formas de inoculação (foliar e no solo), na safra de 2021. .... 85

**Tabela 13:** Atividade antioxidante (AAO) referente ao consumo do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) nos frutos de morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), em duas formas de inoculação (foliar e no solo), na safra de 2021..... 88

**Tabela 14:** Teor de Antocianinas (mg.100 g de peso fresco) dos frutos dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), aplicados por aspersão foliar ou no solo, na safra de 2022. .... 89

**Tabela 15:** Atividade antioxidante (AAO) em relação ao radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) dos frutos dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), aplicados por aspersão foliar ou no solo, na safra de 2022. .... 91

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>   | <b>17</b> |
| <b>2. METODOLOGIA GERAL .....</b>  | <b>28</b> |
| <b>2.1 Material microbiológico .....</b>   | <b>28</b> |
| <b>2.2 Material vegetal .....</b>  | <b>29</b> |
| 2.2.1 ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO .....  | 29        |
| 2.2.2. ENSAIO EM CAMPO .....   | 30        |
| <b>2.3 Desenho experimental .....</b>  | <b>31</b> |
| 2.3.1 CASA DE VEGETAÇÃO .....  | 31        |
| 2.3.2. CAMPO .....   | 32        |
| <b>2.4. Parâmetros biométricos .....</b>   | <b>33</b> |
| <b>2.5. Análises dos frutos .....</b>  | <b>34</b> |
| 2.5.1. SÓLIDOS SOLÚVEIS, ACIDEZ TITULÁVEL E pH.....  | 35        |
| 2.5.2 COMPOSTOS FENÓLICOS, ANTOCIANINAS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE .....  | 36        |
| <b>2.6. Análises estatísticas .....</b>  | <b>39</b> |
| <b>3. ARTIGOS.....</b>   | <b>40</b> |
| <b>3.1. The ammonium excreting <i>Azospirillum brasilense</i> strain HM053 enhances the vegetative development of strawberry .....</b> | <b>40</b> |
| ABSTRACT .....   | 40        |
| 3.1.1. INTRODUCTION .....  | 40        |
| 3.1.2. MATERIAL AND METHODS.....   | 42        |
| 3.1.2.1. <i>Bacterial Culture and Plant Material</i> .....   | 42        |
| 3.1.2.2. <i>Experimental Design</i> .....  | 43        |
| 3.1.2.3 <i>Biometric Parameters</i> .....  | 44        |
| 3.1.2.4 <i>Statistical Analysis</i> .....  | 44        |
| 3.1.3 RESULTS .....  | 44        |
| 3.1.3.1 <i>Number of Leaves and Shoot Length</i> .....   | 44        |
| 3.1.3.2. <i>Dry Weight and Fresh Weight</i> .....  | 46        |
| 3.1.3.3 <i>Root Length, Fresh and Dry Weights</i> .....  | 47        |
| 3.1.3.4 <i>Total Biomass</i> .....   | 47        |
| 3.1.4 DISCUSSION.....  | 48        |
| 3.1.5 CONCLUSION .....   | 51        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>3.2 O mutante funcional <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 promove o desenvolvimento de morangueiros e aumenta a produtividade e qualidade de frutos de morango .....</b> | <b>52</b>  |
| RESUMO.....  | 52         |
| ABSTRACT.....  | 52         |
| 3.2.1 INTRODUÇÃO.....  | 53         |
| 3.2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....  | 55         |
| 3.2.2.1 <i>Material Vegetal</i> .....  | 55         |
| 3.2.2.2 <i>Inóculo Bacteriano</i> .....  | 55         |
| 3.2.2.3 <i>Desenho Experimental</i> .....  | 56         |
| 3.2.2.4 <i>Avaliação dos Parâmetros Biométricos das Plantas</i> .....  | 57         |
| 3.2.2.5 <i>Análises Físico Químicas do Fruto</i> .....   | 57         |
| 3.2.2.5.1 <i>Sólidos solúveis (SS), acidez titulável e pH</i> .....  | 58         |
| 3.2.2.5.2 <i>Compostos fenólicos, antocianinas e capacidade antioxidante</i> .....   | 58         |
| 3.2.2.6 <i>Análises Estatísticas</i> .....   | 60         |
| 3.2.3 RESULTADOS .....   | 60         |
| 3.2.3.1 <i>Parâmetros Biométricos das Plantas</i> .....  | 60         |
| 3.2.3.2 <i>Análises Físico Químicas dos Frutos</i> .....   | 70         |
| 3.2.3.2.1 <i>Sólidos solúveis (SS), acidez titulável (AT), pH e relação sólidos soluveis/ acidez titulável (SS/AT)</i> .....   | 79         |
| 3.2.3.2.2 <i>Compostos fenólicos, antocianinas e capacidade antioxidante</i> .....   | 85         |
| 3.2.4 DISCUSSÃO.....   | 92         |
| 3.2.5 CONCLUSÃO.....   | 100        |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>101</b> |

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O morangueiro (*Fragaria x ananassa*, Duch.) pertence à família Rosaceae, subfamília *Maloideae*. É uma pequena planta herbácea, perene, cultivada de forma anual, podendo ser rasteira ou ereta, formando pequenas touceiras. O sistema radicular é fasciculado com raízes longas, fibrosas e superficiais (de Andrade *et al.*, 2019; Richardson *et al.*, 2022). Sua produção data de meados do século XVII onde surgiu da hibridação entre as espécies *Fragaria virginiana* Duch., uma espécie silvestre de morango, nativa da Virgínia, América do Norte e *Fragaria chilonensis* (L.) Duch., uma espécie de morango que era cultivada no Chile (Chandramohan Reddy; Goyal, 2020).

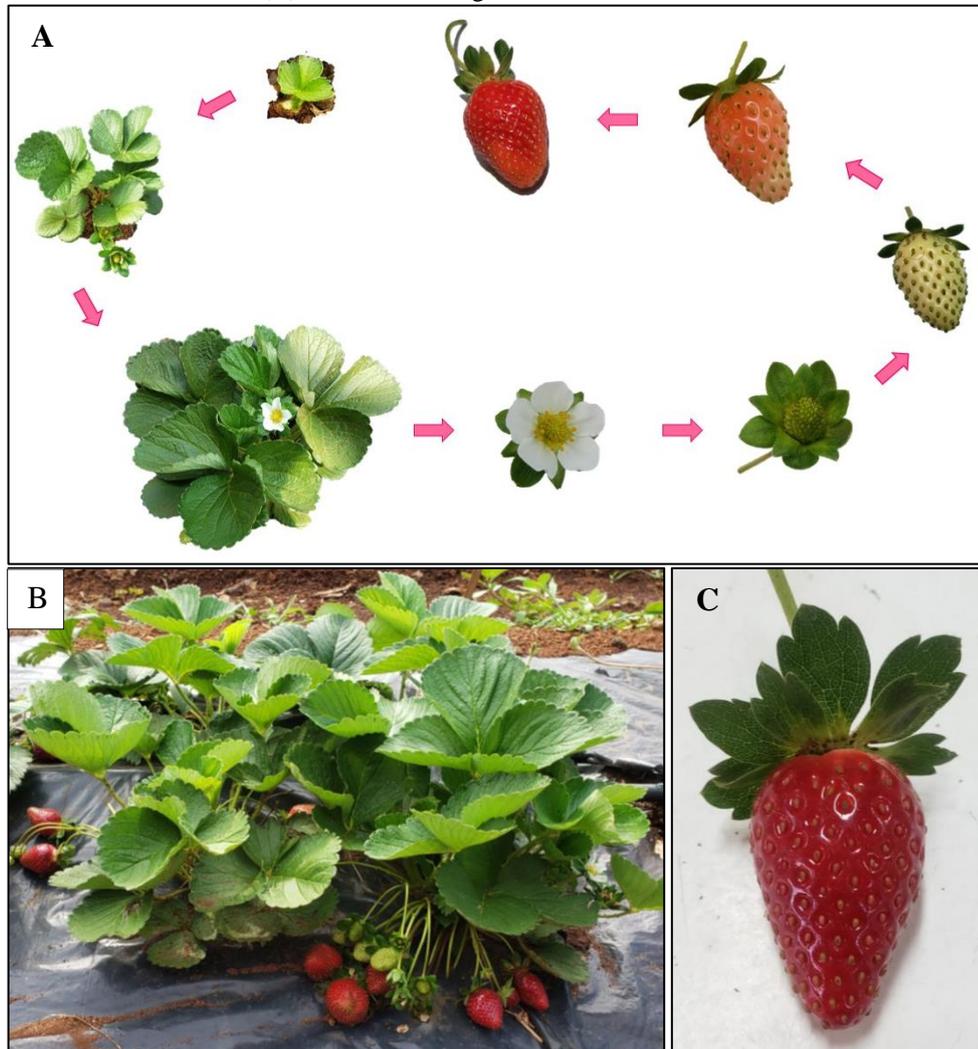
As flores do morangueiro são, em sua maioria, hermafroditas, apresentando estames em número superior a 20, localizados ao redor do receptáculo floral, e numerosos pistilos (200 a 400); cada pistilo possui um ovário que abriga apenas um óvulo (Antunes *et al.*, 2016). Os frutos verdadeiros do morangueiro são secos, marrom-avermelhados e chamados de aquênios, enquanto sua porção carnosa e comestível se trata do receptáculo floral desenvolvido, constituindo um pseudofruto ou infrutescência (Song *et al.*, 2009) (Figura 1A).

A cultivar Florida Festival foi desenvolvida na Universidade da Florida (1995) pelo cruzamento entre as cultivares ‘Rosa Linda’ e ‘Oso Grande’. Caracterizada como uma cultivar de dia curto, apresenta plantas vigorosas, resistentes a períodos de chuva inúmeras doenças, frutos de formato cônico, coloração vermelha intensa e brilhante, textura firme (~10,7 Newtons), elevada produtividade e excelente sabor (Figuras 1B e 1C) (Chandler *et al.*, 2000).

O morango é considerado a principal espécie de interesse econômico entre os pequenos frutos (de Andrade *et al.*, 2019; Chiomento *et al.*, 2021; Martins de Lima *et al.*, 2021), com uma produção de aproximadamente 9,17 milhões de toneladas em 389,6 mil hectares cultivados mundialmente em 2021 (FAOSTAT, 2021). Os frutos são apreciados devido suas características organolépticas únicas e propriedades nutracêuticas, como a presença de agentes antioxidantes (flavonoides, carotenoides e antocianinas), compostos fenólicos, vitaminas (A, E, K, B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub> e, principalmente, C) fibras e açúcares, sendo esses compostos essenciais para melhorar a saúde cardiovascular, aumentar a sensibilidade à insulina, combater lesões celulares induzidas por espécies reativas de oxigênio e fortalecer o sistema imunológico (Huang *et al.*, 2012; Pii *et al.*, 2017; Flores-Félix *et al.*, 2018; Morais *et al.*, 2019; Chandramohan Reddy; Goyal, 2020; Agehara; Nunes, 2021; Richardson *et al.*, 2022). A presença de compostos fenólicos como o ácido elágico e flavonoides como a quercetina são capazes de promover

atividade anticâncer, suprimindo o crescimento de células cancerígenas orais, de cólon, de mama e de próstata (Nemzer *et al.*, 2021).

**Figura 1:** (A) Estágios de desenvolvimento do morangueiro; (B) Morangueiro da cultivar Florida Festival com aproximadamente um ano e meio; (C) Fruto do morangueiro Florida Festival.



Fonte: a autora

O cultivo do morangueiro, na maioria dos locais, é realizado de forma intensiva e requer altos aportes de adubos nitrogenados e agroquímicos em diversas etapas do seu ciclo biológico, o que eleva o custo de produção (Lovaisa *et al.*, 2015; de Andrade *et al.*, 2019). Embora os fertilizantes químicos sejam benéficos para aumentar o rendimento das culturas, seu uso intensivo pode causar severos impactos ao ambiente, como a contaminação das águas subterrâneas, degradação da qualidade do solo, redução da biodiversidade, bioacumulação e biomagnificação de diversos compostos tóxicos, afetando também a qualidade da saúde humana (Zhang *et al.*, 2010; Ramakrishna *et al.*, 2019; Pathânia *et al.*, 2020; Agehara; Nunes, 2021; Daniel *et al.*, 2022).

A conversão do nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) em amônia ( $NH_3$ ) é um dos processos químicos mais importantes para as aéreas industriais e biológicas. A principal rota industrial para produção de amônia é o processo Haber-Bosch, a partir da reação do nitrogênio atmosférico com o hidrogênio ( $H_2$ ). O hidrogênio é obtido, principalmente, por um processo de reforma a vapor do metano, onde o metano reage com vapor d'água em temperaturas elevadas e forma hidrogênio ( $H_2$ ) e dióxido de carbono ( $CO_2$ ). Uma opção ambientalmente mais limpa é a eletrólise da água alimentada por energias renováveis, como a eólica e a solar, nesse processo ocorre a decomposição química da água em oxigênio ( $O_2$ ) e hidrogênio ( $H_2$ ) através da aplicação de uma corrente elétrica (Tanabe; Nishibayashi, 2013; Bicer; Khalid, 2020).

Estima-se que sejam gastos 1,6 toneladas de água para produção de 1 tonelada de amônia por meio da eletrólise da água, enquanto a reforma a vapor do metano, juntamente com o processo Haber-Bosch, utiliza 0,66 toneladas de água,  $30 \times 10^9$  joules de energia e produz, durante todo seu ciclo de vida, 9 a 10 toneladas de  $CO_2$  equivalente por tonelada de amônia produzida (Ghavam *et al.*, 2021).

Aproximadamente 89% da amônia produzida mundialmente é utilizada como produto químico intermediário na produção de fertilizantes como a uréia (Ghavam *et al.*, 2021). A ureia ( $CON_2H_4$ ) é o fertilizante sólido com maior teor de nitrogênio disponível (46%), não deixa resíduos de sal no solo e também é bastante solúvel em água. As matérias-primas para produção de ureia são amônia e dióxido de carbono, sendo 99% do  $CO_2$  utilizado, obtido como subproduto da síntese de amônia. A produção de ureia ocorre em duas etapas principais: I Sob pressões e temperaturas elevadas, a amônia e o dióxido de carbono reagem, em uma reação rápida e exotérmica, formando carbamato de amônio ( $NH_2COONH_4$ ); II O carbamato de amônio se decompõe em ureia e água em uma reação lenta e endotérmica, que requer energia para ser iniciada (Kirova-Yordanova, 2017; Alfian; Purwanto, 2019; Shi *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2022).

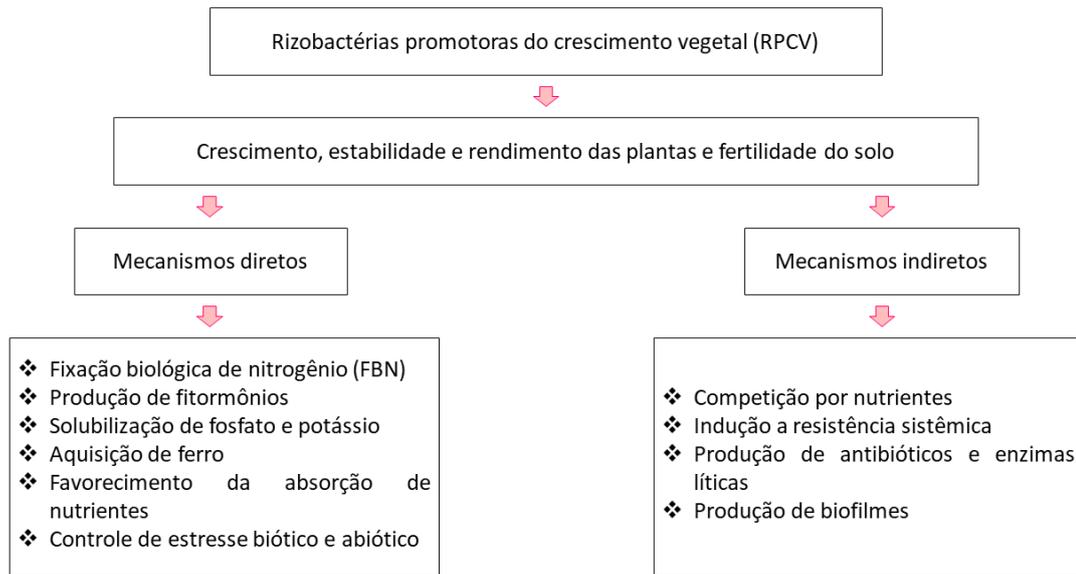
Embora técnicas sustentáveis, mais eficientes em termos energéticos e economicamente viáveis para produção de amônia e consequente síntese de ureia venham sendo exaustivamente estudadas, a indústria de fertilizantes nitrogenados ainda é responsável pelo consumo de aproximadamente 10% do fornecimento anual de energia primária mundial e pela liberação de 300 milhões de toneladas métricas de  $CO_2$  derivado de combustíveis fósseis anualmente (Tanabe; Nishibayashi, 2013; Chen *et al.*, 2022). Assim, a necessidade em produzir alimentos de forma segura e sustentável, reduzindo o uso de fertilizantes químicos, torna-se cada vez mais necessária.

As comunidades microbianas, como um componente fundamental do ecossistema, desempenham papel importante na regulação da fertilidade do solo, ciclagem de nutrientes e manutenção da diversidade das comunidades vegetais (Ramakrishna *et al.*, 2019). As plantas estão naturalmente associadas a uma alta diversidade de microrganismos benéficos, essa microbiota contribui para saúde, qualidade e produtividade das plantas, ajudando na aquisição de nutrientes, melhorando as defesas naturais das plantas e promovendo resistência aos estresses bióticos e abióticos (Castanheira *et al.*, 2017; Kong *et al.*, 2022; Nam *et al.*, 2023; Fasusi *et al.*, 2023). Tais características tornam os inoculantes microbianos uma alternativa adequada para reduzir os impactos ambientais adversos decorrentes do uso excessivo de fertilizantes químicos (Bhardwaj *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2020; Basu *et al.*, 2021; Bhat *et al.*, 2023).

A rizosfera, uma microzona na interface solo-raiz fortemente influenciada pela planta e seus exsudados (compostos, principalmente, por aminoácidos, açúcares e diversos ácidos orgânicos), é considerada um dos ecossistemas mais complexos e competitivos do planeta, e onde se encontram a maior parte dos microrganismos benéficos para as plantas (Prashar *et al.*, 2014; de Andrade *et al.*, 2019; Nam *et al.*, 2023; Zhu *et al.*, 2023). Entre esses microrganismos estão bactérias capazes de colonizar as raízes e formar associações simbióticas ou não simbióticas com as plantas, beneficiando seu desenvolvimento, crescimento e produção (Cassán *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2017a; Chebotar *et al.*, 2022). A esses microrganismos foi dado o nome de rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (RPCV) (Moreira; Siqueira, 2006; Prashar *et al.*, 2014; Ramakrishna *et al.*, 2019; Azizoglu *et al.*, 2021; Fasusi *et al.*, 2023).

As RPCV regulam o crescimento das plantas e melhoram a saúde do solo por diferentes mecanismos diretos ou indiretos (Figura 2). Esses mecanismos incluem, mas não estão limitados a fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de minerais, produção de fitormônios, rizoremediação de solos contaminados, controle de estresse biótico e abiótico, biocontrole contra fitopatógenos e insetos e biodisponibilidade de nutrientes para as plantas.

**Figura 2:** Mecanismos diretos e indiretos de ação das rizobactérias promotoras do crescimento vegetal.



**Fonte:** a autora.

A fixação biológica do nitrogênio é um processo complexo realizado por um restrito grupo de procariotos (Bacteria e Archaea) através do complexo nitrogenase, composto pela nitrogenase e nitrogenase redutase, onde o nitrogênio ( $N_2$ ) é transformado em amônia ( $NH_3$ ) pelo rompimento da tripla ligação covalente entre os dois átomos de nitrogênio atmosférico (Ghenov *et al.*, 2021). A FBN é controlada negativamente pela disponibilidade de amônio, ou seja, em condição de altos níveis de  $NH_4^+$ , ocorre a inativação da nitrogenase (Hartmann *et al.*, 1986; Fu *et al.*, 1989; Santos *et al.*, 2017a; Ghenov *et al.*, 2021).

A disponibilidade de nitrogênio é um dos principais fatores limitantes para o crescimento e produtividade das culturas vegetais (Santos *et al.*, 2017a). Nas plantas a falta de nitrogênio está associada a redução da divisão e expansão celular, área foliar e fotossíntese (Ghenov *et al.*, 2021). Embora seja um dos elementos mais abundantes na atmosfera, correspondendo a cerca de 78% de sua fração gasosa, em sua forma molecular ( $N_2$ ) o nitrogênio é um gás inerte que não reage quimicamente em condições naturais, não sendo prontamente assimilado pelas plantas. Dessa forma a fixação biológica do nitrogênio é a principal responsável pela entrada de nitrogênio em sistemas biológicos e disponibilização do mesmo para as plantas (Döbereiner, 1992; Baca *et al.*, 2000; Baldani; Baldani, 2005; Ghenov *et al.*, 2021).

Junto ao nitrogênio, o fósforo (P) e o potássio (K) são os elementos mais requeridos pelas plantas. O fósforo está envolvido em quase todas as principais vias metabólicas que ocorrem nas plantas, como a respiração, fotossíntese, biossíntese de macromoléculas, cadeia

transportadora de elétrons, entre outros, bem como participa de processos como a formação de flores, pólen e sementes e, desenvolvimento de raízes e caules (Khatoon *et al.*, 2020; de Andrade *et al.*, 2023). Já o potássio é exigido na ativação de diversas enzimas envolvidas em processos como a redução de nitrato, síntese de amido e fotossíntese (Pathania *et al.*, 2020). A escassez de potássio no solo leva a formação de raízes mal desenvolvidas, sementes pequenas devido ao desenvolvimento inadequado do tubo polínico e consequente baixa produção agrícola (Khatoon *et al.*, 2020; Nwachukwu *et al.*, 2024).

Cerca de 75% do fósforo presente no solo está em formas insolúveis, enquanto aproximadamente 90% do potássio é encontrado na forma de minerais de silicato e rochas insolúveis. Formas que não podem ser assimiladas diretamente pelas plantas (Zhu *et al.*, 2023; Jiao *et al.*, 2024). Determinadas RPCV são capazes de solubilizar fósforo e/ou potássio ao secretar ácidos orgânicos de baixo peso molecular e excretar enzimas na matriz do solo, tornando esses nutrientes disponíveis para as plantas (Bhat *et al.*, 2023; Nwachukwu *et al.*, 2024).

O ferro é um elemento essencial para diversos processos fisiológicos, tendo papel importante na síntese do DNA e clorofila, manutenção da estrutura e função do cloroplasto, respiração celular e atuando como grupo protéico constituinte de diversas enzimas (Oleńska *et al.*, 2020). A deficiência de ferro causa clorose, principalmente, nas folhas mais jovens, as nervuras, no entanto, se mantem verdes (Pathania *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2023). Em solos aeróbicos, o ferro é facilmente oxidado ao seu estado férrico ( $Fe^{+3}$ ) e forma grupos de óxidos férricos altamente insolúveis que não podem ser prontamente absorvidos pelas plantas (Borah *et al.*, 2022). Contudo, inúmeras RPCV secretam sideróforos, moléculas de baixo peso molecular e alta afinidade pelo ferro, que agem como quelantes de ferro férrico e o tornam assimilável pelas raízes das plantas (de Andrade *et al.*, 2023; Gureeva; Gureev, 2023). Os sideróforos também são capazes de quelar diversos metais pesados e mitigar a toxicidade dos mesmos em solos contaminados.

Fitohormônios ou reguladores do crescimento vegetal são substâncias sintetizadas pelas plantas em baixíssimas concentrações que atuam em diversos processos fisiológicos e bioquímicos, medeiam o crescimento e desenvolvimento das plantas e agem como moléculas sinalizadoras em resposta a estresses ambientais (Fahad *et al.*, 2015; Khatoon *et al.*, 2020). Algumas bactérias, incluindo a grande maioria das RPCV, possuem a habilidade de sintetizar e excretar fitormônios modulando o equilíbrio hormonal das plantas. Os fitormônios produzidos por RPCV são fundamentais para aliviar as condições de estresses bióticos e abióticos e favorecer o desenvolvimento e crescimento das plantas (Oleńska *et al.*, 2020; Bhat *et al.*, 2023).

A auxina, mais notavelmente o ácido indol-3-acético (AIA), produzido por RPCV exerce efeito significativo no crescimento e arquitetura das raízes, aumenta a biomassa radicular e induz a ativação de genes relacionados à defesa das plantas, diminuindo o tamanho e a densidade estomática. As citocininas bacterianas além de melhorar o crescimento das plantas pela otimização do fornecimento de nutrientes, induz a resistência contra patógenos e estresses abióticos. O ácido giberélico (GA3) é a giberelina mais frequentemente produzida por bactérias e tem efeito no aumento do hipocótilo, crescimento do caule, regulação do tamanho do meristema de folhas e raízes e tolerância ao stresse térmico e salino. O ácido abscísico (ABA) produzido por RPCV modula a biossíntese de ABA e suas vias de sinalização nas plantas, facilitando a resistência a escassez de água ao estimular o crescimento radicular e formação de raízes laterais e pela translocação de ABA da raiz para as partes aéreas, causando o fechamento dos estômatos. O etileno é um regulador do crescimento vegetal que, em altas doses, inibe o crescimento das plantas. O aumento de etileno está relacionado a concentração de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), determinadas RPCV podem reduzir os níveis de etileno nos tecidos vegetais ao produzir ACC desaminase, levando a tolerância a estresses ao promover o crescimento das plantas (Fahad *et al.*, 2014; Oleńska *et al.*, 2020; Bhat *et al.*, 2023; Borah *et al.*, 2023; Zhu *et al.*, 2023).

Em condições de estresse biótico, como doenças, as RPCV auxiliam as plantas ao competir com patógenos por nutrientes limitados, como ferro, colonizando rapidamente as superfícies radiculares e utilizando grande parte dos nutrientes exsudados pelas raízes. As bactérias benéficas também podem atuar ao produzir antibióticos e inibir a proliferação de microrganismos patogênicos e suas atividades metabólicas, ou antifúngicos, como quitinase, protease, celulase e lipase, que degradam a parede celular dos fungos e inibem o crescimento das hifas (Khatoon *et al.*, 2020; Oleńska *et al.*, 2020; Nwachukwu *et al.*, 2024).

Outro mecanismo pelo qual as RPCV protegem as plantas da infecção de fitopatógenos é a resistência sistêmica induzida, onde o microrganismo benéfico desencadeia alterações físicas e químicas relacionadas à defesa das plantas, levando a superexpressão de metabólitos defensivos como enzimas antioxidantes, ácido jasmônico, ácido salicílico e etileno. A produção dessas substâncias nas plantas favorece a resistência contra infecções fitopatogênicas (Pathania *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2023; Gureeva; Gureev, 2023; Nwachukwu *et al.*, 2024).

Por representarem um componente vital do microbioma do solo e devido sua influência na saúde geral das plantas, diversos gêneros bacterianos foram estudados e relatados como RPCV com potencial para serem usadas como inoculantes, biofertilizantes e agentes de biocontrole contra patógenos, entre eles *Acidothiobacillus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*,

*Agrobacterium*, *Allorhizobium*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Frankia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Mesorhizobium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Thiobacillus*, *Xanthomonas*, entre outros (Gupta *et al.*, 2018; Basu *et al.*, 2021; Chebotar *et al.*, 2022; Bhat *et al.*, Zhu *et al.*, 2023).

O gênero *Spirillum* foi primeiramente descrito por Beijerinck em 1925, e décadas depois foi reclassificado como *Azospirillum*, dada a sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>), descoberto e relatado pelo grupo da Dr<sup>a</sup> Johanna Döbereiner, no Brasil, na década de 1970 (Tarrand *et al.*, 1978; Hungria *et al.*, 2010; Fukami *et al.*, 2018). O gênero *Azospirillum* surgiu como um dos mais promissores RPCV e é atualmente um dos mais estudados devido a sua capacidade de colonizar mais de 100 espécies de plantas, distribuídas em 35 famílias botânicas, a maioria das quais de interesse econômico (Döbereiner, 1992; Cassán *et al.*, 2020; Pedrosa *et al.*, 2020; Barbosa *et al.*, 2022).

*Azospirillum* é um gênero de bactérias Gram-negativas, de vida livre, microaerófilas, não fermentativas e fixadoras de nitrogênio. As bactérias desse gênero são comumente encontradas em associação com as raízes de diferentes espécies de plantas e podem ser encontradas em todo planeta sob uma variedade de ambientes e condições de solo, como solos agrícolas, solos contaminados, produtos fermentados, fontes de sulfeto, ambientes aquáticos e células de combustíveis microbianos (Pedraza *et al.*, 2009; Chávez-Herrera *et al.*, 2018; Cassán *et al.*, 2020; Pedrosa *et al.*, 2020; Cruz-Hernández *et al.*, 2022).

O primeiro mecanismo proposto para explicar a capacidade do *Azospirillum* em promover o crescimento vegetal foi a fixação biológica do nitrogênio. Na sequência um crescente número de estudos propôs mecanismos adicionais que implicam na promoção do crescimento, como a produção de fitormônios (auxinas, citocinas, giberelina, ácido abscísico e etileno), proteção contra estresses bióticos e abióticos, biocontrole contra fitopatógenos, solubilização de fosfato e potássio, produção de sideróforos, facilitação na assimilação de ferro, entre outros (Fukami *et al.*, 2018; Chandramohan Reddy *et al.*, 2018; Cassán *et al.*, 2020; Housh *et al.*, 2021; Barbosa *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2022). Devido aos vários mecanismos pelos quais *Azospirillum* é capaz de promover o crescimento vegetal, foi proposta uma hipótese aditiva, segundo a qual as bactérias desse gênero atuam em um padrão cumulativo ou sequencial de efeitos, resultantes de mecanismos que ocorrem simultaneamente ou consecutivamente (Fukami *et al.*, 2018; Pedrosa *et al.*, 2020; Scudeletti *et al.*, 2023).

A assimilação intracelular de amônio em *Azospirillum* ocorre por duas vias principais, onde os genes envolvidos estão presentes em todas as espécies desse gênero analisadas até o momento. A primeira via ocorre sob baixas concentrações de  $\text{NH}_4^+$ , envolvendo a glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase (GOGAT). Já a segunda via ocorre sob altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$ , envolvendo a glutamato desidrogenase (GDH), onde a GS é inativada por adenililação sucessiva de cada uma de suas 12 subunidades em uma reação catalisada pela enzima bifuncional adenililtransferase (GlnE) (Santos *et al.*, 2017a; Cassán *et al.*, 2020; Pedrosa *et al.*, 2020).

Machado e colaboradores (1991), caracterizaram um mutante espontâneo, *A. brasilense* HM053, derivado de *A. brasilense* Sp7 (Sp7 ATCC 29145,  $\text{Sm}^R$ ,  $\text{NaI}^R$ ), na glutamina sintetase (GS), capaz de excretar amônio e fixar nitrogênio constitutivamente, mesmo na presença de altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$  (Machado *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 2017a; Pedrosa *et al.*, 2020). Esta capacidade está relacionada a uma baixa atividade da glutamina sintetase, resultando em uma deficiência na assimilação do  $\text{NH}_4^+$  e excreção do excesso de amônio produzido durante a fixação do nitrogênio, tornando essa estirpe um forte candidato como biofertilizante para fornecer nitrogênio (Machado *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 2017a; Pedrosa *et al.*, 2020; Ghenov *et al.*, 2021; Barbosa *et al.*, 2022).

Desde 2009 as estirpes de *A. brasilense* Ab-V5 (=CNPSO 2083) e Ab-V6 (=CNPSO 2084) estão autorizadas para uso comercial como inoculante em milho e trigo, apresentando excelentes resultados na produtividade e redução de adubos nitrogenados, com uma comercialização anual de aproximadamente 10,5 milhões de doses em 2020 (Hungria *et al.*, 2010; Fukami *et al.*, 2017; Pedrosa *et al.*, 2020; Ghenov *et al.*, 2021; Barbosa, *et al.*, 2022).

Estudos com a estirpe *Azospirillum brasilense* HM053 vem mostrando resultados promissores. Pankiewicz e colaboradores (2015) demonstraram que essa estirpe foi capaz de promover o crescimento e fornecer 100% das necessidades diárias de nitrogênio em *Setaria viridis*. A estirpe HM053 também foi capaz de colonizar de forma eficiente raízes de trigo, aumentando a massa seca da parte aérea e da raiz em 30 e 49% em relação a plantas não inoculadas (Santos *et al.*, 2017a). De forma semelhante, foi demonstrada a capacidade do HM053 em colonizar as raízes e melhorar os parâmetros biométricos da cevada cultivada *in vitro* (Santos *et al.*, 2017b). Recentemente, Scott e colaboradores (2020) demonstraram aumento de 34 e 53% no número de grãos de milho por espiga em plantas inoculadas com a estirpe HM053 nas safras de 2018 e 2019, respectivamente. Já Housh e colaboradores (2021) observaram aumento na assimilação e translocação de ferro em plantas de milho inoculadas com o mutante funcional HM053.

Inúmeros estudos vêm sendo realizados com a inoculação de diferentes estirpes de *Azospirillum brasilense* na cultura do morango, a maioria com resultados expressivos. Estudos com a estirpe de *A. brasilense* REC3, isolada das raízes do morangueiro, demonstraram indução da resistência sistêmica contra um isolado virulento de *Colletotrichum acutatum* (antracnose) (Tortora *et al.*, 2011), incremento na produção de morango, maiores valores de clorofila, aumento na biomassa vegetal (Lovaisa *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2022), ativação e maior atividade da síntese de etileno (Guerrero-Molina *et al.*, 2014; Elias *et al.*, 2017), contribuição para o aporte de ferro, através de sideróforos, em plantas de morango cultivadas em hidroponia (Delaporte-Quintana *et al.*, 2020), e indução de resposta de defesa contra *Macrophomina phaseolina* (podridão de carvão da raiz) mediante modificações estruturais como fechamento estomático e aumento na deposição de calose e lignina (Viejobueno *et al.*, 2021).

Ao avaliarem os parâmetros biométricos de plantas de morango inoculadas com PGPRs e diferentes doses de nitrogênio, de Andrade e colaboradores (2019), confirmaram que a cultura do morangueiro responde à inoculação com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5), *Burkholderia cepacia* (CCMA 0056) e *Enterobacter cloacae* (CCMA 1285), especialmente com a combinação das três estirpes em associação com doses de 50% de fertilizante nitrogenado. Em pesquisa semelhante, Chandramohan Reddy e Goyal (2020), demonstraram aumento nos parâmetros de crescimento das plantas e maximização na produção de frutos comercializáveis em morangueiros inoculados com *Azospirillum* sp. e 100% da dose recomendada de N para cultura, enquanto doses mais altas do fertilizante nitrogenado, em associação ao inoculante, reduziram a produção e crescimento das plantas. Já Hosseini e colaboradores (2022), enfatizam os efeitos positivos da inoculação do *Azospirillum brasilense* na nutrição das plantas de morango e defesa contra a infestação de herbívoros como *Tetranychus urticae*, popularmente conhecido como ácaro rajado.

Embora a eficiência de *Azospirillum brasilense* como promotor do crescimento vegetal seja relatada e comprovada em diversas culturas de interesse agrícola e ambiental, incluindo frutíferas como cerejeiras (*Prunus avium* L.), framboesiras (*Rubus idaeus* L.) e damasqueiros (*Prunus armeniaca*) (Esitken *et al.*, 2010; Pii *et al.*, 2017), todas da família Rosaceae, a utilização de estirpes como Ab-V5 e HM053 associadas a diferentes doses de nitrogênio no cultivo do morangueiro ainda é pouco relatada na literatura. Considerando a importância econômica do cultivo de morangos, sua alta demanda de fertilizantes químicos e pesticidas, a necessidade de técnicas que aumentem a produção agrícola e mantenham o equilíbrio ambiental e as capacidades de promoção do crescimento vegetal intrínsecas ao gênero *Azospirillum*, associamos duas estirpes de *A. brasilense*, Ab-V5 (=CNPSo 2083), utilizado como inoculante

comercial no Brasil, e o mutante espontâneo e excretor de amônio HM053, a diferentes doses de nitrogênio e duas formas de inoculação e avaliamos seu potencial como biofertilizante no desenvolvimento, produção e qualidade de morangueiros (cv Florida Festival) cultivados em casa de vegetação e em campo.

## 2. METODOLOGIA GERAL

Para realização do presente estudo, desenvolveram-se dois experimentos: I experimento em casa de vegetação, conduzido na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, Paraná, de outubro de 2019 a setembro de 2020. II Experimento em campo, conduzido na Paróquia Bom Jesus, Ponta Grossa, Paraná, sob as coordenadas geográficas 25°05'44.0"S e 50°07'33.1"W, de maio de 2020 a maio de 2022.

### 2.1 Material microbiológico

Foram utilizadas duas estirpes de *Azospirillum brasilense*, Ab-V5 e HM053, em ambos os experimentos. As estirpes são derivadas de *A. brasilense* Sp7 (Sp7 ATCC 29145, Sm<sup>R</sup>, NaI<sup>R</sup>) (Machado *et al.*, 1991), e foram obtidas das coleções de culturas microbiológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Curitiba, Paraná e do Laboratório de Biologia Molecular Microbiana (LABMOM) – Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, Paraná, respectivamente.

Os inoculantes foram preparados na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), onde colônias isoladas de *Azospirillum brasilense* HM053 e Ab-V5 foram obtidas a partir de estoques em vermelho congo (RC) (Rodriguez-Cáceres, 1982). Uma colônia de cada estirpe foi inoculada, individualmente, em 2 ml de meio NFb lactato líquido (Machado *et al.*, 1991; Baldani *et al.*, 2014) suplementado com 50 mM de solução de fosfato, 20 mM de cloreto de amônia (NH<sub>4</sub>Cl) e 100 µg.ml<sup>-1</sup> de biotina. Também foram acrescidos os antibióticos ácido nalidíxico (10 µg ml<sup>-1</sup>) e estreptomicina (80 µg ml<sup>-1</sup>).

Após 48 horas sob agitação orbital (180 rpm) a 28 ± 2 °C, 100 µl de cada cultura bacteriana foi inoculada, individualmente, em 2 ml de meio NFB lactato, suplementado como citado acima, contudo, sem adição dos antibióticos, formando pré inóculos bacterianos puros. Seguidas 24 horas sob agitação orbital, a 28 ± 2 °C, os inoculantes foram preparados a partir de 200 µl de cada pré-inóculo e inoculados, individualmente, em 50 ml de meio líquido NFB lactato, suplementado com 50 mM de solução de fosfato, 20 mM de cloreto de amônia (NH<sub>4</sub>Cl) e 100 µg.ml<sup>-1</sup> de biotina, em frascos Erlenmeyer de 250 ml, mantidos sob agitador orbital a 180 rpm e 28 ± 2 °C durante 24 (Ab-V5) e 28 (HM053) horas. A concentração bacteriana final para inoculação das plantas foi ajustada para 10<sup>9</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> (DO 600<sub>nm</sub> ~1.0).

## 2.2 Material vegetal

### 2.2.1 ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO

Cento e cinquenta (150) plantas matrizes de morangueiro, cultivar Florida Festival, foram adquiridas na empresa Multiplanta Tecnologia Vegetal, Andradas, Minas Gerais, Brasil (figura 3A). As mudas foram mantidas em câmara fria por 15 dias para aclimação, transplantadas para potes plásticos de 3 litros contendo 0,0031 m<sup>3</sup> de Latossolo vermelho e acondicionadas em casa de vegetação para realização do primeiro experimento. As plantas foram inoculadas 30 dias após o transplantio, com 1 ml do respectivo inoculante (10<sup>9</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>), via solo, em uma cavidade próximas das raízes, ou por aspersão foliar (figuras 3B e 3C), os tratamentos sem o inoculante foram regados com a mesma quantidade de água destilada esterelizada.

Ureia agrícola (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O - 46% N) foi utilizada como fonte de nitrogênio nas doses de 0 (sem nitrogênio), 185 mg/planta, 370 mg/planta e 740 mg/planta. As aplicações de ureia foram realizadas em duas etapas, 25 e 90 dias após o transplantio das mudas, em solução líquida (1g de ureia.100 ml de água ultrapura). Os morangueiros foram regados quatro vezes por semana.

Solução nutritiva de Hoagland sem adição de nitrogênio foi utilizada mensalmente como fonte de nutrientes.

**Figura 3:** (A) Plantas matrizes de morangueiro cultivar Florida Festival entregues pela empresa Multiplanta Tecnologia Vegetal; (B) Inoculação no solo, próximo as raízes; (C) Inoculação por aspersão foliar.





Fonte: a autora.

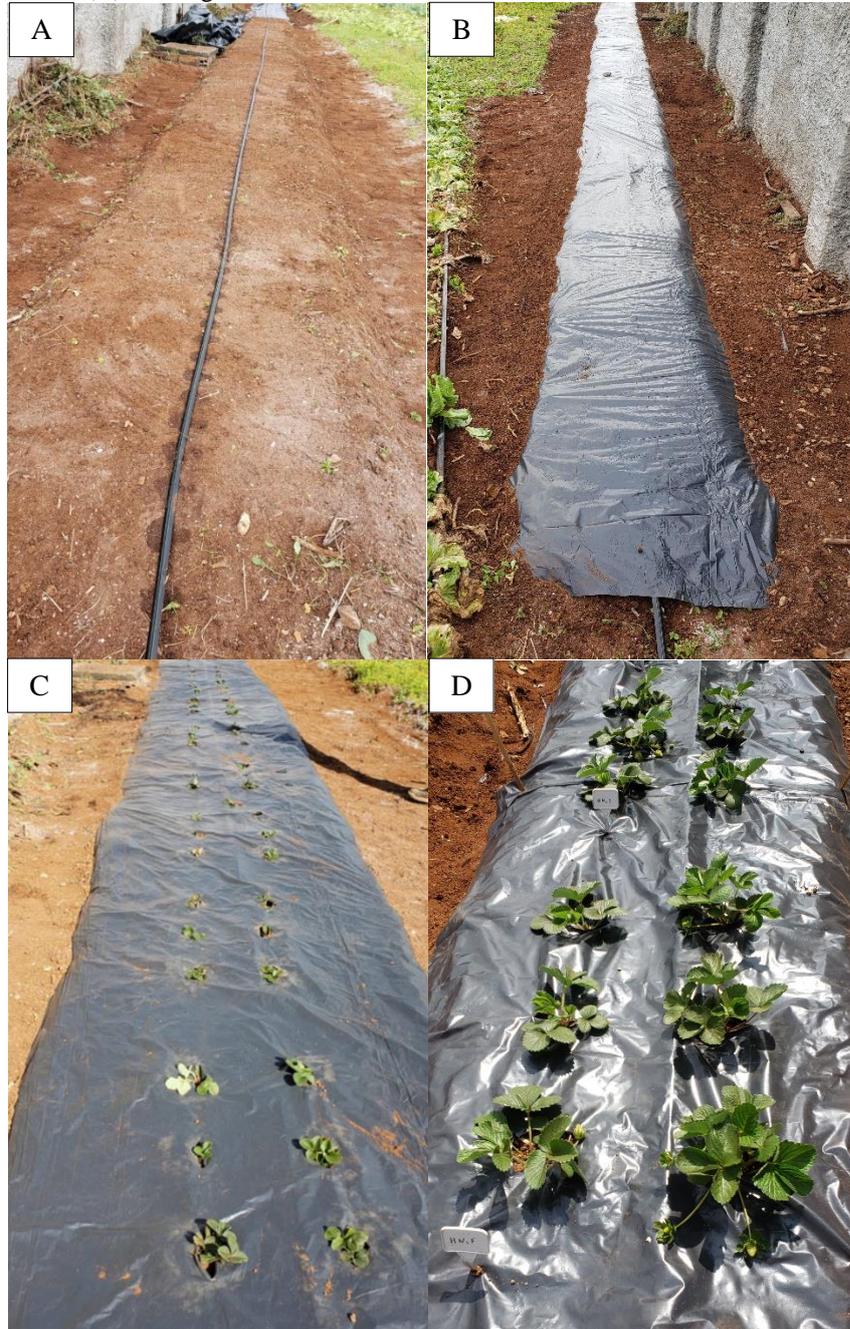
### 2.2.2. ENSAIO EM CAMPO

Plantas matrizes previamente selecionadas foram utilizadas para produzir novas mudas saudáveis através da multiplicação por estolão. Cada estolão foi cuidadosamente acondicionado em recipiente plástico de 0,5 litros contendo substrato esterilizado. Uma vez que o estabelecimento das raízes foi observado, o estolão conectando a planta mãe à planta filha foi cortado.

Um canteiro com dimensões de 1,5 m de largura por 32,5 m de comprimento foi preparado na Paróquia Bom Jesus. Após o preparo do solo e instalação da linha de irrigação (Figura 4A), o canteiro foi coberto com uma lona plástica coextrusada dupla face (Figura 4B). Pequenos cortes em forma de cruz foram feitos a intervalos de 20 cm ao longo da lona (Figura 4C). As mudas selecionadas para o plantio apresentavam diâmetro de copa semelhantes para padronização do experimento. Os morangueiros foram inoculados 30 dias após o transplante (Figura 4D) com 1 ml de *A. brasilense* Ab-V5 ou HM053, aplicados por aspersão foliar ou no solo, próximo as raízes, a depender do tratamento. As plantas sem inoculação foram regadas com 1 ml de água destilada.

Ureia agrícola ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  - 46% N) foi utilizada como fonte de nitrogênio nas doses de 0 (sem nitrogênio), 185 mg/planta, 370 mg/planta e 740 mg/planta. A aplicação de ureia ocorreu em duas etapas, aos 20 e 90 dias após o transplante das mudas, utilizando uma solução líquida (1g de ureia.100 ml de água ultrapura). Os morangueiros foram irrigados de três a quatro vezes por semana, durante 20 minutos.

**Figura 4:** Implementação do canteiro na Paróquia Bom Jesus; (A) montagem do canteiro e instalação da linha de irrigação; (B) Cobertura do canteiro com lona coextrusada dupla face; (C) Cortes em forma de cruz para transplante das mudas; (D) Morangueiros 30 dias.



Fonte: a autora.

## 2.3 Desenho experimental

### 2.3.1 CASA DE VEGETAÇÃO

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com esquema fatorial triplo ( $3 \times 4 \times 2$ ), totalizando 24 tratamentos, contando com uma planta por vaso e seis repetições por tratamento. O primeiro fator foi a utilização dos inoculantes contendo *A. brasilense* Ab-V5 ou *A. brasilense* HM053 inoculados individualmente, ou sem inoculação; o

segundo fator consistiu na utilização de quatro diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg/vaso), 50% (370 mg/vaso) e 100% (740 mg/vaso) da recomendação para a cultura no Brasil), aplicado em duas doses 25 e 90 dias após o transplante (SBCS/NEPAR, 2017); o terceiro fator foi o método de inoculação, no solo, próximo as raízes, ou por aspersão foliar. O croqui simplificado do experimento pode ser visualizado na figura 5.

**Figura 5:** Croqui do experimento em casa de vegetação

|      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| HN0S | AN1F | HN2F | HN3F | AN3S | ZN1F | ZN2F | ZN3F | ZN2F | AN0F | ZN0S | HN2S |
| AN3S | ZN1S | ZN3F | HN0F | ZN0F | HN2S | AN2S | ZN3F | HN2F | ZN3F | HN2F | ZN2F |
| ZN1F | HN1F | AN3F | ZN1S | AN0F | HN3S | AN2S | HN2F | ZN3F | AN1F | HN3F | ZN2S |
| AN3F | HN1F | AN0S | ZN2S | AN2S | ZN3S | HN3F | AN1F | ZN0S | HN1F | HN3S | ZN3F |
| HN0F | HN1F | AN1S | ZN0F | AN1S | AN3F | ZN1F | HN3F | HN3F | HN0S | HN0F | AN2F |
| HN0F | AN3S | HN2F | AN0S | HN3F | ZN0S | AN2F | ZN2S | HN1S | AN2F | ZN3S | AN2S |

37-72

109-144

|      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| HN0F | ZN2S | HN2F | HN3S | AN0S | HN3S | AN3S | AN0F | ZN2F | ZN3S | ZN1S | AN0F |
| AN3S | HN1F | ZN1S | ZN0F | HN2S | ZN2S | HN2S | ZN1S | HN3S | ZN2F | AN1F | ZN1F |
| ZN0S | HN3S | ZN0F | AN3F | ZN3S | HN2S | AN2F | ZN2F | HN1S | ZN2S | HN2S | AN0F |
| AN1S | AN3F | HN1F | AN3F | HN0S | AN1F | ZN3S | AN1F | AN0S | ZN1S | HN1S | ZN0S |
| HN1S | AN0S | AN1S | ZN1F | AN1S | ZN0F | HN0S | ZN3S | AN0F | HN0S | AN1S | AN3S |
| AN2S | ZN1F | HN1S | ZN0F | HN0S | AN2S | AN0S | HN1S | AN2F | ZN0S | HN0F | AN2F |

1-36

73-108

A – *Azospirillum brasilense* Ab-V5; H - *Azospirillum brasilense* HM053; Z – sem inoculação; N0 – sem nitrogênio; N1 – 25% da dose recomendada de nitrogênio; N2 – 50% da dose recomendada de nitrogênio; N3 – dose completa de nitrogênio; S – inoculação no solo; F – inoculação por aspersão foliar; cores iguais representam repetições;

Todas as plantas foram inoculadas com 1 ml do respectivo inoculante, exceto as plantas dos tratamentos sem inoculação, que foram inoculadas com a mesma quantidade de água destilada. Ureia diluída em água (1g de ureia.100 ml de água) foi utilizada como fonte de nitrogênio. As plantas dos tratamentos sem nitrogênio foram irrigadas com a mesma quantidade de água.

### 2.3.2. CAMPO

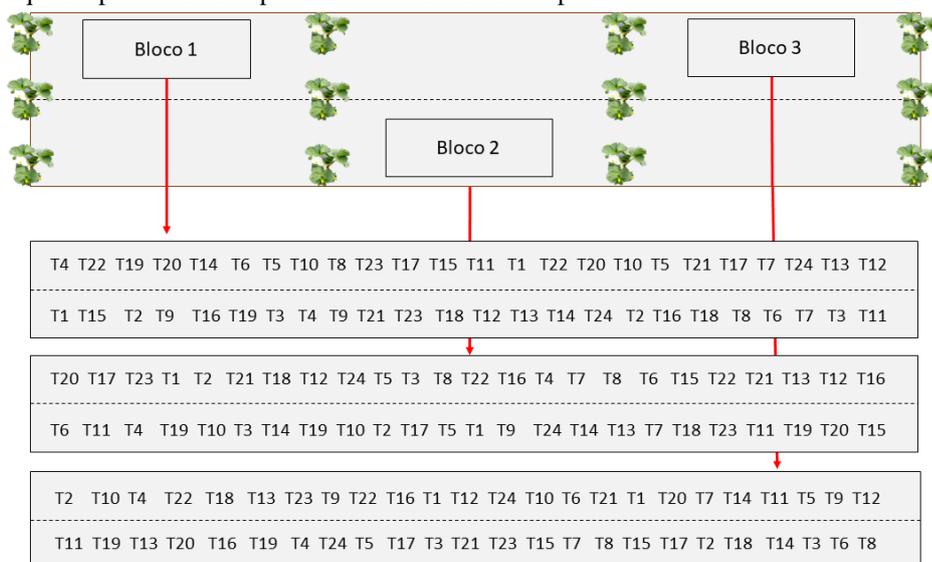
O experimento em campo foi conduzido em blocos inteiramente casualizados (DBC), onde cada planta representou um tratamento e cada tratamento foi constituído por 6 repetições. O esquema foi em fatorial triplo 3x4x2, sendo o primeiro fator em estudo os inoculantes contendo *Azospirillum brasilense* Ab-V5 ou HM053 individualmente, ou sem inoculação; o segundo fator foram quatro diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg/planta), 50% (370 mg/planta) e 100% (740 mg/planta) da recomendação para a cultura) (SBCS/NEPAR, 2017; Chandramohan Reddy; Goyal, 2020); e o terceiro fator foi a forma de inoculação, no solo,

próximo as raízes ou por aspersão foliar. Todas as plantas foram inoculadas com 1 ml do respectivo inoculante, exceto as plantas dos tratamentos sem inoculação, que foram irrigadas com a mesma quantidade de água destilada autoclavada. Ureia agrícola (46%) diluída em água (1g de ureia.100 ml de água) foi utilizada como fonte de nitrogênio, e a aplicação foi dividida em duas doses (0%, 25% (92,5 mg), 50% (185 mg) e 100% (370 mg), a primeira durante em maio e a segunda em setembro. As plantas dos tratamentos sem nitrogênio foram irrigadas com a mesma quantidade de água.

## 2.4. Parâmetros biométricos

A altura das plantas, comprimento das raízes, diâmetro da copa (distância entre as duas maiores folhas opostas), área foliar (média das três maiores folhas) e diâmetro das coroas foram medidos com um auxílio de uma fita métrica e expressos em centímetros (cm). A altura das plantas foi medida uma vez por mês e o número de folhas por planta foi contado no mesmo período. O peso fresco da parte aérea e das raízes foram obtidos com o auxílio de uma balança digital de precisão e expressos em gramas (g). O peso seco foi determinado através da secagem da parte aérea e das raízes em uma estufa a 60° C durante 72 h (peso constante). As amostras secas foram pesadas em uma balança digital de precisão e os pesos expressos em gramas (g). A biomassa total foi calculada pela soma do peso seco da parte aérea e das raízes (Elias *et al.*, 2018; Delaporte-Quintana *et al.*, 2020). Todas as análises destrutivas, como peso seco e peso fresco foram realizadas ao final de cada experimento.

**Figura 6:** Croqui simplificado do experimento realizado no campo.



A linha tracejada representa a irrigação instalada no meio do canteiro; as plantas representam a bordadura separando cada bloco; T1: Sem inoculação + sem N solo; T2: sem inoculação + sem N foliar; T3: sem inoculação + 25% N solo; T4: sem inoculação + 25% N foliar; T5: sem inoculação + 50% N solo; T6: sem inoculação + 50% N foliar; T7: sem inoculação + 100% N solo; T8: sem inoculação + 100% foliar; T9: HM053 + sem N + sulco;

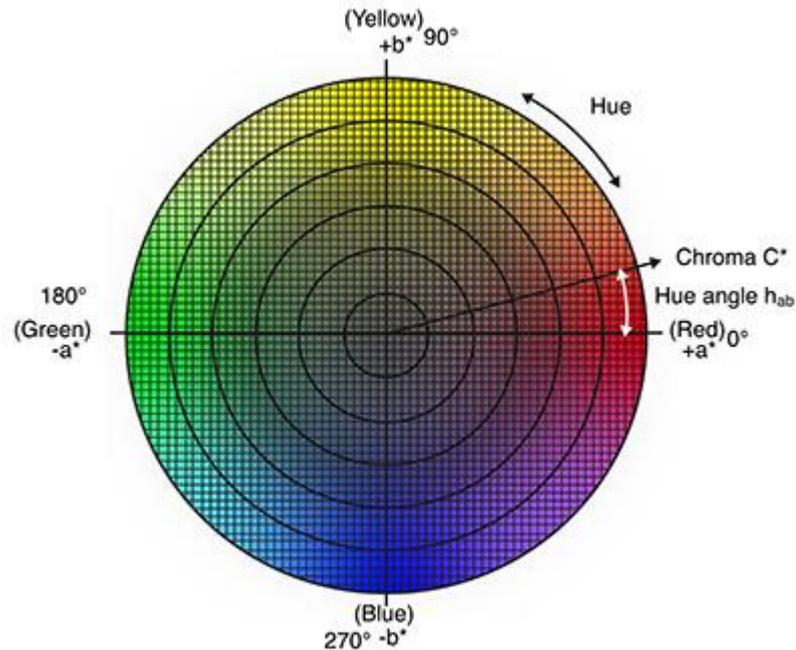
T10: HM053 + sem N + foliar; T11: HM053 + 25% N + solo; T12: HM053 + 25% N + foliar; T13: HM053 + 50% N + solo; T14: HM053 + 50% N + foliar; T15: HM053 + 100% N + solo; T16: HM053 + 100% N + foliar; T17: Ab-V5 + sem N + sulco; T18: Ab-V5 + sem N + foliar; T19: Ab-V5 + 25% N + solo; T20: Ab-V5 + 25% N + foliar; T21: Ab-V5 + 50% N + solo; T22: Ab-V5 + 50% N + foliar; T23: Ab-V5 + 100% N + solo; T24: Ab-V5 + 100% N + foliar;

## 2.5. Análises dos frutos

As primeiras flores foram retiradas para aumentar o vigor e o estabelecimento das plantas, e os estolões foram cortados três vezes por semana. Todos os frutos maduros de cada tratamento foram colhidos três vezes por semana. Os frutos frescos foram analisados imediatamente após a colheita para as seguintes análises: (1) peso fresco, com auxílio de uma balança digital de precisão e expresso em gramas (g); (2) diâmetro e largura, com auxílio de um paquímetro digital e expresso em milímetros (mm); (3) firmeza da polpa, utilizando um penetrômetro digital de 6,0 mm. Cada fruta foi furada uma vez na região equatorial e os resultados foram expressos em Newton (N); e (4) avaliação da cor, onde as frutas foram medidas na região equatorial com um colorímetro Minolta CR 400. A cor foi registrada utilizando o espaço de cor uniforme CIE-L\*C\*h° (CIE-LCh), onde L\* indica luminosidade (0 = preto e 100 = branco), C\* indica o “croma”, ou saturação da cor, e h° indica o ângulo de tonalidade (Figura 11). O valor de croma foi calculado pela equação  $\sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$ , enquanto o ângulo Hue foi calculado pela equação  $h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$  quando  $a^* > 0$  e  $b^* > 0$  ou pela equação  $h^\circ = 180 + \tan^{-1}(a^*/b^*)$ , onde a\* indica valores num eixo verde (-) a vermelho (+) e b\* valores num eixo azul (-) a amarelo (+). O ângulo Hue é expresso em graus, onde 0 representa +a\* (vermelho), 90 representa +b\* (amarelo), 180 representa -a\* (verde) e 270 representa -b\* (azul).

O rendimento foi medido pelo número total de frutos por planta e pela massa total de frutos por planta (g). A massa média por fruto foi calculada utilizando a massa total dividida pela contagem total de frutos não apodrecidos na planta.

**Figura 7:** Diagrama de cromaticidade do Espaço de cor Cie L\*C\*h.



**Fonte:** Material suplementar Konica Minolta CR 400.

### 2.5.1. SÓLIDOS SOLÚVEIS, ACIDEZ TITULÁVEL E pH

Em média 10 morangos maduros por tratamento (100 g de fruto) foram selecionados e macerados em almofariz esterilizado. O suco resultante da maceração foi utilizado para medir o teor de sólidos solúveis (SS), pH e acidez titulável. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O teor de sólidos solúveis foi determinado com auxílio de um refratômetro portátil (Atago PAL-1 (3810), Tóquio, Japão) e os resultados foram expressos em BRIX. Já a avaliação do pH foi realizada através de um pHmetro devidamente calibrado.

A acidez titulável foi determinada por titulometria de acordo com a AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (2020), misturando-se 5 ml do suco dos morangos macerados de cada tratamento a 15 ml de água destilada autoclavada. Às soluções foram adicionadas 3 gotas de indicador fenolftaleína e o volume final de 20 ml foi titulado com NaOH (1N) até a obtenção de uma coloração rosa escura (Figura 6). Os resultados foram expressos em % de ácido cítrico.

**Figura 8:** Titulometria com NaOH indicando a coloração do suco de morango antes (esquerda) e após (direita) o ponto de viragem do indicador fenolftaleína.



**Fonte:** a autora.

A acidez titulável foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ ácido} = V \times F \times M \times PM / 10 \times P \times n$$

Onde:

V (ml) = volume de NaOH gasto na titulação;

F = fator de correção da solução de NaOH;

PM = fator do ácido predominante (192 para ácido cítrico)

P = peso ou volume da amostra (g ou ml);

M = molaridade da solução de NaOH (0.1 ou 1N)

n = número de H<sup>+</sup> ionizáveis (3 para ácido cítrico)

### 2.5.2 COMPOSTOS FENÓLICOS, ANTOCIANINAS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante, compostos fenólicos e antocianinas totais foram determinados a partir de aproximadamente 20 morangos maduros por tratamento (200 g de fruto). Os morangos foram divididos em dois grupos homogêneos de 10 frutos (100g de fruto) e macerados em 25 ml de água ultrapura autoclavada ou 25 ml de metanol absoluto (Dinâmica) e filtrados em camada única de tecido 100% algodão. O filtrado foi utilizado de acordo com cada análise. Todas as análises foram realizadas em triplicata e na penumbra.

Os compostos fenólicos totais foram medidos utilizando o ensaio com o reagente de Folin-Ciocalteu (Folin e Ciocalteu, 1927) adaptada de Singleton e Rossi (1965) para microplacas de 96 poços. Foram adicionadas, em triplicata, 25 µL de cada amostra macerada em água, 200 µL de água ultrapura autoclavada e 25 µL da solução de Folin-Ciocalteu (2N). As microplacas foram deixadas em repouso no escuro por 5 minutos. A cada poço foi adicionado 25 µL de solução de carbonato de sódio (10%) e a solução foi homogeneizada por 20 segundos. As placas foram então incubadas no escuro por 1 hora. A absorbância das

amostras foi medida em leitor de placas a 725 nm. Ácido gálico foi utilizado como padrão (Figura 7) e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por 100 g de massa fresca do fruto.

O teor de Antocianinas totais foi detectado como descrito por Nunes e colaboradores (2005) com modificações, onde 0,5 ml de suco de morango extraído em metanol foi misturado a 9,5 ml de solução de metanol HCl (0.5%) e mantidos no escuro a 4°C por uma hora para extração dos pigmentos. As amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 7000 rpm e o sobrenadante filtrado em camada única de tecido de 100% algodão. Imediatamente após a filtragem, em microplacas de 96 poços, foram adicionadas, em triplicata, 300 µL de cada amostra e a absorbância foi medida em leitor de placas a 520 nm (absorbância máxima para antocianinas). Os resultados foram expressos em mg.100g de peso seco de PGN (pelargonidina-3-glicosídeo). O teor de antocianinas foi calculado pela formula:

$$\text{Antocianinas} = A_{520} \cdot \text{FD} \cdot [\text{PM de PGN} / \text{coeficiente de extinção molar}]$$

Onde:

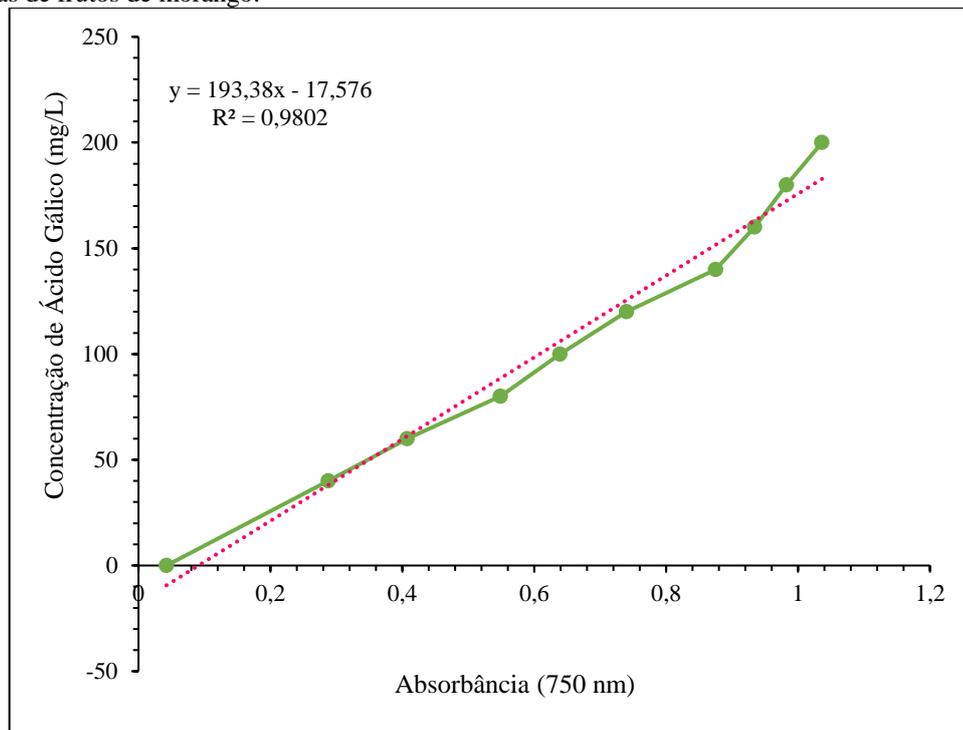
$A_{520}$  = Absorbância da amostra a 520 nm;

FD = Fator de diluição;

PM de PGN (peso molecular de pelargonidina-3-glicosídeo) = 433,2

Coefficiente de extinção molar =  $2,908 \times 10^4$

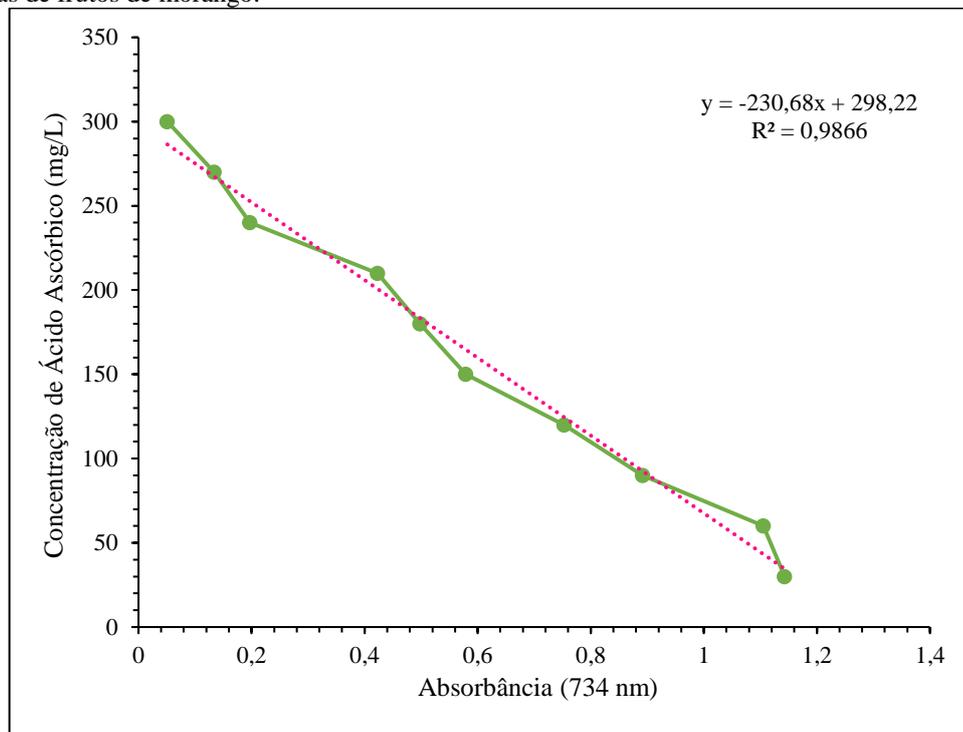
**Figura 9:** Curva analítica do ensaio de Folin-Ciocalteu para determinação do teor de compostos fenólicos totais em amostras de frutos de morango.



Fonte: a autora.

A capacidade antioxidante foi determinada pela capacidade de sequestro dos radicais ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azinobis-3-etilbenzoatiazolina-6-ácido sulfônico) e DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) seguindo as metodologias adaptadas de Torres e colaboradores (2017) e Pires e colaboradores (2017), respectivamente. Para o método de captura do radical ABTS<sup>+</sup>, foram pipetados, em microplacas de 96 poços, 10 µL de cada amostra diluída em metanol, em triplicata e 290 µL do radical ABTS<sup>+</sup>, na sequência a mistura foi homogeneizada e as placas incubadas no escuro por 6 minutos a temperatura ambiente. A absorbância foi obtida em leitor de placas a 734 nm. Etanol absoluto foi utilizado como branco. Uma solução estoque de ácido ascórbico (300mg.L<sup>-1</sup>) foi utilizada para construção da curva padrão. Os resultados foram expressos em miligramas de ácido ascórbico equivalente.L<sup>-1</sup>.

**Figura 10:** Curva analítica do ensaio de sequestro do radical ABTS+ para determinação da atividade antioxidante em amostras de frutos de morango.



**Fonte:** a autora.

O método de captura do DPPH foi realizado adicionando-se, em triplicata, 40 µL de cada amostra diluída em água destilada e 260 µL da solução de DPPH (0,1 mM) em microplacas de 96 poços. As placas foram incubadas no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente. A absorbância das amostras foi medida em leitor de placas a 517 nm. Água destilada autoclavada foi utilizado como branco e solução de DPPH sem amostra como controle positivo. Os resultados foram expressos em % de atividade antioxidante e calculados pela equação:

$$\% \text{ AAO} = [1 - (A_{517} \text{ amostra} / A_{517} \text{ branco})] \cdot 100$$

## 2.6. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software RStudio (R Core Team, versão 4.0.4, 2021). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) unidirecional e a normalidade e homogeneidade dos resíduos foram verificadas para todas as variáveis por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk (p. 0,05). Os valores médios foram comparados através dos testes de Tukey, Duncan ou Scott-Knott (p. 0,05) como testes de comparações múltiplas, utilizando o pacote ExpDes.pt (Ferreira *et al.* 2021). O teste de Dunnett (p. 0,05) foi utilizado para comparar as médias dos tratamentos com o controle positivo.

### 3. ARTIGOS

#### 3.1. The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053 enhances the vegetative development of strawberry

##### ABSTRACT

ALTHAUS, H. V. **The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053 enhances the vegetative development of strawberry** Advisor: Ricardo Antonio Ayub. Ponta Grossa, 2023. Thesis (Ph.D. in Agronomy) – Graduate Program in Agronomy, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2023.

Plant growth-promoting bacteria stand out due to their ability to stimulate plant growth through biological nitrogen fixation, production of phytohormones, mineral solubilization, among others. Strawberry is a small fruit with a high commercial value and is appreciated worldwide for its organoleptic and nutraceutical characteristics. However, its production is intensive and requires high amounts of nitrogen fertilizers. The genus *Azospirillum* is one of the most promising plant growth-promoting bacteria, but its use is little explored in strawberry cultivation. To understand the effect of *Azospirillum* as a biofertilizer on strawberry crops, two strains of this genus (*Azospirillum brasilense* Ab-V5 and HM053) were used and associated with four different doses of nitrogen [0%, 25% (92, 5 mg), 50% (185 mg), and 100% (370 mg) of the recommendation for the crop in Brazil] in two forms of inoculation (in the soil or by leaf aspersion). The research was conducted in a greenhouse using a completely randomized design, with one strawberry plant per pot and six repetitions per treatment. The results indicate that the strawberry crop, cultivar Festival, responded positively to inoculation with *Azospirillum brasilense* strains HM053 and Ab-V5. The best results for the biometric parameters were observed for plants inoculated with HM053 + 25% or 50% of nitrogen, indicating a 75% to 50% reduction in nitrogen fertilization. Thus, the benefits observed on strawberries inoculated with *Azospirillum brasilense* HM053 make this strain a promising biofertilizer for strawberry cultivation.

##### 3.1.1. INTRODUCTION

Strawberry (*Fragaria x ananassa*, Duch) is a small fruit with high commercial value, it is appreciated worldwide for its organoleptic, nutraceutical, and antioxidant characteristics. However, its production is intensive and requires high amounts of nitrogen fertilizers at various stages of its biological cycle, increasing the cost of production (De Andrade et al. 2019; Lovaisa et al. 2015; Morais et al. 2019). Although chemical fertilizers are beneficial to increase crop yields, their intensive use causes severe impacts on the environment, such as groundwater contamination, soil quality degradation and biodiversity reduction, also affecting human health (Zhang et al., 2010; Lovaisa et al., 2015; De Andrade et al., 2019; Agehara and Nunes, 2021).

Thus, it becomes necessary to search for eco-friendly ways of cultivation, which maintain high productivity while protecting the environment.

A key component of the ecosystem are the soil microbial communities, which are responsible for nutrient cycling, regulation of soil fertility, and maintaining plant diversity (Ramakrishna et al., 2019). Among the soil microbial communities, there are bacteria capable of stimulating plant development, called plant growth-promoting bacteria (PGPB) (Azizoglu et al., 2021; Cassán et al., 2014; Moreira and Siqueira, 2006; Prashar et al., 2014). The PGPB stand out for their ability to promote plant growth, this can occur through biological nitrogen fixation (BNF), a complex and essentially microbiological process, in which nitrogen ( $N_2$ ) is reduced to ammonia ( $NH_3$ ) by the nitrogenase enzyme complex, production of phytohormones, mineral solubilization, stimulation of root growth, competition for nutrients with pathogens, inducing defense mechanisms in the host, and generating induced systemic resistance (ISR), among others (Azizoglu et al. 2021; Baldani et al. 2002; de Andrade et al. 2019; Fukami et al. 2018; Hosseini et al. 2022; Ramakrishna et al. 2019; Vejan et al. 2016).

The genus *Azospirillum* has emerged as one of the most promising PGPB. Currently, it is the most studied and used genus due to its ability to colonize the roots of over a hundred different plant species, most of them of agronomic interest, being able to increase productivity and to reduce the use of pesticides and nitrogen fertilizers (Barbosa et al. 2022; Bashan and de Bashan 2010; Döbereiner 1992; Elias et al. 2018; Fukami et al. 2016; Hungria 2010). Since 2009, *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 (=CNPSo 2083) and Ab-V6 (=CNPSo 2084) have been used to improve productivity in maize and wheat (Hungria et al. 2010; Pedrosa et al. 2020; Santos et al. 2017a).

*Azospirillum brasilense* strain HM053 is a spontaneous mutant in glutamine synthetase (GS) and resistant to ethylenediamine (EDA) that is capable of excreting ammonia and fixing nitrogen constitutively, even in the presence of high concentrations of  $NH_4^+$  (Machado et al. 1991; Pedrosa et al. 2020; Santos et al. 2017a). This ability is related to low GS activity, resulting in deficiency in  $NH_4^+$  assimilation and the elimination of excess ammonia produced during nitrogen fixation (Ghenov et al. 2021; Machado et al. 1991). This *Azospirillum brasilense* strain showed promising results in wheat (Santos et al. 2017a), maize (Pedrosa et al. 2020) and barley crops (Santos et al. 2017b).

The efficiency of *Azospirillum brasilense* as a plant growth promoter has been proven in various crops, including fruit trees, such as blackberry, apricot, cherry, and raspberry (Esitken et al. 2010; Pii et al. 2017). Considering the nutritional needs of strawberries, including the high inputs of nitrogen during its biological cycle, and the ability of *Azospirillum brasilense* to

making nitrogen available to the plants and promote the growth, as well as the urgency to develop a sustainable agriculture, it is expected that the use of *Azospirillum brasilense*, especially the HM053 strain, can mitigate the nitrogen needs of strawberries, reducing production costs and improving plant development.

Therefore, the objective of this study was evaluate the effect of two *Azospirillum brasilense* strains, Ab-V5 and HM053, in combination with four different doses of nitrogen [0%, 25% (92, 5 mg), 50% (185 mg), and 100% (370 mg) of the recommendation for the crop in Brazil] in two forms of inoculation (in the soil or by leaf aspersion), for the promotion of strawberries growth.

### 3.1.2. MATERIAL AND METHODS

#### 3.1.2.1. Bacterial Culture and Plant Material

The bacterial strains used, *Azospirillum brasilense* HM053 and Ab-V5 (=CNPSo 2083), are derived from *Azospirillum brasilense* Sp7 (Sp7 ATCC 29145, Sm<sup>R</sup>, NaI<sup>R</sup>) (Machado et al. 1991). The strains were obtained respectively from the Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brazil, and from the microbiological culture collection of Laboratory of Biology Molecular Microbial (LABMOM), State University of Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, Paraná, Brazil. The inoculants were prepared at UEPG. In sum, pure cultures of *Azospirillum brasilense*, strains HM053 or Ab-V5, were grown in 2 ml of liquid NFB lactate medium (Baldani et al. 2014), containing the appropriate antibiotics: nalidixic acid (1 µl ml<sup>-1</sup>) and streptomycin 80 (1 µl ml<sup>-1</sup>), and supplemented with 1 µl of biotin per milliliter of the medium under orbital agitation at 180 rpm for 48 hours at 28 ± 2 °C to prepare the pre-inoculum.

Inoculants were prepared from 200 µl of each pre-inoculum and inoculated into 50 ml of liquid NFB lactate medium in Erlenmeyer flasks (250 ml). They were kept under agitation in an orbital shaker at 180 rpm at 28 ± 2 °C for 20 hours (Ab-V5) and 28 hours (HM053). After incubation, the optical density of the cultures was measured using a spectrophotometer at a wavelength of 600 nm. The final bacterial concentration for the strawberries inoculation was about 10<sup>9</sup> CFU/ml (OD 600<sub>nm</sub> ~1.0). Inoculation was performed either by leaf aspersion or on the soil, near the roots, according to the treatment.

Strawberry mother plants (*Fragaria x ananassa*, Duch), cv. Festival, were obtained from the Multiplanta Tecnologia Vegetal, Andradas, Minas Gerais state, Brazil. The strawberry plants were placed in a cold chamber for 15 days for acclimatization and then transferred to a

greenhouse at UEPG, Paraná state, Brazil (25°05'23.9"S 50°06'08.2"W), where they were transferred into 3-liter plastic pots containing soil of the Latosol class. The soil was collected at Capão da Onça Farm School (FESCON, UEPG). After collection, the soil was sieved and the liming requirements were determined using the base saturation method in the Soil Fertility Laboratory, at UEPG (Table 1). Calcium carbonate and magnesium carbonate were added as required. All pots were kept in a greenhouse from October 2019 to September 2020 and watered three times a week.

**Table 1:** Chemical properties of the soil collected at Capão da Onça Farm School (FESCON, UEPG).

| pH                | (H+Al)  | Al   | Ca  | Mg  | K    | CTC <sup>†</sup> | P <sup>‡</sup>     | C                 | V <sup>§</sup> |
|-------------------|---|------|-----|-----|------|------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| CaCl <sub>2</sub> | .....Cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> ..... |      |     |     |      |                  | mg dm <sup>3</sup> | g dm <sup>3</sup> | %              |
| 4,4               | 10,07   | 1,68 | 0,3 | 0,2 | 0,05 | 10,63            | 8,2                | 4,5               | 5,27           |

<sup>†</sup>Cation exchange capacity pH 7.0; <sup>‡</sup>P extracted with Mehlich<sup>-1</sup> solution; <sup>§</sup> Base saturation.

### 3.1.2.2. Experimental Design

The experiment was conducted in a completely randomized design, in a 3x4x2 factorial scheme, with one strawberry plant per pot and six repetitions per treatment. The first factor was the inoculation of biofertilizers, *Azospirillum brasilense* Ab-V5 or *Azospirillum brasilense* HM053, either inoculated individually or without inoculation. The second factor consisted of the treatment with four different nitrogen concentrations [0%, 25% (92.5 mg), 50% (185 mg), and 100% (370 mg) of the recommendation for the crop in Brazil], applied at two different times. The third factor was the inoculation method, either in the soil, near the roots, or by leaf aspersion. The treatments are described in Table 2. All strawberries were inoculated with 1 ml of inoculant, except for the treatments without inoculation, which were irrigated with the same amount of distilled water.

**Table 2:** Experimental treatments applied, strains, nitrogen concentration, and inoculation method.

| Treatments   | Code | Method   |
|--------------|------|--|
| Treatment 1  | ZN0S | Without inoculant (W/I) + 0% nitrogen + soil inoculation               |
| Treatment 2  | ZN0F | Without inoculant (W/I) + 0% nitrogen + leaf aspersion                 |
| Treatment 3  | ZN1S | Without inoculant (W/I) + 25% nitrogen + soil inoculation              |
| Treatment 4  | ZN1F | Without inoculant (W/I) + 25% nitrogen + leaf aspersion                |
| Treatment 5  | ZN2S | Without inoculant (W/I) + 50% nitrogen + soil inoculation              |
| Treatment 6  | ZN2F | Without inoculant (W/I) + 50% nitrogen + leaf aspersion                |
| Treatment 7  | ZN3S | Without inoculant (W/I) + 100% nitrogen + soil inoculation             |
| Treatment 8  | ZN3F | Without inoculant (W/I) + 100% nitrogen + leaf aspersion               |
| Treatment 9  | HN0S | <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 + 0% nitrogen + soil inoculation  |
| Treatment 10 | HN0F | <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 + 0% nitrogen + leaf aspersion    |
| Treatment 11 | HN1S | <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 + 25% nitrogen + soil inoculation |
| Treatment 12 | HN1F | <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 + 25% nitrogen + leaf aspersion   |
| Treatment 13 | HN2S | <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 + 50% nitrogen + soil inoculation |

|              |      |   |
|--------------|------|---|
| Treatment 14 | HN2F | <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 + 50% nitrogen + leaf aspersion    |
| Treatment 15 | HN3S | <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 + 100% nitrogen + soil inoculation |
| Treatment 16 | HN3F | <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 + 100% nitrogen + leaf aspersion   |
| Treatment 17 | AN0S | <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 + 0% nitrogen + soil inoculation   |
| Treatment 18 | AN0F | <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 + 0% nitrogen + leaf aspersion     |
| Treatment 19 | AN1S | <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 + 25% nitrogen + soil inoculation  |
| Treatment 20 | AN1F | <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 + 25% nitrogen + leaf aspersion    |
| Treatment 21 | AN2S | <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 + 50% nitrogen + soil inoculation  |
| Treatment 22 | AN2F | <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 + 50% nitrogen + leaf aspersion    |
| Treatment 23 | AN3S | <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 + 100% nitrogen + soil inoculation |
| Treatment 24 | AN3F | <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 + 100% nitrogen + leaf aspersion   |

### 3.1.2.3 Biometric Parameters

The first flowers were removed to enhance plant vigor and improve growth; the stolons were pruned three times a week. Shoot length, root length, and leaf area were measured using a digital caliper and expressed in centimeters (cm). Shoot length was measured once a month from October 2019 to March 2020. The number of leaves per plant was counted in the same period. The fresh weight of the shoot and roots were measured using a precision digital scale and expressed in grams (g). The dry weight was determined by drying the shoots and the roots, a process carried out in an oven at 60° C for 72 h (constant weight). Then, the dry weight was measured using a precision digital scale, and the weight of each tissue was recorded. Total biomass was calculated as the sum of the dry weight of the shoot and roots (Delaporte-Quintana et al., 2020; Elias et al., 2018).

### 3.1.2.4 Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using RStudio software (R Core Team, version 4.0.4, 2021). The results were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA), and the normality and homogeneity of residuals were checked for all variables using the Shapiro-Wilk normality test (p. 0.05). Mean values were compared using the Tukey test (p. 0.05) as a multiple comparison test, using the ExpDes.pt package (Ferreira et al. 2021).

## 3.1.3 RESULTS

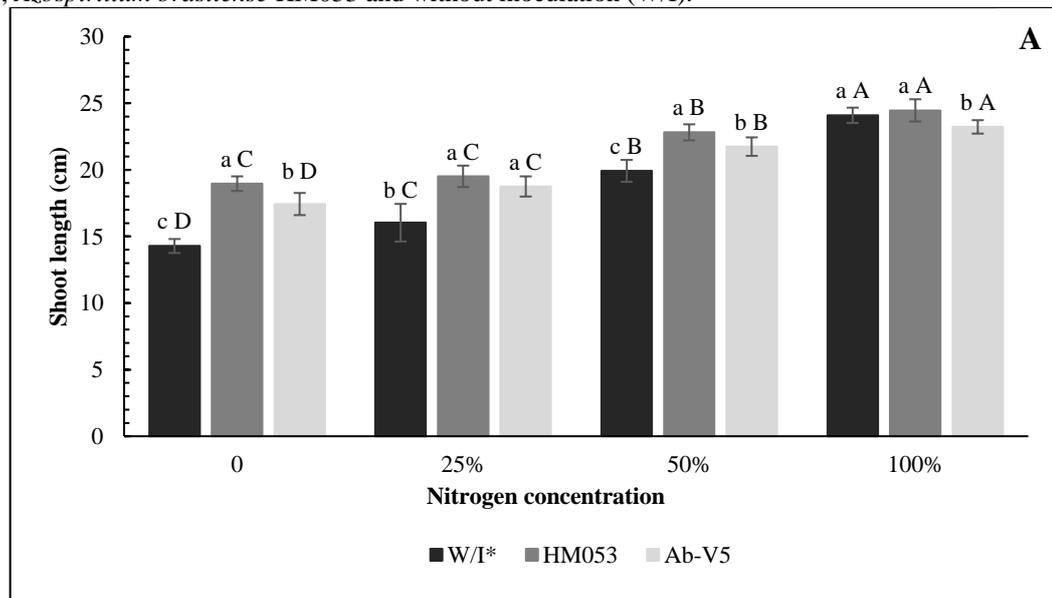
### 3.1.3.1 Number of Leaves and Shoot Length

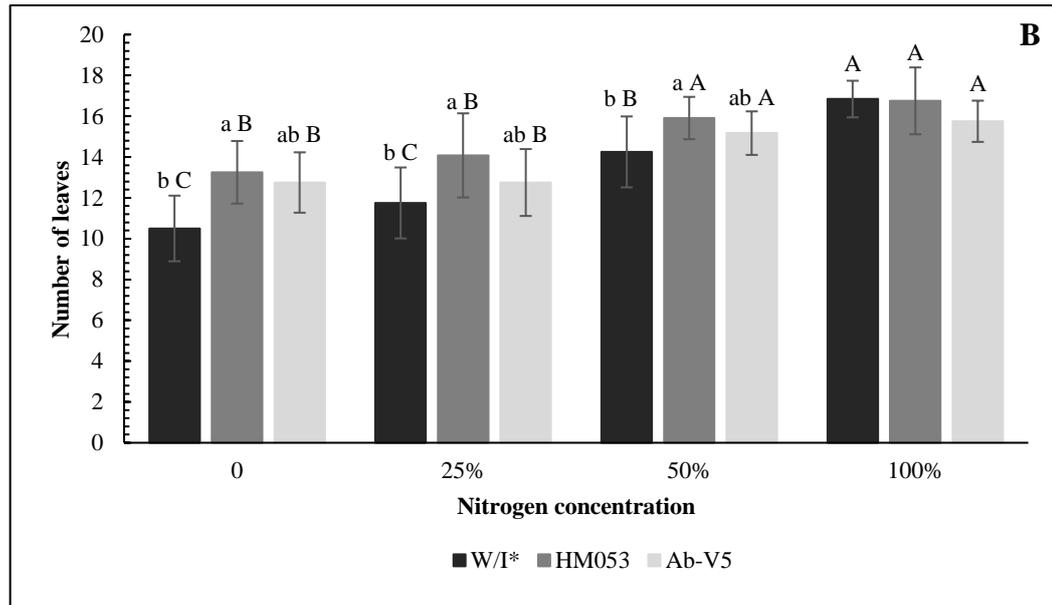
The results show that inoculation of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and HM053 had a positive effect on the shoot of strawberry plants. Furthermore, they indicate a significant interaction between the inoculated strains and the different nitrogen doses (Figures 9A and 9B). No significant differences were observed regarding the inoculation method. Regardless of the

inoculated strain, the full nitrogen dose resulted in plants with a higher shoot. However, the HM053 + 50% N treatment ( $22.81 \pm 0,60$  cm) showed a 12.86% and 8.37% increase in the shoot length of strawberries compared to the treatments without inoculation + 50% N ( $19.92 \pm 0.82$  cm) and Ab-V5 + 50% N ( $21.74 \pm 0.69$  cm). Similar results were observed for the plants fertilized with 25% nitrogen. On the other hand, the treatment with HM053 without nitrogen ( $18.96 \pm 0.54$  cm) led to an increase of 24.9% compared to the control without inoculation ( $14.28 \pm 0.52$  cm).

According to Figure 9B, the number of leaves was higher for the treatments HM053 + 50% N ( $15.91 \pm 1.03$ ) and Ab-V5 + 50% ( $15.17 \pm 1.06$ ), which were 33.96% and 30.47% higher than the control without inoculation ( $10.5 \pm 1.6$ ) and significantly equal to the treatment without inoculation + 100% N ( $16.84 \pm 0.89$ ). Similar to what was observed for the shoot, the strain HM053 without nitrogen addition ( $13.25 \pm 1.53$ ) was superior to the control without inoculation ( $10.5 \pm 1.6$ ) and similar to the strain Ab-V5 without nitrogen addition ( $12.75 \pm 1.47$ ).

**Figure 11:** Shoot length (A) and number of leaves (B) of strawberries inoculated with *Azospirillum brasilense* Ab-V5, *Azospirillum brasilense* HM053 and without inoculation (W/I).





Means followed by the same capital or lowercase letter do not differ statistically according to Tukey's test at 5% significance. Lowercase letters indicate differences in bacterial strains, while capital letters indicate differences in nitrogen concentrations for each bacterial strain or treatment without inoculation.

### 3.1.3.2. Dry Weight and Fresh Weight

Both fresh weight and dry weight of the strawberries shoot showed high variability within treatments (Tables 2A and 2B). For example, treatments with HN2S, HN3F, and ZN3F had fresh weights of 5.7 and 39 grams, 3 and 29.2 grams, and 1.7 and 22.5 grams, respectively. Thus, the fresh weight and dry weight of the shoot were not statistically different in most treatments.

However, as shown in Tables 3A and 3B, there was statistical difference for the inoculation form in the treatment with *Azospirillum brasilense* strain HM053 + 50% N and without inoculation + 100% nitrogen. For both treatments, soil inoculation led to a 48.23% and 36.52% increase in relation to inoculation by leaf aspersion. The HN3F treatment ( $21.77 \pm 10.3$ ) was also superior to the other treatments, with a 59.26% increase in fresh weight compared to the ZN0S treatment ( $8.87 \pm 3.52$ ), and it was equal to the control treatment without inoculation with a full dose of nitrogen ( $21.19 \pm 5.97$ ).

**Table 3:** Fresh weight (A) and dry weight (B) of the strawberries inoculated with *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and HM053 by leaf aspersion or in the soil, and strawberries without inoculation (W/I), associated with four different nitrogen doses.

| Dose of N (%) | Shoot fresh weight (g) |               |                  |                  |               |                 |
|---------------|------------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|-----------------|
|               | Leaf aspersion         |               |                  | Soil inoculation |               |                 |
|               | HM053                  | Ab-V5         | W/I              | HM053            | Ab-V5         | W/I             |
| 0             | 10.99 ± 3.67           | 7.84 ± 1.63   | 6.25 ± 3.41 B    | 8.47 ± 2.17 B    | 10.87 ± 2.74  | 8.87 ± 3.52 B   |
| 25            | 13.12 ± 3.93 ab        | 9.37 ± 7.17 b | 19.97 ± 6.24 aA  | 13.07 ± 5.70 AB  | 11.55 ± 4.65  | 14.35 ± 4.69 AB |
| 50            | 11.27 ± 5.0 b          | 11.22 ± 3.44  | 11.17 ± 8.72 AB  | 21.77 ± 10.3 aAa | 5.17 ± 1.52 b | 11.37 ± 7.54 bB |
| 100           | 11.12 ± 9.20           | 12.47 ± 5.82  | 13.45 ± 2.71 ABb | 18.12 ± 8.48 A   | 12.47 ± 5.82  | 21.19 ± 5.97 Aa |

| Dose of N (%) | Shoot dry weight (g) |               |                         |                  |               |                |
|---------------|----------------------|---------------|-------------------------|------------------|---------------|----------------|
|               | Leaf aspersion       |               |                         | Soil inoculation |               |                |
|               | HM053                | Ab-V5         | W/I                     | HM053            | Ab-V5         | W/I            |
| 0             | 3.93 ± 1.40          | 2.36 ± 0.59   | 2.16 ± 0.99 B           | 2.93 ± 0.68 B    | 3.30 ± 0.69   | 2.96 ± 1.25 B  |
| 25            | 4.10 ± 1.25 ab       | 3.21 ± 2.22 b | 6.44 ± 2.69 aA          | 4.36 ± 1.40 AB   | 3.64 ± 1.52   | 4.40 ± 1.40 AB |
| 50            | 3.69 ± 1.49 <b>b</b> | 3.80 ± 1.36   | 3.36 ± 2.19 B           | 6.42 ± 2.52 aAa  | 2.34 ± 0.53 b | 3.40 ± 1.74 bB |
| 100           | 3.39 ± 3.10          | 4.14 ± 1.82   | 3.95 ± 0.80 AB <b>b</b> | 5.58 ± 2.26 AB   | 4.70 ± 2.65   | 6.40 ± 1.75 Aa |

Interaction among nitrogen doses (columns), inoculated microorganisms (rows), and inoculation method (leaf aspersion or in soil inoculation). Means are followed by their standard deviations. Means followed by the same capital or lowercase letter do not differ statistically according to Tukey's test at 5% significance. Lowercase letters indicate differences in bacterial strains, while capital letters indicate differences in nitrogen concentrations, and lowercase letters in italics and bold indicate differences in inoculation method.

### 3.1.3.3 Root Length, Fresh and Dry Weights

No significant differences were observed for fresh and dry weights of the roots. However, the results presented in Table 4 show that there was a significant effect and interaction between the inoculated strains, nitrogen doses, and inoculation method for root length. Strawberries inoculated with strain HM053 did not differ from each other, however, the higher root length was observed in plants sprayed with HM053 + 25% N ( $34.08 \pm 2.84$  cm).

**Table 4:** Root length of strawberries inoculated by leaf aspersion or in the soil with *Azospirillum brasilense* Ab-V5, *Azospirillum brasilense* HM053 or without inoculation (W/I), associated with four different nitrogen concentrations.

| Dose of N (%) | Root length (cm) |                       |                       |                  |                          |                       |
|---------------|------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|--------------------------|-----------------------|
|               | Leaf aspersion   |                       |                       | Soil inoculation |                          |                       |
|               | HM053            | Ab-V5                 | W/I                   | HM053            | Ab-V5                    | W/I                   |
| 0             | 29.47 ± 2.54     | 26.13 ± 3.09          | 23.67 ± 3.40 <b>b</b> | 25.50 ± 3.13     | 33.91 ± 1.78 A           | 33.33 ± 5.15 <b>a</b> |
| 25            | 34.08 ± 2.84     | 26.87 ± 2.76          | 33.50 ± 4.07          | 33.08 ± 4.03     | 32.63 ± 2.88 A           | 33.50 ± 8.59          |
| 50            | 26.29 ± 3.52     | 29.14 ± 5.43 <b>a</b> | 24.50 ± 3.40          | 29.22 ± 3.20 a   | 19.67 ± 1.30 bB <b>b</b> | 30 ± 1.63 a           |
| 100           | 27.21 ± 3.06     | 28.14 ± 3.37          | 30.08 ± 5.97          | 33.75 ± 2.95     | 28.13 ± 3.37 AB          | 28.41 ± 2.79          |

Interaction among nitrogen doses (columns), inoculated microorganisms (rows), and inoculation method (leaf aspersion or soil inoculation). Means are followed by their standard deviations. Means followed by the same capital or lowercase letter do not differ statistically according to Tukey's test at 5% significance. Lowercase letters indicate differences in bacterial strains, while capital letters indicate differences in nitrogen concentrations, and lowercase letters in italics and bold indicate differences in inoculation method.

Nitrogen concentration showed an effect only for plants inoculated in the soil with the Ab-V5 strain, treatments without nitrogen ( $33.91 \pm 1.78$  cm) and with 25% nitrogen ( $32.63 \pm 2.88$  cm) were superior to the others. Whereas strawberries inoculated by leaf aspersion and 50% nitrogen had a 32.50% increase in their root length when compared to strawberries inoculated in soil with Ab-V5 + 50% nitrogen.

### 3.1.3.4 Total Biomass

Regarding the total biomass (Table 5), obtained by summing the dry weights of the root and shoot, significant differences were observed between the inoculated strains only for the concentrations of 25% (leaf aspersion) and 50% (soil inoculation) of nitrogen.

Among the plants inoculated by leaf aspersion and associated with 25% nitrogen (HN1F, AN1F, and ZN1F), the treatment without inoculation had the highest biomass value ( $13.94 \pm 4.56$  g), while the strawberries inoculated with the Ab-V5 strain had the lowest value ( $6.24 \pm 4.07$  g). For plants inoculated in the soil and associated with 50% nitrogen (HN2S, AN2S, and ZN2S), strain HM053 ( $12.44 \pm 3.75$  g) was superior to strain Ab-V5 ( $5.54 \pm 3.19$  g) and statistically equal to the treatment without inoculation ( $11.92 \pm 5.04$  g).

The soil inoculation with HM053 + 50% of nitrogen ( $12.44 \pm 3.75$ ) can also be considered statistically equal to the control treatment with 100% nitrogen ( $11.77 \pm 4.10$  g), showing a 35.21% increase over the treatment without inoculation and no nitrogen ( $8.06 \pm 4.07$ g).

**Table 5:** Total biomass of strawberries inoculated by leaf aspersion or in the soil with *Azospirillum brasilense* Ab-V5, *Azospirillum brasilense* HM053 or without inoculation (W/I), associated with four different nitrogen concentrations.

| Dose of N (%) | Total biomass (g)        |                   |                     |                              |                   |                    |
|---------------|--------------------------|-------------------|---------------------|------------------------------|-------------------|--------------------|
|               | Leaf aspersion           |                   |                     | Soil inoculation             |                   |                    |
|               | HM053                    | Ab-V5             | W/I                 | HM053                        | Ab-V5             | W/I                |
| 0             | $8.61 \pm 1.63$          | $5.97 \pm 2.49$   | $4.55 \pm 1.56$ B   | $5.40 \pm 1.75$ B            | $6.67 \pm 0.89$   | $8.06 \pm 4.07$    |
| 25            | $8.86 \pm 1.87$ ab       | $6.24 \pm 4.07$ b | $13.94 \pm 4.56$ aA | $9.13 \pm 1.85$ AB           | $8.04 \pm 3.08$   | $10.39 \pm 2.55$   |
| 50            | $7.41 \pm 3.17$ <b>b</b> | $9.28 \pm 3.53$   | $8.46 \pm 6.07$ AB  | $12.44 \pm 3.75$ aA <b>a</b> | $5.54 \pm 3.19$ b | $11.92 \pm 5.04$ a |
| 100           | $7.32 \pm 5.25$          | $9.69 \pm 3.14$   | $8.93 \pm 2.91$ AB  | $11.56 \pm 4.43$ AB          | $10.09 \pm 4.18$  | $11.77 \pm 4.10$   |

Interaction among nitrogen doses (columns), inoculated microorganisms (rows), and inoculation method (leaf aspersion or soil inoculation). Means are followed by their standard deviations. Means followed by the same capital or lowercase letter do not differ statistically according to Tukey's test at 5% significance. Lowercase letters indicate differences in bacterial strains, while capital letters indicate differences in nitrogen concentrations, and lowercase letters in italics and bold indicate differences in inoculation method.

Regardless of the inoculation method, the fresh and dry weights of the shoot and the total biomass tended to decrease for the full doses of nitrogen (370 mg per pot) associated with the *Azospirillum brasilense* strain HM053. For example, the fresh weight of the treatment with HM053 + 100% of nitrogen inoculated in the soil (Table 3A) was 16.76% lower than that of the treatment with HM053 + 50% of nitrogen inoculated in the soil. As for the dry weight (Table 3B), the treatment sprinkled with HM053 + 100% of nitrogen was 8.13% lower than the treatment sprinkled with HM053 + 50% of nitrogen. Furthermore, a 7.07% reduction in total biomass (Table 5) was observed for the treatment with HM053 + 100% of nitrogen inoculated in the soil compared to treatment with HM053 + 50% of nitrogen in the same conditions.

### 3.1.4 DISCUSSION

In this study, two strains of *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 and HM053) were evaluated as possible inoculants in strawberry cultures. Both strains have been reported in the literature for their ability to promote plant growth directly through Biological Nitrogen Fixation (Pedrosa et al. 2020; Santos et al. 2017a), phytohormone production (Barbosa et al. 2022;

Fukami et al. 2017), phosphate solubilization (Silva et al. 2022), siderophore production (Delaporte-Quintana et al. 2020; Silva et al. 2018), biotic and abiotic stress control (Fukami et al. 2017; Fukami et al. 2018), or indirectly by inducing systemic resistance (Hosseini et al. 2022). The results obtained in the present study are in agreement with those demonstrated by several authors for crops such as wheat, corn, and strawberry (Barbosa et al. 2022; Chandramohan Reddy and Goyal 2020; de Andrade et al. 2019; de Moura et al. 2022; Santos et al. 2017a; Seema et al. 2018; Silva et al. 2022). In general, the use of the *A. brasilense* Ab-V5 and HM053 strains, associated with doses of 25% and 50% nitrogen, led to an increase in shoot length, number of leaves, root length, and total biomass in relation to the control without inoculation.

The full dose of nitrogen, regardless of inoculation, resulted in higher average shoot length. Similarly, Chandramohan Reddy and Goyal (2020) obtained higher shoot length and number of leaves in strawberry plants grown in a greenhouse and inoculated with *Azospirillum* or *Azotobacter* associated with high nitrogen doses. However, de Andrade et al. (2019), described higher shoot for cv. Aromas, grown in a greenhouse when inoculated with *Enterobacter cloacae* CCMA 1285, *Azospirillum brasilense* Ab-V5 + *Burkholderia cepacia* CCMA 0056 and *Azospirillum brasilense*-Ab-V5 + *Burkholderia cepacia* CCMA 0056 + *Enterobacter cloacae* CCMA 1285, with a 30%, 31% and 35% increase in shoot length, respectively, in relation to the control without inoculation. Silva et al. (2022), cultivating strawberries, cv. Aromas, in a greenhouse, observed higher shoot growth after 15 days of inoculation associated with 30% of the recommended dose of nitrogen and phosphorus.

Each PGPB has different mechanisms to promote plant growth (Azizoglu et al. 2021; Cassán et al. 2020). Similarly, each strawberry cultivar responds differently to the use of biofertilizers (De Moura et al. 2022; Morais et al. 2019). Such characteristics, associated with the experiment's design, such as the frequency of reinoculation, in the case of Silva et al. (2022), and the use of nutrient solutions, in the case of Andrade et al. (2019), could explain the differences between their results and ours.

On the other hand, Morais et al. (2019), did not observe significant differences in shoot length and number of leaves after inoculation in strawberry plants grown in a greenhouse. This indicates only a trend towards an increase in shoot length in inoculated plants. Although we found that when the *A. brasilense* strain HM053 was used in association with nitrogen doses of 0%, 25%, and 50%, the number of leaves and shoots increased, when compared with the Ab-V5 strain and the plants without inoculation associated with the same nitrogen doses.

Regarding biomass, soil inoculation with HM053 + 50% nitrogen led to an increase of more than 30% compared to treatment without inoculation (ZN0). Similar results were described by Elias et al. (2018), with a 51% increase in total biomass of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense* REC3 compared to the control without inoculation. De Andrade et al. (2019) reported that in the presence of 50% nitrogen fertilizer, the association of PGPB *Enterobacter cloacae* CCMA 1285, *Azospirillum brasilense* Ab-v5 + *Burkholderia cepacia*-CCMA 0056 resulted in a 60.61% increase in total biomass in strawberries. Meanwhile de Moura et al. (2022) reported a 279% increase in the biomass of plants inoculated with *Brevibacillus fluminis* (MET12M2) when compared to non-inoculated strawberries.

Such results suggest that the inoculated microorganisms were able to mitigate part of the nitrogen required by cv. Festival. Well-nourished plants, with a good accumulation of nitrogen, usually show greater vegetative growth and, consequently, higher levels of photosynthesis, increasing the total biomass of the plant (Chandramohan Reddy and Goyal 2020; De Andrade et al. 2019; Elias et al. 2018; Guerrero-Molina et al. 2014).

Root length was also significantly influenced by inoculation and nitrogen doses. One of the main characteristics of *A. brasilense*, other than the BNF, is the synthesis of phytohormones, such as indoleacetic acid (IAA) (Cassan et al. 2020), and both Ab-V5 and HM053 strains are able to synthesize IAA (Barbosa et al. 2022; Housh et al. 2021). Auxins are responsible for root elongation and induction of lateral roots (De Andrade et al. 2019; Silva et al. 2022), increasing root surface area and allowing the plant to explore new areas of soil in search of water and nutrients (Barbosa et al. 2022).

As previously described, plants inoculated in soil with the *A. brasilense* HM053 strain obtained higher biometric parameters compared to those inoculated with *A. brasilense* Ab-V5. These findings are consistent with numerous studies conducted with this strain on grasses. For example, Santos et al. (2017a) reported improvement in plant size, as well as a 30% and 49% increase in root and shoot dry weights, respectively, of wheat plants inoculated with HM053. In their investigation of the effects of the *A. brasilense* strain HM053, Pedrosa et al. (2020) demonstrated a significant increase in corn yield (460,5 a 1769,3 kg ha<sup>-1</sup>) of cultivars inoculated with the strain and associated with base fertilization (30 kg ha<sup>-1</sup> N). Housh et al. (2021) reported that inoculation with HM053 improved iron assimilation and translocation in maize plants.

Although our study is a pioneer in testing the ability of *A. brasilense* HM053 as a growth promoter in fruit trees, especially in strawberry crops, its ability to fix nitrogen constitutively and excrete part of the fixed ammonium to the plant (Ghenov et al., 2021), as well as its positive

effect on grasses, allows us to suggest that *A. brasilense* HM053 acted as a growth promoter, improving the biometric attributes of Festival cultivar strawberries.

### 3.1.5 CONCLUSION

The results obtained with the inoculation of *Azospirillum brasilense* HM053 suggest that this strain may be mitigating part of the daily nitrogen required for strawberry cultivation. This could lead to a 75% to 50% reduction in the use of nitrogen fertilizers, decreasing production costs and environmental impacts.

The benefits observed with *Azospirillum brasilense* HM053 on the biometric parameters of strawberry cv. Festival plants make this plant growth-promoting bacteria a promising biofertilizer for strawberry cultivation. However, further studies are required to evaluate the effects of this strain on strawberry crops in open fields.

### 3.2 O mutante funcional *Azospirillum brasilense* HM053 promove o desenvolvimento de morangueiros e aumenta a produtividade e qualidade de frutos de morango

#### RESUMO

ALTHAUS, H. V. **O mutante funcional *Azospirillum brasilense* HM053 promove o desenvolvimento de morangueiros e aumenta a produtividade e qualidade de frutos de morango** Orientador: Ricardo Antonio Ayub. Ponta Grossa, 2023. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2023.

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) é apreciado mundialmente por suas características organolépticas e nutracêuticas, destacando-se como a espécie mais cultivada entre os pequenos frutos. Porém, sua produção é intensiva e requer o uso de elevados aportes de fertilizantes nitrogenados. A utilização de rizobactérias promotoras do crescimento vegetal como biofertilizantes para o fornecimento de nitrogênio é uma alternativa promissora na busca pela segurança alimentar, agricultura sustentável e redução nos custos de produção. Nesse estudo avaliamos o efeito de duas estirpes de *Azospirillum brasilense*, o inoculante comercial Ab-V5 e o mutante espontâneo e excretor de amônio HM053, associadas a quatro doses de nitrogênio e duas formas de inoculação (aspersão foliar e no solo) no desenvolvimento, produção e qualidade de morangos, cultivar Florida Festival, cultivados em duas safras consecutivas em condições de campo. A cultura do morango respondeu positivamente à inoculação de ambas as estirpes de *Azospirillum*. A associação de *A. brasilense* HM053 com doses reduzidas de nitrogênio (0 a 50%) mostrou-se eficaz na grande maioria dos parâmetros avaliados, apresentando resultados equivalentes ou superiores às plantas sem inoculação e aplicação de 100% de nitrogênio. A substituição de 75% do adubo nitrogenado por *A. brasilense* HM053 mostrou potencial em reduzir os custos de produção em cerca de 198 reais por hectare, enquanto aumentaria a produtividade em aproximadamente 2,92 t.ha. Essa substituição ainda permitiria a redução na emissão de 945 kg de CO<sub>2</sub>-e por hectare cultivado. Os resultados obtidos destacam o potencial da estirpe *A. brasilense* HM053 como biofertilizante para morangueiros.

**Palavras – chave:** Agricultura sustentável; Biotecnologia; Rizobacterias promotoras do crescimento vegetal;

#### ABSTRACT

ALTHAUS, H. V. **The functional mutant *Azospirillum brasilense* HM053 promotes the development of strawberry plants and increases the productivity and quality of strawberry fruits.** Advisor: Ricardo Antonio Ayub. Ponta Grossa, 2023. Thesis (Ph.D. in Agronomy) – Graduate Program in Agronomy, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2023.

Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) is globally appreciated for its organoleptic and nutraceutical characteristics, standing out as the most cultivated species among small fruits. However, its production is intensive and requires the use of high inputs of nitrogen fertilizers. The use of plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers for nitrogen supply is a promising alternative in the pursuit of food security, sustainable agriculture, and reduction in production costs. In this study, we evaluated the effect of two strains of *Azospirillum brasilense*, the commercial inoculant Ab-V5 and the spontaneous mutant and ammonium excreting

HM053, associated with four doses of nitrogen and two inoculation methods (foliar spraying and soil inoculation) on the development, production, and quality of strawberries, cultivar Florida Festival, grown in two consecutive seasons under field conditions. Strawberry cultivation responded positively to inoculation with both strains of *Azospirillum*. The association of *A. brasilense* HM053 with reduced doses of nitrogen (0 to 50%) proved effective in the vast majority of the evaluated parameters, showing equivalent or superior results to non-inoculated plants and application of 100% nitrogen. The substitution of 75% of nitrogen fertilizer by *A. brasilense* HM053 showed potential to reduce production costs by approximately 198 reais per hectare, while increasing productivity by approximately 2.92 t.ha. This substitution would also allow a reduction in the emission of 945 kg CO<sub>2</sub>-e per cultivated hectare. The results highlight the potential of the strain *A. brasilense* HM053 as a biofertilizer for strawberry plants.

**Keywords:** Sustainable agriculture; Biotechnology; Plant growth-promoting rhizobacteria.

### 3.2.1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e a segurança alimentar vêm aumentando a procura global por alimentos nutritivos. Segundo a Organização para Alimentação e Agricultura (FAO), a população mundial irá crescer cerca de 35% até 2050, elevando em 60 a 110% a demanda por produtos agrícolas (Nosheen *et al.*, 2021; da Silva *et al.*, 2022). Ampliar a produção agrícola e manter o meio ambiente seguro é um dos maiores desafios do século XXI.

A agricultura convencional, visando alto rendimento e commodities de boa qualidade, tornou-se dependente de fertilizantes químicos e pesticidas, que, embora contribuam para o sucesso das culturas agrícolas, causam diversos impactos negativos ao ambiente e a saúde humana (Bhardwaj *et al.*, 2014; de Andrade *et al.*, 2019; Pathania *et al.*, 2020; Nosheen *et al.*, 2021; Daniel *et al.*, 2022). O morango destaca-se no cenário econômico como a principal espécie cultivada entre os pequenos frutos, devido suas características organolépticas e propriedades benéficas a saúde humana (Flores-Félix *et al.*, 2018; Chebotar *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2022), contudo, seu cultivo é, em sua maioria, realizado de forma intensiva e com elevados aportes de fertilizantes nitrogenados (Delaporte-Quintana *et al.*, 2017; Valle-Romero *et al.*, 2023).

As rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (RPCV) são uma alternativa promissora para agricultura sustentável, aptos a aumentar o crescimento e rendimento das plantas, melhorar a tolerância ao estresse biótico e abiótico e manter a fertilidade do solo, podem ser empregadas como biofertilizantes, pesticidas e agentes fitorremediadores (Ramakrishna *et al.*, 2019; Pathânia *et al.*, 2020; Kong; Liu, 2022; Baruá *et al.*, 2023). Dentre as RPCV, o gênero *Azospirillum*, com ênfase em *Azospirillum brasilense*, é atualmente um dos mais estudados e destaca-se por sua notável capacidade de colonizar mais de 100 espécies

vegetais, a maioria de interesse agrícola, melhorando o crescimento, desenvolvimento e produtividade das culturas em condições de campo, levando a diminuição no uso de pesticidas e fertilizantes nitrogenados, e consequente redução dos custos de produção (Döbereiner, 1992; Bashan; de Bashan, 2010; Hungria *et al.*, 2010; Fukami *et al.*, 2016; Pedrosa *et al.*, 2020; Housh *et al.*, 2021; Barbosa *et al.*, 2022).

Uma abordagem inovadora na produção de biofertilizantes para fornecimento de nitrogênio é o estudo de mutantes espontâneos excretadores de amônio (Cassan *et al.*, 2020; Housh *et al.*, 2021). O mutante espontâneo na glutamina sintetase (GS) *A. brasilense* HM053, derivado do *A. brasilense* Sp7 (Sp7 ATCC 29145, Sm<sup>R</sup>, Nal<sup>R</sup>), é resistente à etilenodiamina e capaz de fixar nitrogênio e excretar amônio constitutivamente, mesmo na presença de altas concentrações de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Machado *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 2017a; Pedrosa *et al.*, 2020). A utilização dessa estirpe em culturas de cereais vem mostrando efeito positivo na colonização das raízes e aumento nos parâmetros de crescimento e produção de cevada (Santos *et al.*, 2017b), trigo (Santos *et al.*, 2017a) e milho (Pedrosa *et al.*, 2020; Scott *et al.*, 2020).

A eficiência do gênero *Azospirillum* como promotor do crescimento vegetal em morangos é bem relatada na literatura (Pedraza *et al.*, 2007; Lovaisa *et al.*, 2015; Elias *et al.*, 2017; Andrade *et al.*, 2019; Soltaniband *et al.*, 2022; da Silva *et al.*, 2022), porém o mutante espontâneo e excretor de amônia HM053 ainda é pouco explorado como biofertilizante para culturas frutíferas. De modo semelhante, a forma de aplicação do inoculante em morangueiros é pouco explorada na literatura, a inoculação foliar é normalmente adotada com o propósito primário de evitar a exposição dos microrganismos à pesticidas potencialmente nocivos que possam ter sido aplicados nas sementes. Embora as raízes dos morangueiros não sejam comumente submetidas à aplicação de pesticidas, a utilização da pulverização foliar pode oferecer uma alternativa conveniente para os produtores de morangos.

Assim, associamos a inoculação de plantas de morango com duas estirpes de *A. brasilense*, Ab-V5 (=CNPSO 2083), utilizada como inoculante comercial no Brasil, e HM053, caracterizado como excretor de amônia, de forma separada. Essas inoculações foram combinadas à aplicação de quatro diferentes doses de nitrogênio. Em seguida, avaliamos o potencial dessas combinações como biofertilizantes no desenvolvimento, produção e qualidade de morangos (cv Florida Festival) cultivados em duas safras consecutivas em condições de campo.

### 3.2.2 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.2.2.1 Material Vegetal

Mudas de morangueiros da cultivar Florida Festival foram selecionadas para condução do presente estudo. O experimento foi realizado em condições de campo, utilizando um canteiro de dimensões 33 m x 1,5 m (totalizando 49,5 m<sup>2</sup>), revestido com lona plástica coextrusada dupla face. O experimento foi conduzido na Paróquia Bom Jesus, situada em Ponta Grossa, Paraná, Brasil, sob as coordenadas geográficas 25°05'44.8"S e 50°07'30.5"W. Ponta Grossa está localizada no Segundo Planalto Paranaense, a uma altitude de 969 metros acima do nível do mar. O clima da região, de acordo com a classificação de Köppen, é do tipo Cfb, caracterizado como temperado, sem estação seca, com chuvas bem distribuídas e verão ameno. A precipitação média anual varia de 1.400 a 1600 mm, e a temperatura média anual varia de 17,1 a 18 °C. A temperatura máxima anual varia de 24,1 a 25 °C com valores absolutos entre 32,1 a 33°C, enquanto a temperatura mínima anual varia de 13,1 a 14 °C, com valores absolutos entre 0 e -0,9°C (Nitsche, *et al.*, 2019). O solo é classificado como Latosolo Vermelho-Escuro, apresentando boa profundidade e drenagem. As propriedades químicas do solo estão detalhadas na tabela 6. A irrigação do canteiro experimental foi realizada durante 30 minutos, três a quatro vezes por semana.

**Tabela 6:** Propriedades químicas do solo da Paróquia Bom Jesus, Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

| pH                | (H+Al)  | Al   | Ca    | Mg   | K    | CTC <sup>1</sup> | P <sup>2</sup>     | C     | V <sup>3</sup> |
|-------------------|---|------|-------|------|------|------------------|--------------------|-------|----------------|
| CaCl <sub>2</sub> | .....Cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> ..... |      |       |      |      |                  | mg dm <sup>3</sup> | g Kg  | %              |
| 7,1               | 1,87  | 0,00 | 11,20 | 3,70 | 0,56 | 16,14            | 49,17              | 46,16 | 87,97          |

<sup>1</sup>Capacidade de troca catiônica pH 7,0; <sup>2</sup>P extraído com solução Mehlich<sup>-1</sup>; <sup>3</sup>Saturação por bases.

#### 3.2.2.2 Inóculo Bacteriano

As estirpes de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 (=CNPSo 2083) e HM053, derivada de *A. brasilense* Sp7 (Sp7 ATCC 29145 Nif<sup>+</sup>, Sm<sup>r</sup>, Nal<sup>r</sup>) (Machado *et al.*, 1991; Hungria *et al.*, 2010), foram obtidas das coleções de culturas microbianas do Laboratório de Biologia Molecular Microbiana (LABMOM) – Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, Paraná, Brasil e do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil, respectivamente.

Culturas puras foram preparadas individualmente em meio malato livre de nitrogênio (NFb) líquido (Machado *et al.*, 1991; Baldani *et al.*, 2014), e suplementados com 50 mM de solução de fosfato, 20 mM de cloreto de amônia (NH<sub>4</sub>Cl) e 100 µg ml<sup>-1</sup> de biotina. Adicionalmente, foram acrescentados os antibióticos ácido nalidíxico (10 µg ml<sup>-1</sup>) e estreptomicina

(80  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). As culturas foram mantidas em agitador orbital a 180 rpm e  $28 \pm 2$  °C, sendo o tempo de incubação de 24 horas para estirpe Ab-V5 e 28 horas para HM053. A concentração bacteriana final para inoculação das plantas foi ajustada para  $10^9$  UFC/ml (DO 600<sub>nm</sub> ~ 1.0).

### 3.2.2.3 Desenho Experimental

O experimento foi conduzido em blocos inteiramente casualizado, onde cada planta representou um tratamento e cada tratamento foi replicado seis vezes. O arranjo experimental adotado foi um fatorial triplo (3x4x2) considerando os seguintes fatores: Fator 1: utilização individual dos inoculantes contendo *Azospirillum brasilense* Ab-V5 ou HM053, ou ausência de inoculante; Fator 2: aplicação de quatro diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg) da recomendação para a cultura) (SBCS/NEPAR, 2017; Chandramohan Reddy; Goyal, 2020); Fator 3: método de inoculação, no solo próximo às raízes ou por aspersão foliar.

O período experimental abrangeu dois anos, com a inoculação das plantas sendo realizada 30 dias após o transplântio (junho de 2020) e um ano após o início do experimento (junho de 2021), utilizando 1 ml ( $10^9$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) do respectivo inoculante. As plantas dos tratamentos que não receberam inoculante foram irrigadas com 1 ml de água destilada esterilizada. Ureia agrícola (46% N) diluída em água (1g de ureia. 100 ml de água ultrapura) foi utilizada como fonte de nitrogênio. A aplicação de ureia foi dividida em duas doses por safra, em junho e setembro de cada ano. As plantas dos tratamentos que não receberam nitrogênio foram irrigadas com a mesma quantidade de água destilada esterilizada. Os tratamentos utilizados estão descritos na tabela 7.

**Tabela 7:** Tratamentos aplicados, estirpes utilizadas, concentração de nitrogênio e forma de inoculação dos microrganismos.

| Tratamentos   | Id   | Método utilizado   |
|---------------|------|--|
| Tratamento 1  | ZN0S | Sem inoculação (S/I) + 0% nitrogênio + inoculação no solo                  |
| Tratamento 2  | ZN0F | Sem inoculação (S/I) + 0% nitrogênio + aspersão foliar                     |
| Tratamento 3  | ZN1S | Sem inoculação (S/I) + 25% nitrogênio + inoculação no solo                 |
| Tratamento 4  | ZN1F | Sem inoculação (S/I) + 25% nitrogênio + aspersão foliar                    |
| Tratamento 5  | ZN2S | Sem inoculação (S/I) + 50% nitrogênio + inoculação no solo                 |
| Tratamento 6  | ZN2F | Sem inoculação (S/I) + 50% nitrogênio + aspersão foliar                    |
| Tratamento 7  | ZN3S | Sem inoculação (S/I) + 100% nitrogênio + inoculação no solo                |
| Tratamento 8  | ZN3F | Sem inoculação (S/I) + 100% nitrogênio + aspersão foliar                   |
| Tratamento 9  | HN0S | <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 + 0% nitrogênio + inoculação no solo  |
| Tratamento 10 | HN0F | <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 + 0% nitrogênio + aspersão foliar     |
| Tratamento 11 | HN1S | <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 + 25% nitrogênio + inoculação no solo |
| Tratamento 12 | HN1F | <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 + 25% nitrogênio + aspersão foliar    |
| Tratamento 13 | HN2S | <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 + 50% nitrogênio + inoculação no solo |

|               |      |   |
|---------------|------|---|
| Tratamento 14 | HN2F | <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 + 50% nitrogênio + aspersão foliar     |
| Tratamento 15 | HN3S | <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 + 100% nitrogênio + inoculação no solo |
| Tratamento 16 | HN3F | <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 + 100% nitrogênio + aspersão foliar    |
| Tratamento 17 | AN0S | <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 + 0% nitrogênio + inoculação no solo   |
| Tratamento 18 | AN0F | <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 + 0% nitrogênio + aspersão foliar      |
| Tratamento 19 | AN1S | <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 + 25% nitrogênio + inoculação no solo  |
| Tratamento 20 | AN1F | <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 + 25% nitrogênio + aspersão foliar     |
| Tratamento 21 | AN2S | <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 + 50% nitrogênio + inoculação no solo  |
| Tratamento 22 | AN2F | <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 + 50% nitrogênio + aspersão foliar     |
| Tratamento 23 | AN3S | <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 + 100% nitrogênio + inoculação no solo |
| Tratamento 24 | AN3F | <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 + 100% nitrogênio + aspersão foliar    |

#### 3.2.2.4 Avaliação dos Parâmetros Biométricos das Plantas

A altura das plantas e área foliar (distância entre as duas maiores folhas opostas) foram medidas de forma bimestral com auxílio de uma fita métrica e expressas em centímetros (cm), o número de folhas por roseta foi contabilizada no mesmo período.

Ao final do segundo ano de experimento, as plantas de morango foram cuidadosamente removidas do solo, identificadas de acordo com o tratamento, acondicionados em sacos plásticos estéreis e levadas ao laboratório, onde a parte aérea foi separada das raízes e as seguintes características foram avaliadas: (I) Peso fresco da parte aérea e das raízes obtidos com o auxílio de uma balança digital de precisão e expressos em gramas (g); (II) Comprimento das raízes, realizado com auxílio de um paquímetro digital e expressos em centímetros (cm); (III) peso seco da parte aérea e das raízes, determinado através da secagem em estufa a 60° C durante 72 h até atingir peso constante. As amostras secas foram então pesadas em uma balança digital de precisão e os pesos expressos em gramas (g); (IV) biomassa total, calculada pela soma do peso seco da parte aérea e das raízes (Elias *et al.*, 2018; Delaporte-Quintana *et al.*, 2020).

#### 3.2.2.5 Análises Físico Químicas do Fruto

Os frutos maduros foram colhidos de três a quatro vezes por semana e imediatamente avaliados para as seguintes características: (I) peso fresco, com auxílio de uma balança digital de precisão e expresso em gramas (g); (II) diâmetro e largura, com auxílio de um paquímetro digital e expresso em milímetros (mm); (III) firmeza da polpa, utilizando um penetrômetro digital de 6,0 mm. Cada fruta foi furada uma vez na região equatorial e os resultados foram expressos em Newton (N); (IV) coloração, onde as frutas foram medidas na região equatorial com um colorímetro Minolta CR 400. A cor foi registada utilizando o espaço de cor uniforme CIE-L\*C\*h° (CIE-LCh), onde L\* indica luminosidade (0 = preto e 100 = branco), C\* indica o “croma”, ou saturação da cor, e h° indica o ângulo de tonalidade (Figura 11). O valor de croma

foi calculado pela equação  $\sqrt{(a^*)^2+(b^*)^2}$ , enquanto o ângulo Hue foi calculado pela equação  $h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$  quando  $a^* > 0$  e  $b^* > 0$  ou pela equação  $h^\circ = 180 + \tan^{-1}(a^*/b^*)$ , onde  $a^*$  indica valores num eixo verde (-) a vermelho (+) e  $b^*$  valores num eixo azul (-) a amarelo (+). O ângulo Hue é expresso em graus, onde 0 representa  $+a^*$  (vermelho), 90 representa  $+b^*$  (amarelo), 180 representa  $-a^*$  (verde) e 270 representa  $-b^*$  (azul).

O número de frutos por planta foi contabilizado ao final de cada ano experimental e a produção (massa média de frutos por planta) foi expressa em gramas (g). O peso médio do fruto foi calculado dividindo-se a massa média pelo número médio de frutos por tratamento e expressa em gramas (g).

#### 3.2.2.5.1 Sólidos solúveis (SS), acidez titulável e pH

Aproximadamente dez frutos maduros por tratamento (100 g) foram selecionados e macerados em almofariz esterilizado. O suco resultante da maceração foi filtrado e utilizado para medir o teor de sólidos solúveis (SS), pH e acidez titulável. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O teor de sólidos solúveis foi determinado com auxílio de um refratômetro portátil (Atago PAL-1 (3810), Tóquio, Japão) e os resultados foram expressos em °Brix. Enquanto a determinação do pH foi realizada com um pHmetro digital (Tecnal, R-TEC-7-MP) devidamente calibrado.

A acidez titulável foi determinada por titulometria de acordo com a AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (2020), misturando-se 5 ml do suco dos morangos a 15 ml de água destilada autoclavada. Às soluções foram adicionadas 3 gotas de indicador fenolftaleína e o volume final de 20 ml foi titulado com NaOH (1 mol L<sup>-1</sup>) até a obtenção de uma coloração rosa escura constante. Os resultados foram expressos em % de ácido cítrico, segundo a fórmula:

$$\% \text{ ácido} = V \times F \times M \times PM / 10 \times P \times n$$

Onde:

V (ml) = volume de NaOH gasto na titulação;

F = fator de correção da solução de NaOH;

PM = peso molecular do ácido predominante na amostra;

P = peso ou volume da amostra (g ou ml);

M = molaridade da solução de NaOH (0.1 ou 1 mol L<sup>-1</sup>)

n = número de H<sup>+</sup> ionizáveis (3 para ácido cítrico)

#### 3.2.2.5.2 Compostos fenólicos, antocianinas e capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante, compostos fenólicos e antocianinas totais foram determinados a partir de aproximadamente 20 frutos maduros (200 g) por tratamento. Os

morangos foram divididos em dois grupos homogêneos de 10 frutos (100 g) e macerados em 25 ml de água destilada autoclavada ou 25 ml de metanol absoluto e filtrados em camada única de tecido 100% algodão. O filtrado foi utilizado de acordo com cada análise. Todas as análises foram realizadas em triplicata e na penumbra.

Os compostos fenólicos totais foram medidos utilizando o ensaio com o reagente de Folin-Ciocalteu (Folin e Ciocalteu, 1927) adaptada de Singleton e Rossi (1965) para microplacas de 96 poços. Às microplacas foram adicionados 25 µL de cada amostra macerada em água, 200 µL de água ultrapura autoclavada e 25 µL da solução de Folin-Ciocalteu (2 mol L<sup>-1</sup>). As microplacas foram deixadas em repouso no escuro por 5 minutos. Na sequência, à cada poço foi adicionado 25 µL de solução de carbonato de sódio (10%) e a solução foi homogeneizada por 20 segundos. As placas foram então encubadas no escuro por 1 hora. A absorbância das amostras foi medida em leitor de placas a 725 nm. Ácido gálico foi utilizado para construção da curva padrão ( $R^2 = 0,98$ ) e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por 100 g de massa fresca do fruto.

O teor de Antocianinas totais foi determinado como descrito por Nunes e colaboradores (2005) com modificações, onde 0,5 ml de suco de morango extraído em metanol foi misturado a 9,5 ml de solução de metanol HCl (0.5%) e mantidos no escuro a 4°C por uma hora para extração dos pigmentos. As amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 7000 rpm e o sobrenadante filtrado em camada única de tecido 100% algodão. Imediatamente após a filtragem, em microplacas de 96 poços, foram adicionadas 300 µL de cada amostra e a absorbância foi medida em leitor de placas a 520 nm (absorbância máxima para antocianinas). Os resultados foram expressos em mg. 100g de peso seco de PGN (pelargonidina-3-glicosídeo). O teor de antocianinas foi calculado pela fórmula:

$$\text{Antocianinas} = A_{520} \times \text{FD} \times [\text{PM de PGN} / \text{coeficiente de extinção molar}]$$

Onde:

$A_{520}$  = Absorbância da amostra a 520 nm;

FD = Fator de diluição;

PM de PGN (peso molecular de pelargonidina-3-glicosídeo) = 433,2

Coefficiente de extinção molar =  $2,908 \times 10^4$

A capacidade antioxidante foi determinada pela capacidade de sequestro dos radicais ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azinobis-3-etilbenzoatiazolina-6-ácido sulfônico) e DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) seguindo as metodologias adaptadas de Torres e colaboradores (2017) e Pires e colaboradores (2017), respectivamente. Para o método de captura do radical ABTS<sup>+</sup>, foram pipetados, em microplacas de 96 poços, 10 µL de cada amostra diluída em metanol e 290 µL

do radical ABTS<sup>+</sup>, na sequência a mistura foi homogeneizada e as placas incubadas no escuro por 6 minutos a temperatura ambiente. A absorbância foi obtida em leitor de placas a 734 nm. Etanol absoluto foi utilizado como branco. Uma solução estoque de ácido ascórbico (300mg.L<sup>-1</sup>) foi utilizada para construção da curva padrão. Os resultados foram expressos em ácido ascórbico equivalente L<sup>-1</sup>.

O método de captura do DPPH foi realizado adicionando-se 40 µL de cada amostra diluída em água e 260 µL da solução de DPPH (0,1 mM) em microplacas de 96 poços. As placas foram incubadas no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente. A absorbância das amostras foi medida em leitor de placas a 517 nm. Água destilada autoclavada foi utilizado como branco e solução de DPPH sem amostra como controle positivo. Os resultados foram expressos em % de atividade antioxidante e calculados pela equação:

$$\% \text{ AAO} = [1 - (A_{517} \text{ amostra} / A_{517} \text{ branco})] \cdot 100$$

### 3.2.2.6 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software RStudio (R Core Team, versão 4.0.4, 2021). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) unidirecional e a normalidade e homogeneidade dos resíduos foram verificadas para todas as variáveis por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk (p. 0,05). Os valores médios foram comparados através dos testes de Tukey, Duncan ou Scott-Knott (p. 0,05) como testes de comparações múltiplas, utilizando o pacote ExpDes.pt (Ferreira *et al.* 2021).

## 3.2.3 RESULTADOS

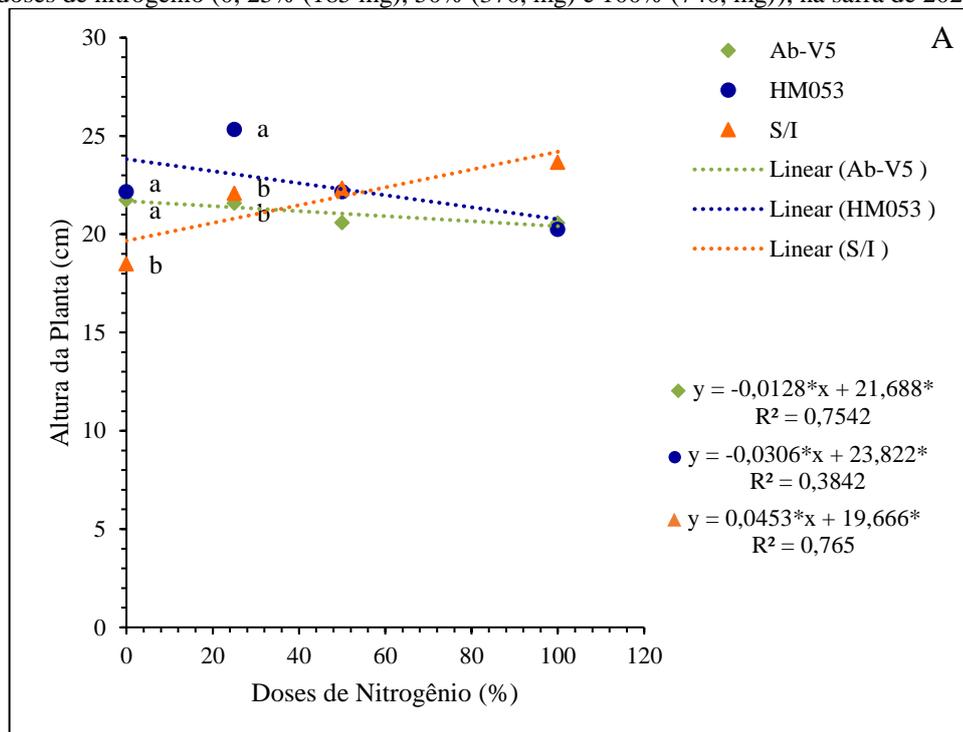
### 3.2.3.1 Parâmetros Biométricos das Plantas

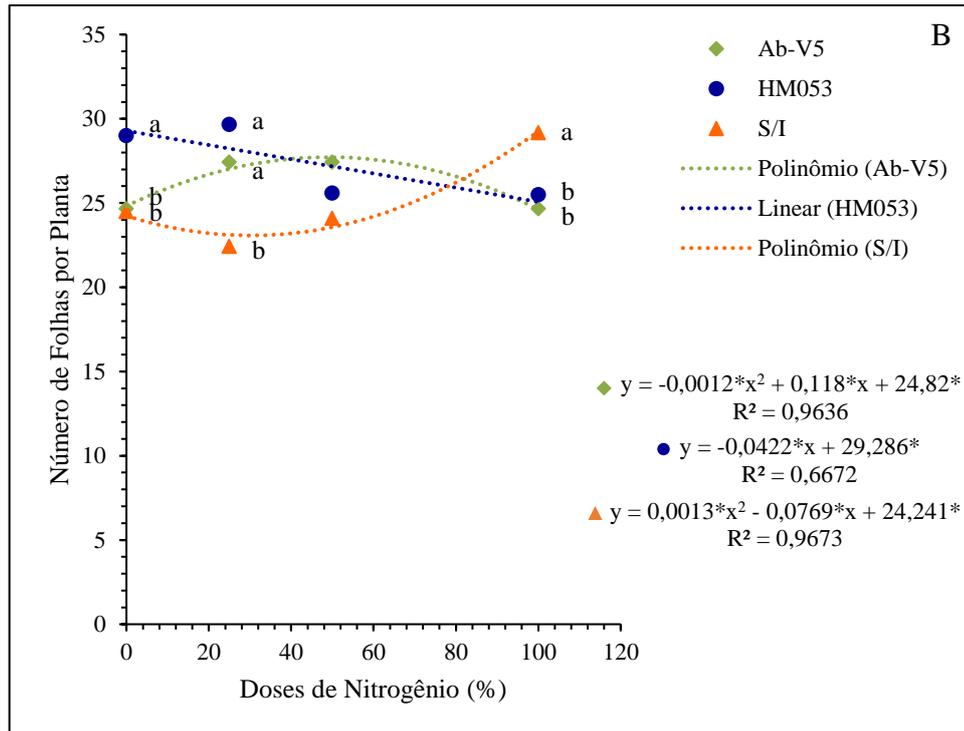
No presente estudo, duas estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5 e HM053) foram associadas a quatro doses de nitrogênio e duas formas de inoculação e avaliadas quanto ao efeito no desenvolvimento, crescimento e produção de morangueiros, cultivar Florida Festival, cultivados em duas safras consecutivas em condições de campo. Os resultados obtidos para o desenvolvimento da planta indicam que a inoculação das estirpes de *A. brasilense* beneficiou o desenvolvimento dos morangueiros.

A altura das plantas e número de folhas por planta foi significativamente influenciada pela aplicação dos inoculantes e pelas doses de nitrogênio para a safra de 2021 (maio de 2020 a fevereiro de 2021). Conforme evidenciado nas figuras 12A e 12B, os morangueiros inoculados com *A. brasilense* HM053 associado a 25% de nitrogênio apresentaram, tanto altura

máxima das plantas (25,34 cm) quanto maior número de folhas (29,17). Em contraste, a menor altura das plantas (18,5 cm) e o menor número de folhas (22,42) foram observados nos morangueiros sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio e nos morangueiros sem inoculação combinados à 25% de nitrogênio, respectivamente. Não houve diferença significativa em relação ao tratamento controle (sem inoculação e dose completa de nitrogênio) de acordo com o teste de Dunnett a 0,05.

**Figura 12:** Altura em centímetros (A) e Número de folhas por planta (B) dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), na safra de 2021.

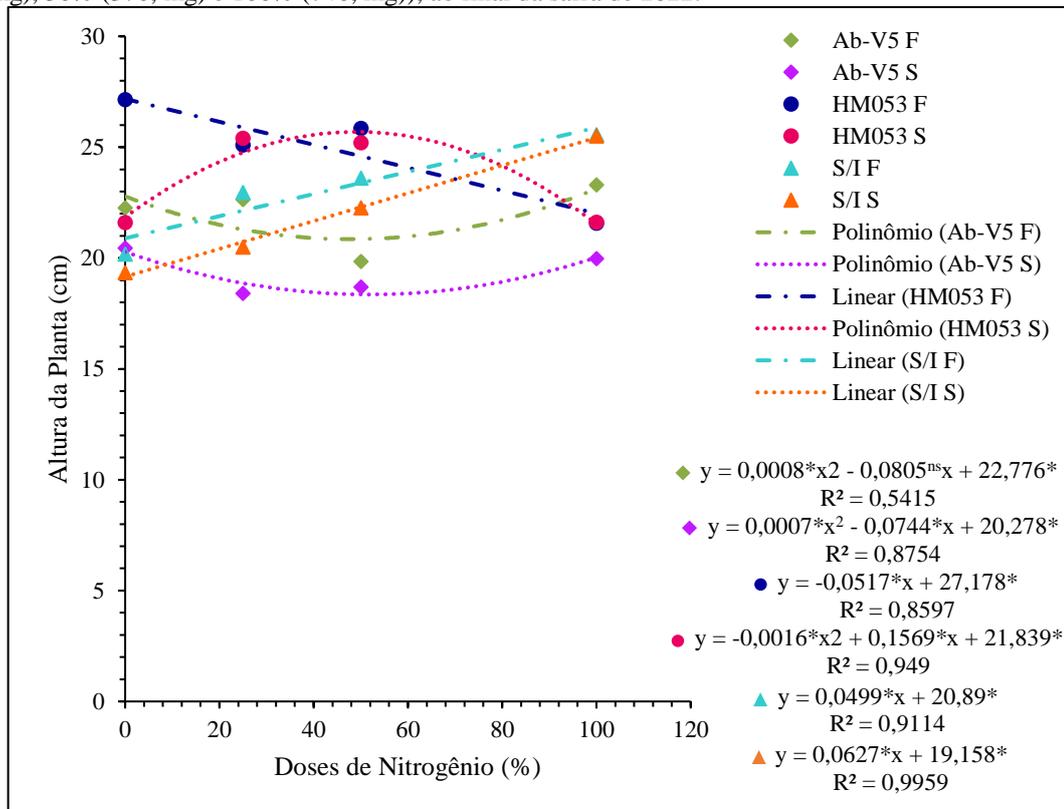




Os dados representam a média de 6 repetições. As linhas tracejadas correspondem ao modelo linear ou polinomial ajustado; os valores seguidos de \* indicam significância estatística (p.0,05). Letras iguais entre os tratamentos na mesma dose de nitrogênio não apresentam diferenças estatística, conforme determinado pelo teste de Duncan (p.0,05).

Já na safra de 2022 (maio de 2021 a fevereiro de 2022), quando as análises destrutivas foram realizadas, a altura da planta, a massa fresca e a massa seca das raízes foram afetadas pela dose de nitrogênio, pelos diferentes microrganismos e pela forma de inoculação. Enquanto o número de folhas, comprimento das raízes, a massa fresca e a massa seca da parte aérea e a biomassa total não foram influenciados pela forma de inoculação. A maior altura dos morangueiros (27,14 cm) foi encontrada na inoculação por aspersão foliar de *A. brasilense* HM053 e sem aplicação de nitrogênio, enquanto a menor altura (18,41 cm) foi observada na inoculação no solo de *A. brasilense* Ab-V5 associado a 25% de nitrogênio (Figura 13 e Tabela 8). Em consonância com a safra anterior, os morangueiros inoculados com *A. brasilense* HM053 associado a 25% de nitrogênio demonstraram maior número de folhas (41,5), enquanto o menor número de folhas (24,41) foi observado nos morangueiros inoculados com *A. brasilense* Ab-V5 associado a 50% de nitrogênio (Figura 14).

**Figura 13:** Altura em centímetros dos morangueiros inoculadas com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), ao final da safra de 2022.



Os dados representam a média de 6 repetições. As linhas tracejadas correspondem ao modelo linear ou polinomial ajustado; os valores seguidos \* indicam significância estatística (p.0,05). As letras “F” e “S” na legenda dos tratamentos simbolizam a forma de inoculação utilizada, foliar ou no solo, respectivamente.

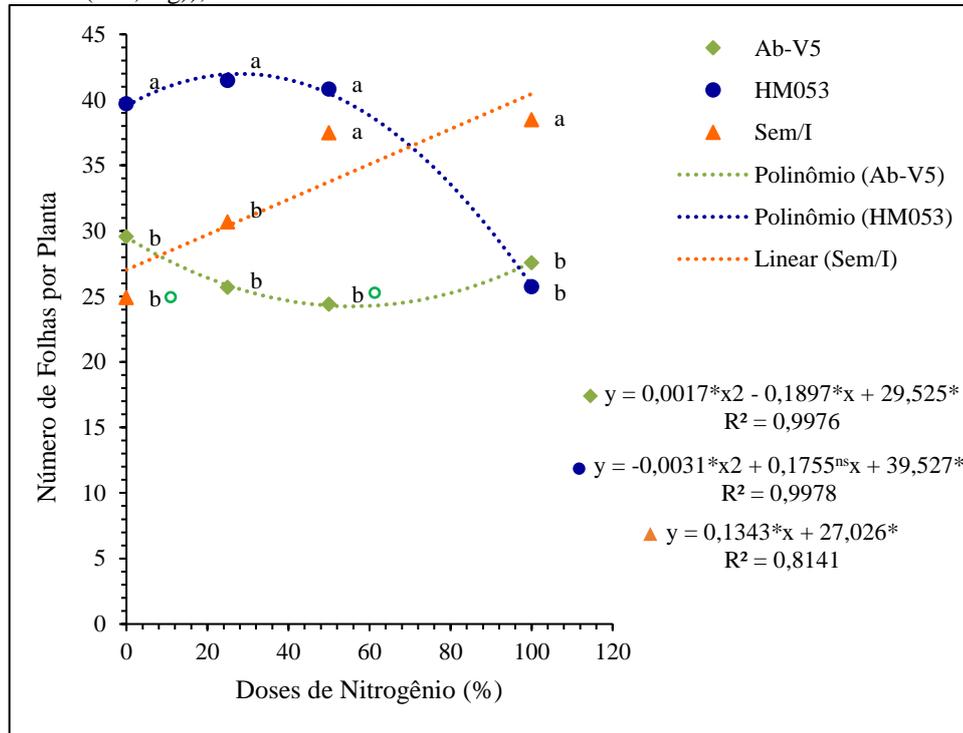
**Tabela 8:** Interação entre os microrganismos inoculados e a forma de aplicação na altura dos morangueiros ao final da safra de 2022.

| Doses de N (%) | Altura da Planta (cm) |           |           |           |             |            |
|----------------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-------------|------------|
|                | Foliar                |           |           | Solo      |             |            |
|                | HM053                 | Ab-V5     | S/I       | HM053     | Ab-V5       | S/I        |
| 0              | 27,14 a A             | 22,27 b   | 20,17 b ○ | 21,60 B ○ | 20,45 ○     | 19,34 ○    |
| 25             | 25,1                  | 22,64 A   | 22,95 A   | 25,4 a    | 18,41 b B ○ | 20,5 b B ○ |
| 50             | 25,85 a               | 19,84 b ○ | 23,61 a   | 25,21 a   | 18,7 c ○    | 22,27 b    |
| 100            | 21,58 b ○             | 23,3 ab A | 25,57 a   | 21,62 b ○ | 19,97 b B ○ | 25,5 a     |

CV = 9,48%

Os dados representam a média de 6 repetições. Letras iguais, maiúsculas ou minúsculas não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (p. 0,05). Letras minúsculas indicam diferenças entre as estirpes; Letras maiúsculas indicam diferença entre a forma de inoculação. Circulos indicam comparação entre os tratamentos e o controle sem inoculação e dose completa de nitrogênio pelo teste de Dunnett (p.0,05). Circulos verdes ou vermelhos indicam valores menores ou maiores que o tratamento controle.

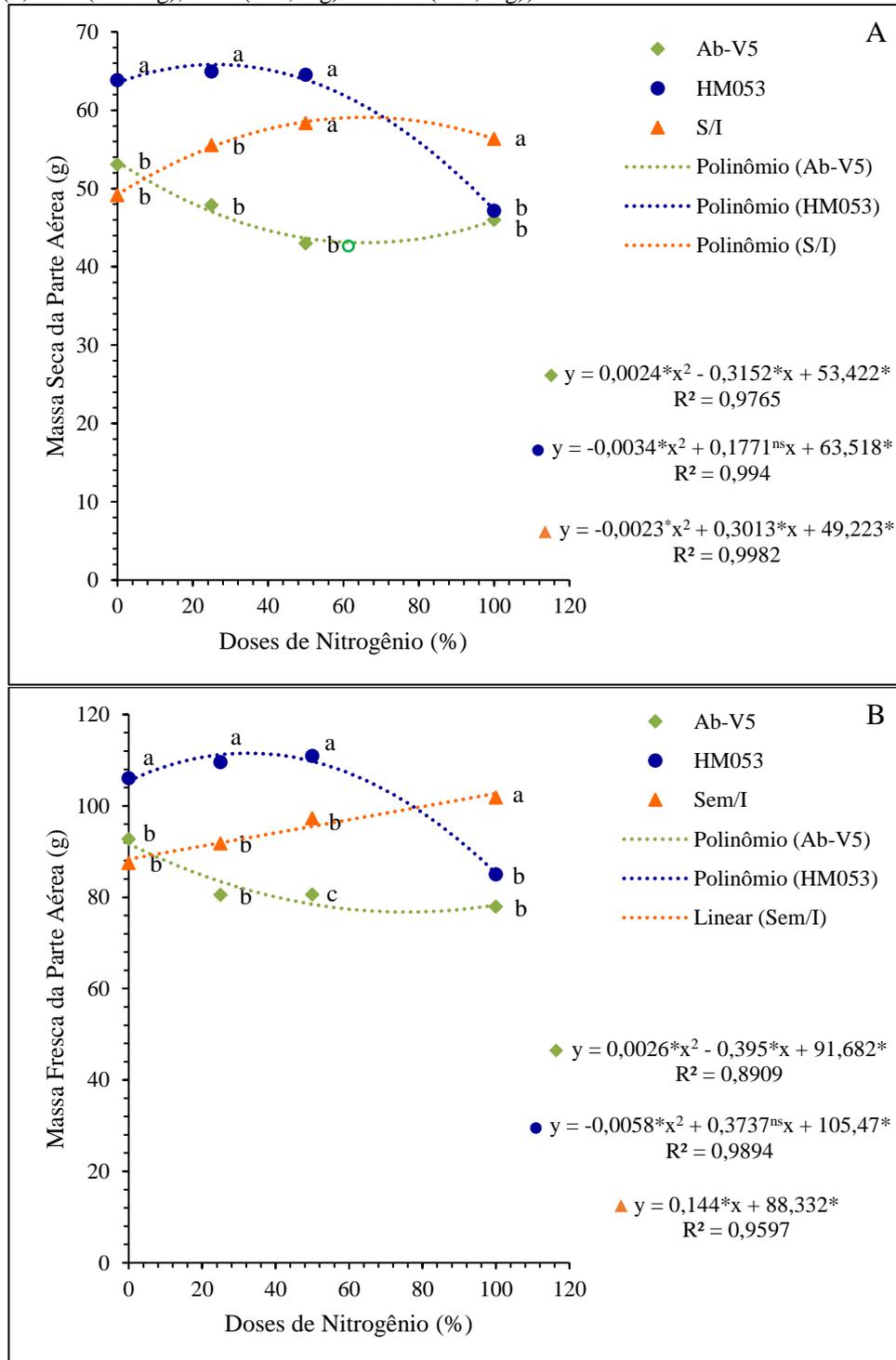
**Figura 14:** Número de folhas dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), ao final da safra de 2022.



Os dados representam a média de 6 repetições. As linhas tracejadas correspondem ao modelo linear ou polinomial ajustado; os valores seguidos de \* indicam significância estatística (p,0,05). Letras iguais entre os tratamentos na mesma dose de nitrogênio não apresentam diferenças estatísticas, conforme determinado pelo teste de Scott-Knott (p,0,05). Círculos verdes ou vermelhos representam valores inferiores ou superiores ao tratamento controle com dose completa de nitrogênio e sem inoculação, conforme determinado pelo teste de Dunnett (p,0,05).

A massa seca e fresca da parte aérea foi maior nos morangueiros inoculados com *A. brasilense* HM053 associado as doses de 0, 25 e 50% de nitrogênio, enquanto a menor massa fresca (77,95 g) foi observada para combinação de *A. brasilense* Ab-V5 associado a dose completa de nitrogênio e a menor massa seca (43,02 g) para a combinação de *A. brasilense* Ab-V5 + 50% de nitrogênio (Figuras 15 A e 15B). Embora a dose de nitrogênio tenha influenciado o desenvolvimento da parte aérea dos morangueiros, não houve diferença significativa em relação ao controle, conforme indicado pelo teste de Dunnett (p, 0,05).

**Figura 15:** Massa seca (A) e massa fresca (B) da parte aérea (g) dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)).

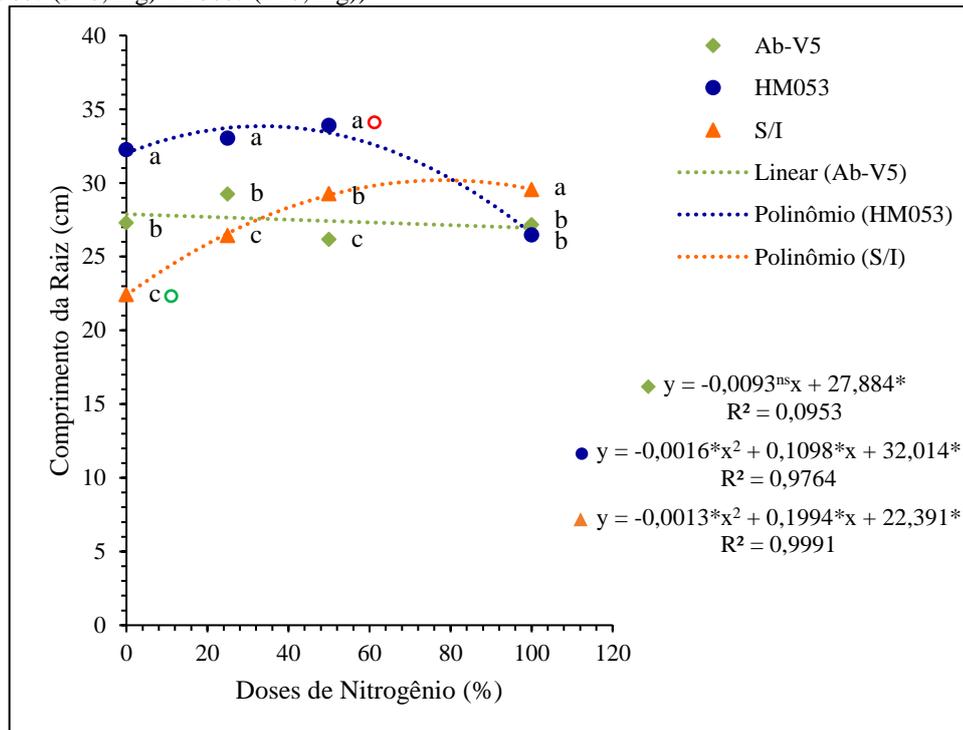


Os dados representam a média de 6 repetições. As linhas tracejadas correspondem ao modelo linear ou polinomial ajustado; os valores seguidos de \* indicam significância estatística (p.0,05). Letras iguais entre os tratamentos na mesma dose de nitrogênio não apresentam diferenças estatística, conforme determinado pelo teste de Scott-Knott (p.0,05). Círculos verdes ou vermelhos representam valores inferiores ou superiores ao tratamento controle com dose completa de nitrogênio e sem inoculação, conforme determinado pelo teste de Dunnett (p.0,05).

De acordo com os dados relatados na figura 16, os morangueiros inoculados com *A. brasilense* HM053 + 50% de nitrogênio exibiram maior comprimento de raiz (33,91 cm),

enquanto os morangueiros sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio apresentaram menor comprimento de raiz (22,44 cm), sendo esses os únicos tratamentos que diferiram do controle com dose completa de nitrogênio e sem inoculação (29,56 cm). As doses de nitrogênio não diferiram quando associadas a estirpe Ab-V5.

**Figura 16:** Comprimento das raízes (cm) dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)).



Os dados representam a média de 6 repetições. As linhas tracejadas correspondem ao modelo linear ou polinomial ajustado; os valores seguidos de \* indicam significância estatística (p.0,05). Letras iguais entre os tratamentos na mesma dose de nitrogênio não apresentam diferenças estatísticas, conforme determinado pelo teste de Scott-Knott (p.0,05). Círculos verdes ou vermelhos representam valores inferiores ou superiores ao tratamento controle com dose completa de nitrogênio e sem inoculação, conforme determinado pelo teste de Dunnett (p.0,05).

O maior acúmulo de massa fresca das raízes (103,13 g) foi observado nos morangueiros inoculados por aspersão foliar de *A. brasilense* HM053 e sem aplicação de nitrogênio, enquanto o menor acúmulo de massa fresca das raízes foi encontrado nas plantas inoculadas por aspersão foliar de *A. brasilense* Ab-V5 associado a 50% de nitrogênio (Figura 17A). A inoculação por aspersão foliar parece ter sido mais eficaz quando associada a estirpes HM053 e as menores doses de nitrogênio. Por outro lado, a inoculação no solo pareceu ter um melhor efeito quando associada a estirpe HM053 e 50% de nitrogênio. O método de inoculação não afetou a utilização da estirpe Ab-V5. Ao comparar os tratamentos com os controles positivos (dose completa de nitrogênio e sem inoculação), a combinação de inoculação foliar + HM053 + sem nitrogênio foi a única superior, resultando em um incremento de 36,59% (27,63 g) e 30,87% (24,33 g) em

relação aos controles sem inoculação, dose completa de nitrogênio e foliar ou no solo, respectivamente (Tabela 9A).

Como pode ser observado na Figura 17B e Tabela 9B, o maior acúmulo de massa seca das raízes (65,28 g) foi exibido pelos morangueiros inoculados por aspersão foliar de *A. brasilense* HM053 e sem aplicação de nitrogênio, já o menor acúmulo de massa seca das raízes (26,84 g) foi encontrado nos morangueiros inoculados com *A. brasilense* Ab-V5 associado a 25% de nitrogênio. As doses de nitrogênio não apresentaram efeito significativo (p.0,05) quando associadas à estirpe Ab-V5 + inoculação no solo. Os morangueiros inoculados por aspersão foliar de *A. brasilense* HM053 e sem ou com 25% de nitrogênio demonstraram um incremento de 82,34% (29,48 g) e 40,42% (14,47 g), respectivamente, em relação ao controle sem inoculação, dose completa de nitrogênio e inoculação foliar, enquanto a inoculação foliar da estirpe HM053 e sem nitrogênio, resultou em um incremento de 47,46% (24,33 g) em relação ao controle sem inoculação, dose completa de nitrogênio e inoculação no solo.

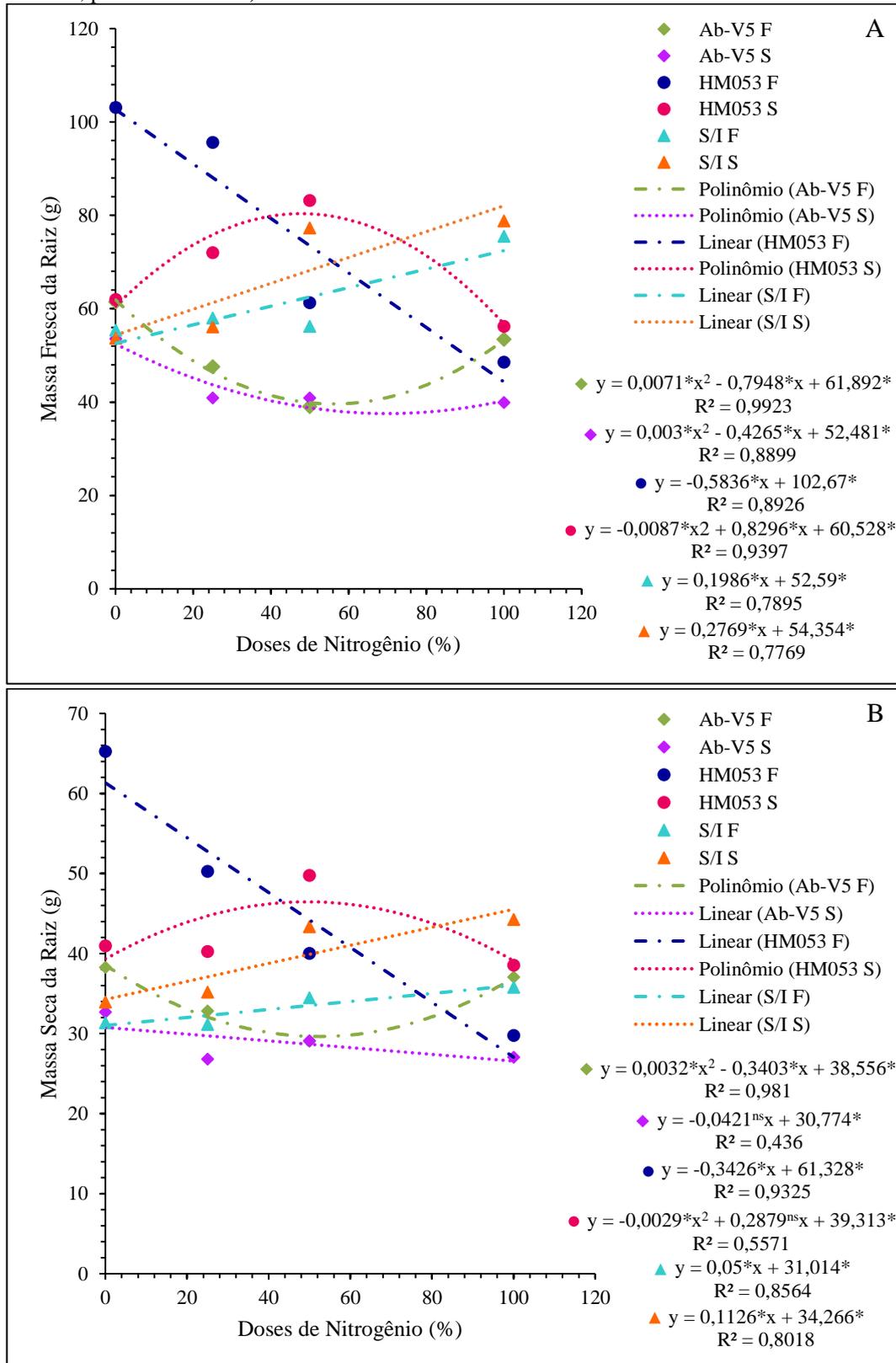
**Tabela 9:** Massa fresca (g) (A) e Massa seca (g) (B) das raízes dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 e sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) em duas formas de inoculação (aspersão foliar e no solo, próximo as raízes).

| A                        |   |  |          |          |  |           |
|--------------------------|---|--|----------|----------|--|-----------|
| Massa Fresca da Raiz (g) |   |  |          |          |  |           |
| Doses de N (%)           | Foliar                                      |  |          | Solo     |  |           |
|                          | HM053                                       | Ab-V5                                      | S/I      | HM053    | Ab-V5                                      | S/I       |
| 0                        | 103,13 a A <span style="color:red">○</span> | 61,48 b                                    | 55,43 b  | 61,97 B  | 53,55                                      | 53,71     |
| 25                       | 95,61 a A                                   | 47,55 b <span style="color:blue">○○</span> | 57,98 b  | 72 a B   | 40,87 b <span style="color:blue">○○</span> | 56,08 b   |
| 50                       | 61,27 a B                                   | 39,05 b <span style="color:blue">○○</span> | 56,2 a B | 83,2 a A | 40,91 b <span style="color:blue">○○</span> | 77,28 a A |
| 100                      | 48,54 b <span style="color:blue">○○</span>  | 53,44 b                                    | 75,5 a   | 56,24 b  | 39,94 b <span style="color:blue">○○</span> | 78,8 a    |
| CV = 24,94%              |   |  |          |          |  |           |

| B                      |  |         |         |         |   |         |
|------------------------|--|---------|---------|---------|---|---------|
| Massa Seca da Raiz (g) |  |         |         |         |   |         |
| Doses de N (%)         | Foliar   |         |         | Solo    |   |         |
|                        | HM053  | Ab-V5   | S/I     | HM053   | Ab-V5                                     | S/I     |
| 0                      | 65,28 a A <span style="color:red">○</span> <span style="color:yellow">○</span> | 38,27 b | 31,35 b | 40,97 B | 32,72                                     | 33,95   |
| 25                     | 50,27 a <span style="color:red">○</span>                                       | 32,84 b | 31,17 b | 40,28   | 26,84 <span style="color:blue">○</span>   | 35,2    |
| 50                     | 40,03  | 29,08   | 34,48   | 49,77 a | 29,1 b                                    | 43,35 a |
| 100                    | 29,77  | 37,07   | 35,8    | 38,54 a | 27,07 b <span style="color:blue">○</span> | 44,27 a |
| CV = 25,56%            |  |         |         |         |   |         |

Os dados representam a média de 6 repetições. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Scott-Knott (p. 0,05). Letras minúsculas indicam diferenças entre as estirpes na mesma dose de nitrogênio. Letras maiúsculas representam diferenças entre a forma de inoculação. Círculos indicam comparação entre os tratamentos e os controles sem inoculação e dose completa de nitrogênio pelo teste de Dunnett (p.0,05). Círculos vermelhos ou verdes e amarelos ou azuis, indicam médias maiores ou menores que os tratamentos controle e inoculação foliar e controle e inoculação no solo, respectivamente.

**Figura 17:** Efeito das diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) na massa fresca (g) (A) e massa seca (g) (B) das raízes dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 eou sem inoculação (S/I), em duas formas de inoculação (aspersão foliar e no solo, próximo as raízes).

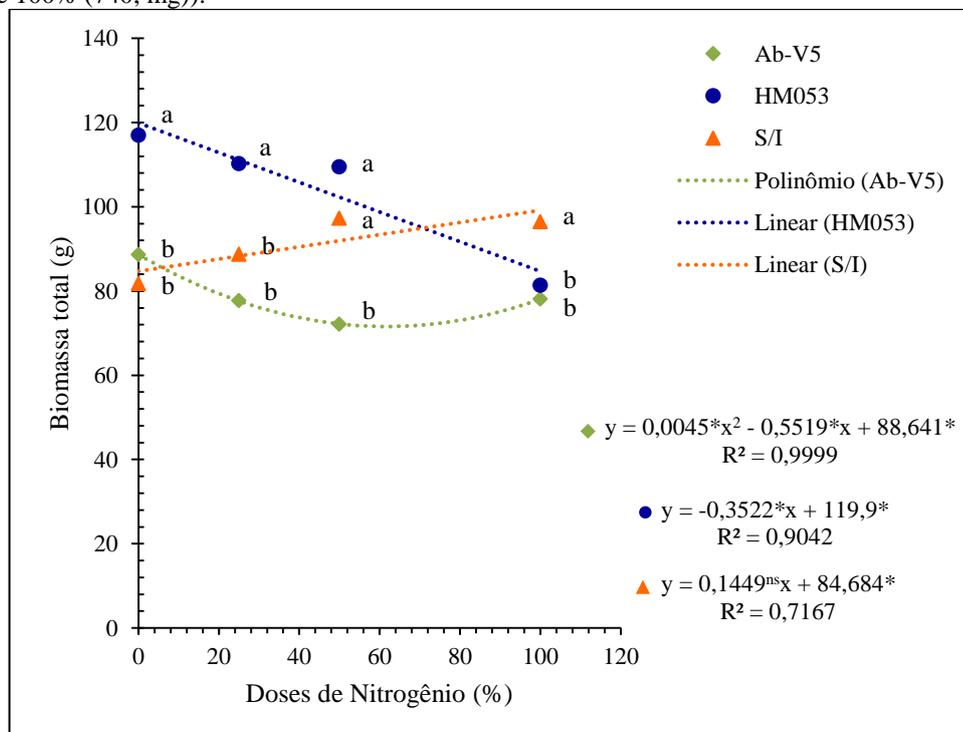


Os dados representam a média de 6 repetições. As linhas tracejadas correspondem ao modelo linear ou polinomial ajustado; os valores seguidos \* indicam significância estatística (p.0,05). As letras “F” e “S” na legenda dos tratamentos simbolizam a forma de inoculação utilizada, foliar ou no solo, respectivamente.

O maior acúmulo de biomassa (116,98 g) foi observado nos morangueiros inoculados com *A. brasilense* HM053 e sem aplicação de nitrogênio, seguido pelo tratamento com inoculação de *A. brasilense* HM053 associado e aplicação de 25% de nitrogênio (110,21 g), enquanto o menor acúmulo de biomassa (72,12 g) foi encontrado em morangueiros inoculados com *A. brasilense* Ab-V5 + 50% de nitrogênio. Os tratamentos não diferiram do controle segundo o teste de Dunnett (p.0,05). Contudo, a aplicação da estirpe HM053 associada as menores doses de nitrogênio (0 e 25%) foi significativamente superior a aplicação da estirpe Ab-V5 e dos tratamentos sem inoculação nas mesmas doses de nitrogênio (Figura 18). A forma de inoculação não interferiu nos resultados.

Não foram observadas diferenças significativas no diâmetro da copa entre os tratamentos para ambas as safras. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos para o diâmetro da coroa, sendo o maior diâmetro da coroa (16,52 mm) obtido no tratamento com a combinação de *A. brasilense* HM053 + 50% de nitrogênio, enquanto o menor diâmetro da coroa (11,5 mm) foi observado nas plantas inoculadas com *A. brasilense* Ab-V5 e associadas à dose completa de nitrogênio.

**Figura 18:** Biomassa total (g) dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)).



Os dados representam a média de 6 repetições. As linhas tracejadas correspondem ao modelo linear ou polinomial ajustado; os valores seguidos de \* indicam significância estatística (p.0,05). Letras iguais entre os tratamentos na mesma dose de nitrogênio não apresentam diferenças estatísticas, conforme determinado pelo teste de Scott-Knott (p.0,05).

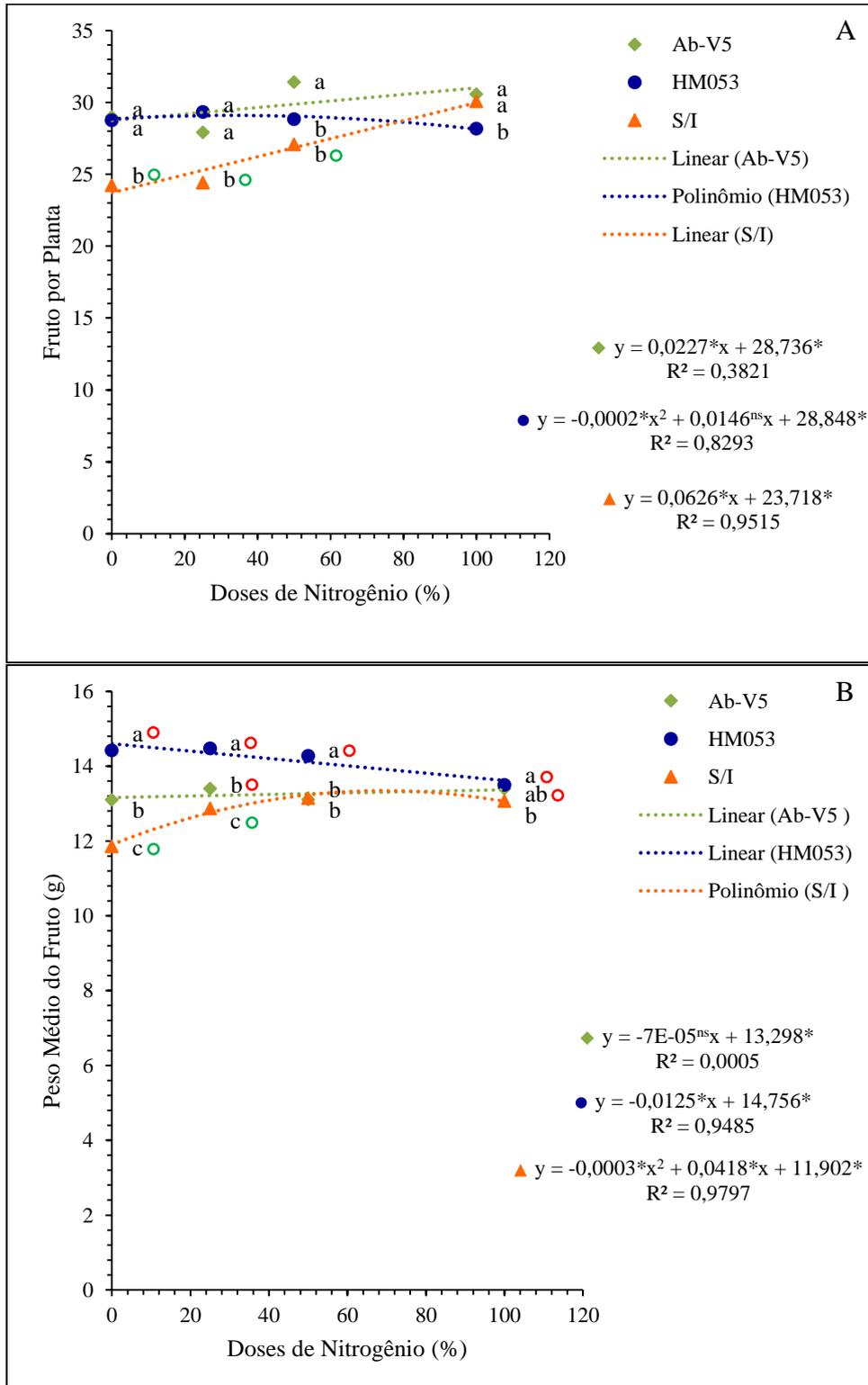
### 3.2.3.2 Análises Físico Químicas dos Frutos

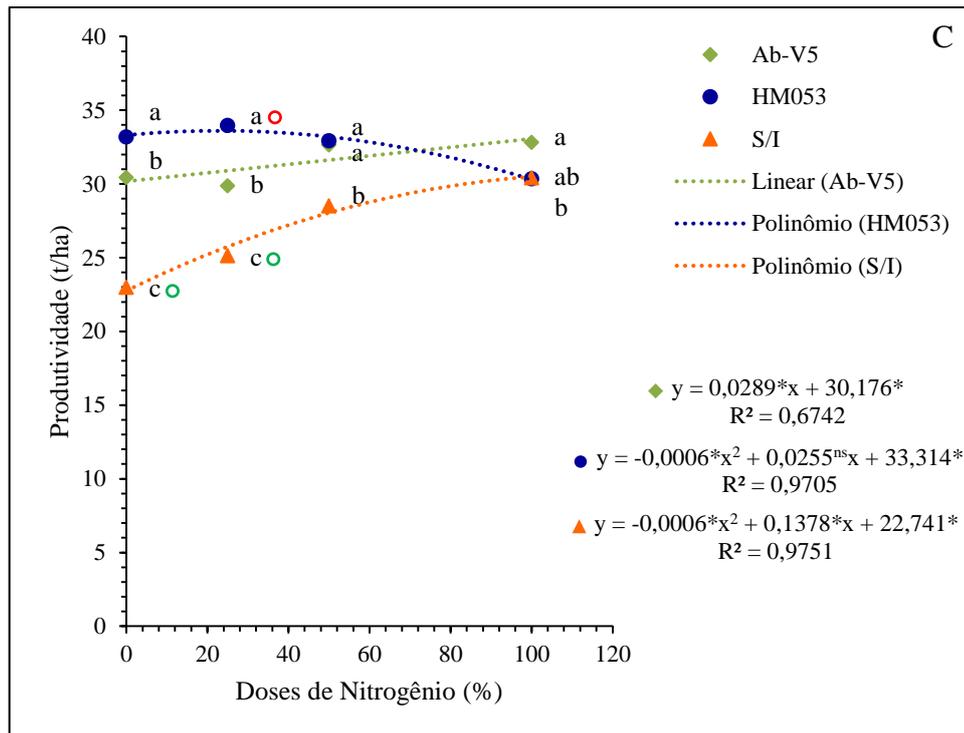
O número de frutos por planta e o peso médio do fruto foram afetados pela aplicação dos inoculantes e pelas doses de nitrogênio na safra de 2021. O maior número de frutos por planta (30,08) foi observado no tratamento controle sem inoculação e dose completa de nitrogênio, enquanto o menor número de frutos (24,25) foi encontrado para os morangueiros sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio. Contudo, independente da dose de nitrogênio, os morangueiros inoculados com as estirpes *A. brasilense* Ab-V5 ou *A. brasilense* HM053 expressaram número de frutos estatisticamente iguais ao obtido para o tratamento controle (Figura 19A).

O maior peso médio do fruto (14,48 g) foi alcançado com a combinação da estirpe HM053 + 25% de nitrogênio, enquanto o menor peso médio do fruto (11,86 g) foi observado no tratamento sem aplicação de nitrogênio e sem inoculação (Figura 19B). Não houve significância na dose de nitrogênio quando associada à estirpe *A. brasilense* Ab-V5. Independente da dose de nitrogênio, o peso médio dos morangos das plantas inoculadas com a estirpe *A. brasilense* HM053 foi superior ao observado no tratamento controle sem inoculação e dose completa de nitrogênio, conforme indicado pelo teste de Dunnett (p.0,05). O mesmo padrão foi observado para os morangueiros inoculados com *A. brasilense* Ab-V5 + 25 ou 100% de nitrogênio.

O rendimento geral foi influenciado pelas doses de nitrogênio e pela aplicação dos inoculantes (Figura 19C). A produtividade máxima (33,96 t.ha) foi obtida nos morangueiros inoculados com *A. brasilense* HM053 associado a 25% de nitrogênio, representando um incremento de 11,67 % em relação ao controle sem inoculação e dose completa de nitrogênio, o que equivale a um aumento de, aproximadamente, 3,55 toneladas de frutos por hectare cultivado. Por outro lado, a menor produtividade (22,99 t.ha) foi registrada nos morangueiros sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio. Os demais tratamentos que receberam inoculação apresentaram produtividade semelhante ao tratamento controle.

**Figura 19:** Média do número de frutos por planta (A), peso médio dos frutos (g) (B) e produtividade (t.ha) (C) obtidos nos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), na safra de 2021.





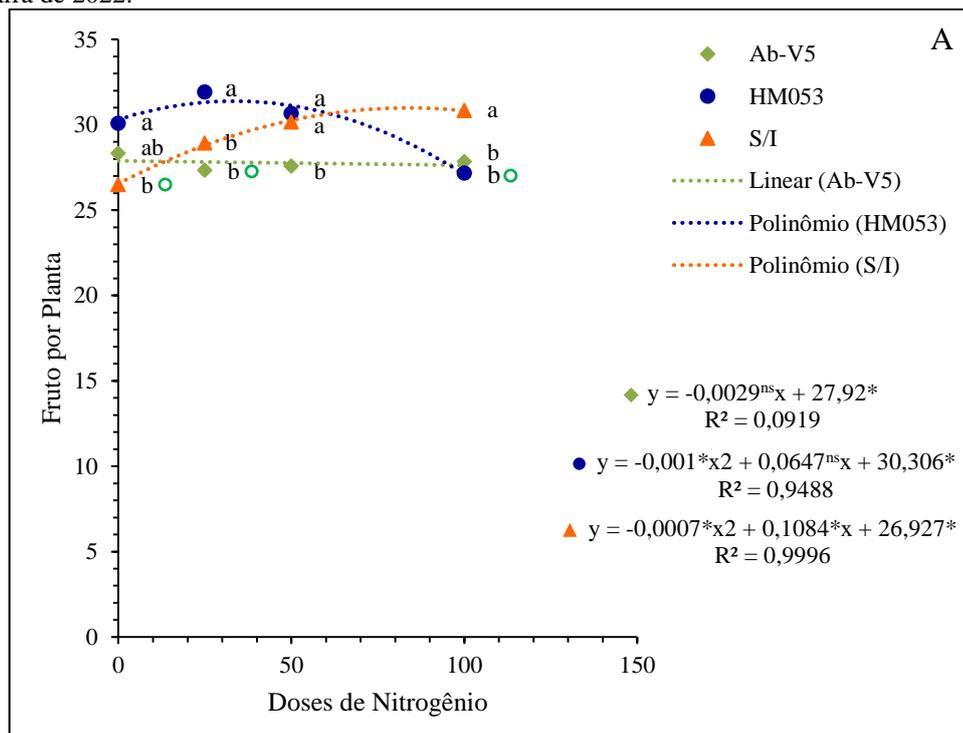
Os dados representam a média de 6 repetições. As linhas tracejadas correspondem ao modelo linear ou polinomial ajustado; os valores seguidos de \* indicam significância estatística (p.0,05). Letras iguais entre os tratamentos na mesma dose de nitrogênio não apresentam diferenças estatísticas, conforme determinado pelo teste de Tukey (p.0,05). Círculos verdes ou vermelhos representam valores inferiores ou superiores ao tratamento controle com dose completa de nitrogênio e sem inoculação, conforme determinado pelo teste de Dunnett (p.0,05).

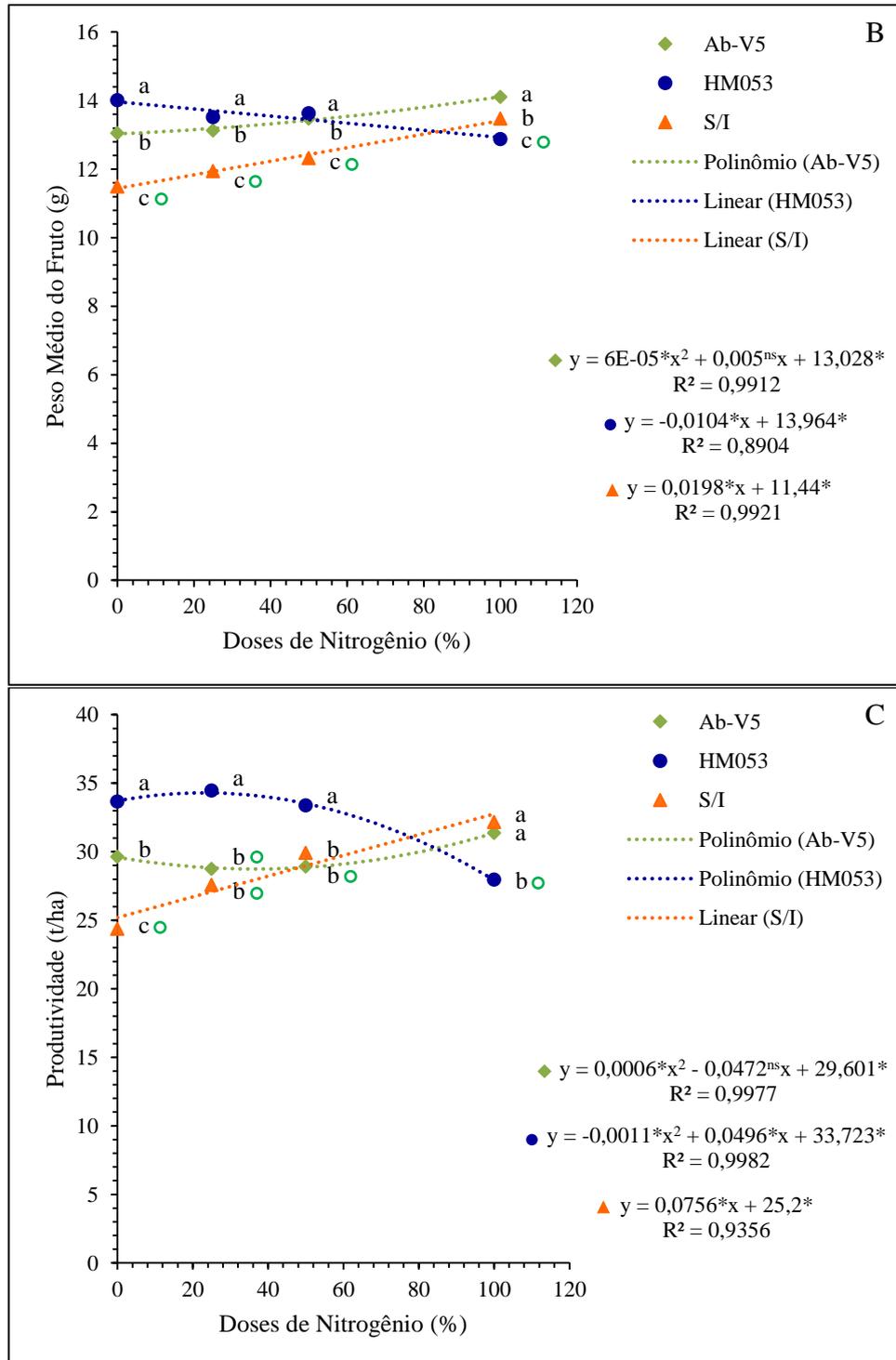
Assim como relatado para a safra de 2021, na safra de 2022 a forma de aplicação do inoculante não foi significativa para o número de frutos por planta, peso médio do fruto e produtividade. O maior número de frutos por planta (31,92) foi registrado nos morangueiros inoculados com *A. brasilense* HM053 associado à aplicação de 25% de nitrogênio, enquanto o menor número de frutos por planta (26,5) foi encontrado para as plantas sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio (Figura 20A). Apenas os morangueiros inoculados com *A. brasilense* HM053 + 100% de nitrogênio, *A. brasilense* Ab-V5 + 25% de nitrogênio e os morangueiros sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio diferiram do controle com dose completa de nitrogênio e sem inoculação, apresentando significativamente menos frutos por planta.

Os morangueiros inoculados com *A. brasilense* Ab-V5 + 100% de nitrogênio e *A. brasilense* HM053 e sem aplicação de nitrogênio exibiram maior peso médio do fruto, 14,11 gramas e 14,01 gramas, respectivamente, enquanto o menor peso médio do fruto (11,49 g) foi observado nos morangueiros sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio (Figura 20B). Com exceção da combinação de *A. brasilense* HM053 + 100% de nitrogênio, os morangueiros inoculados com ambas as estirpes, independente da dose de nitrogênio, demonstraram resultados semelhantes ao controle sem inoculação e dose completa de nitrogênio, como demonstrado pelo teste de Dunnett (p.0,05).

A produtividade máxima (34,46 t.ha) foi registrada nos morangueiros inoculados com *A. brasilense* HM053 + 25% de nitrogênio, enquanto a produtividade mínima (24,37 t.ha) foi encontrada nos morangueiros sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio (Figura 20C). Os morangueiros inoculados com *A. brasilense* HM053 associados as doses de 0 a 50% de nitrogênio e *A. brasilense* Ab-V5 associados a 0 e 100% de nitrogênio não diferiram do controle sem inoculação e dose completa de nitrogênio. Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre o tratamento controle e o tratamento com inoculação de *A. brasilense* HM053 associado à aplicação de 25% de nitrogênio, conforme indicado pelo teste de Dunnett (p.0,05), observou-se um aumento de 7,12% na produtividade dos frutos. Isso representa um acréscimo de cerca de 2,29 toneladas de frutos produzidos por hectare cultivado.

**Figura 20:** Média do número de frutos por planta (A), peso médio dos frutos (g) (B) e produtividade (t/ha) (C) dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), na safra de 2022.





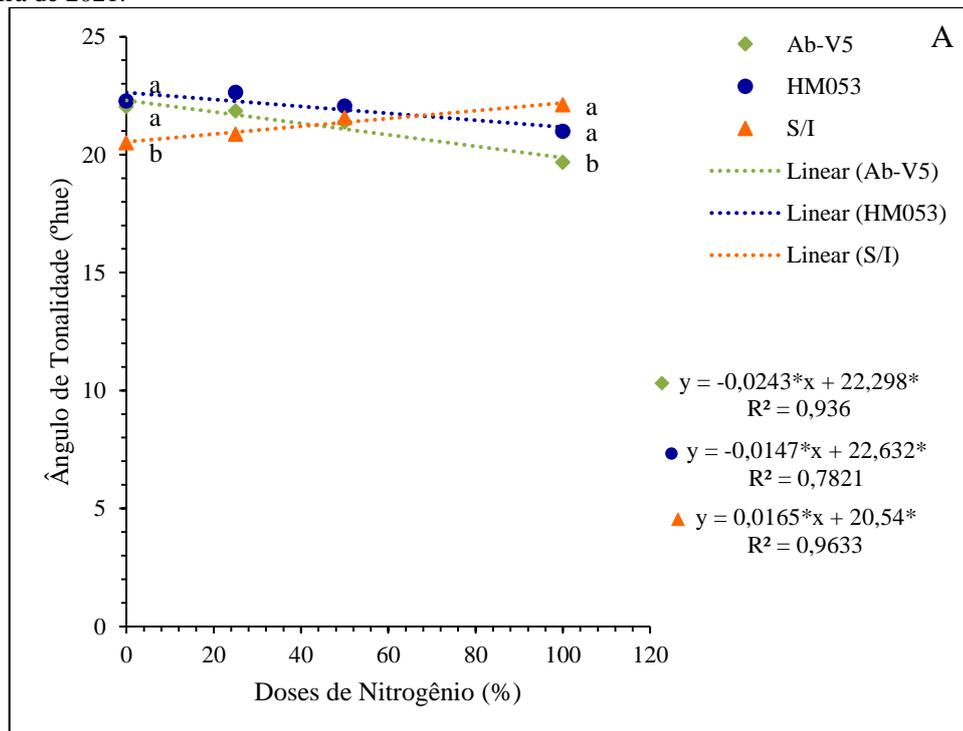
Os dados representam a média de 6 repetições. As linhas tracejadas correspondem ao modelo linear ou polinomial ajustado; os valores seguidos de \* indicam significância estatística (p,0,05). Letras iguais entre os tratamentos na mesma dose de nitrogênio não apresentam diferenças estatística, conforme determinado pelo teste de Tukey (p,0,05). Círculos verdes ou vermelhos representam valores inferiores ou superiores ao tratamento controle com dose completa de nitrogênio e sem inoculação, conforme determinado pelo teste de Dunnett (p,0,05).

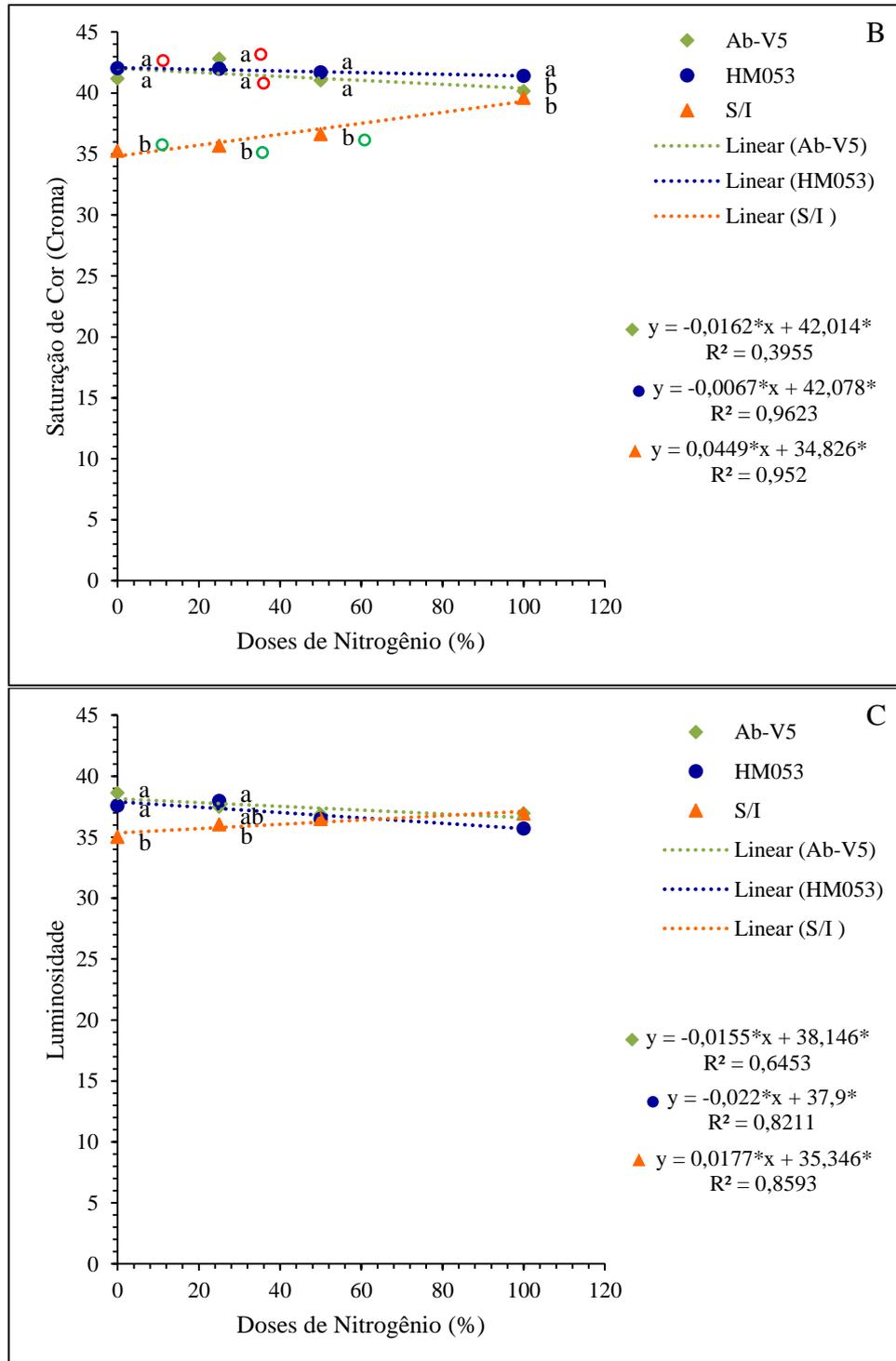
As doses de nitrogênio e os microrganismos inoculados influenciaram na coloração do fruto em ambos os anos. Na safra de 2021, o maior ângulo de tonalidade (22,64 °hue) foi observado nos morangueiros inoculados com *A. brasilense* HM053 associado a 25% de nitrogênio, enquanto o menor ângulo de tonalidade (19,68 °hue) foi encontrado nos

morangueiros inoculados com *A. brasilense* Ab-V5 associado a dose completa de nitrogênio (figura 21A). Os tratamentos não diferiram do controle com dose completa de nitrogênio e sem inoculação de acordo com o teste de Dunnett (p.0,05).

O croma, ou saturação de cor, foi mais elevado (42,84) nos frutos produzidos pelos morangueiros inoculados com *A. brasilense* Ab-V5 associado a 25% de nitrogênio, seguido pela combinação de *A. brasilense* HM053 + 0% de nitrogênio (42,04), enquanto a menor saturação de cor (35,26) foi obtida nos morangos produzidos pelos morangueiros sem aplicação de nitrogênio e sem inoculação (Figura 21B). Como pode ser observado na figura 21C, os frutos com maior luminosidade (38,63) foram encontrados pela combinação de *A. brasilense* Ab-V5 e sem aplicação de nitrogênio, seguida pelo tratamento com *A. brasilense* HM053 e 25% de nitrogênio (37,97), enquanto a menor luminosidade (35,02) foi adquirida nos frutos dos morangueiros sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio.

**Figura 21:** Ângulo de tonalidade (°hue) (A), saturação de cor (Croma) (B) e luminosidade (C) dos frutos de morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) na safra de 2021.





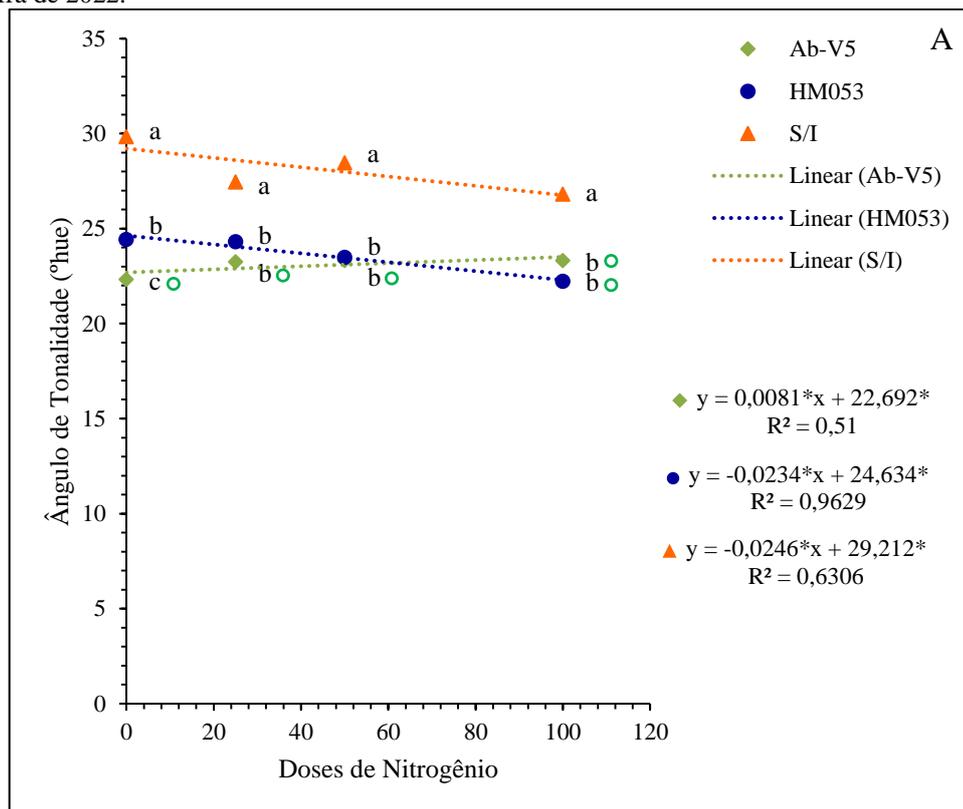
Os dados representam a média de 6 repetições. As linhas tracejadas correspondem ao modelo linear ou polinomial ajustado; os valores seguidos de \* indicam significância estatística (p.0,05). Letras iguais entre os tratamentos na mesma dose de nitrogênio não apresentam diferenças estatística, conforme determinado pelo teste de Tukey (p.0,05). Círculos verdes ou vermelhos representam valores inferiores ou superiores ao tratamento controle com dose completa de nitrogênio e sem inoculação, conforme determinado pelo teste de Dunnett (p.0,05).

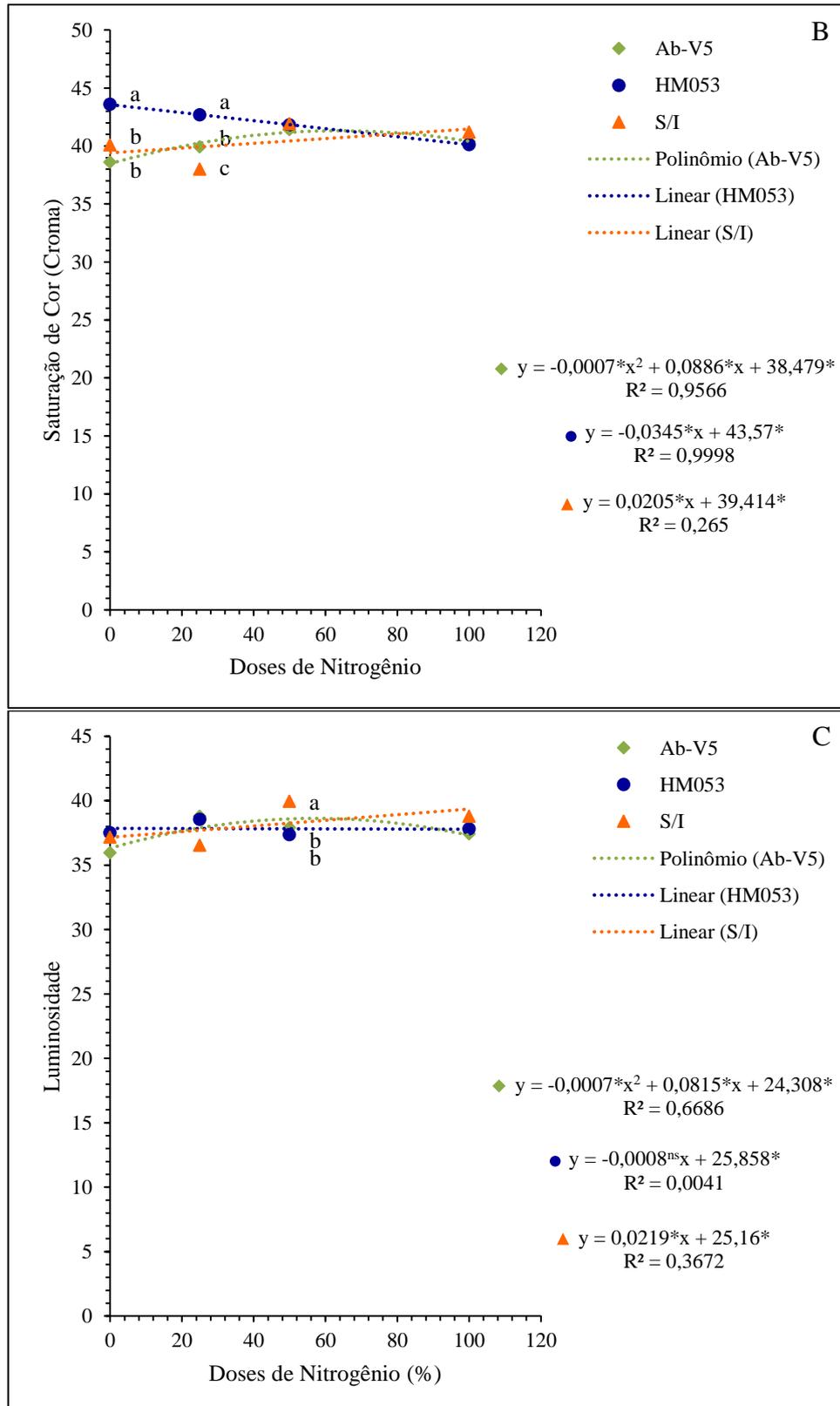
A coloração dos frutos na safra de 2022 foi semelhante ao observado na safra anterior, sendo o maior ângulo de tonalidade (29,84 °hue) registrado nos frutos do tratamento sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio, enquanto o menor ângulo de tonalidade (22,22 °hue) foi obtido nos morangos do tratamento com *A. brasilense* HM053 associado à dose completa

de nitrogênio (Figura 22A). A saturação de cor foi maior nos morangos produzidos pelas plantas inoculadas com *A. brasilense* HM053 e sem aplicação de nitrogênio (43,59), seguida pelo tratamento com *A. brasilense* HM053 + 25% de nitrogênio (42,69). Já a menor saturação de cor (38,02) foi encontrada nos frutos do tratamento sem inoculação + 25% de nitrogênio (Figura 22B).

Em relação a luminosidade, os valores máximos (39,96) foram observados nos frutos do tratamento sem inoculação e aplicação de 50% de nitrogênio, enquanto a menor luminosidade do fruto (35,97) foi expressa nos morangos tratados com *A. brasilense* Ab-V5 e sem aplicação de nitrogênio (Figura 22C). Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos para a firmeza do fruto, a média geral variou entre 8,79 a 10,15 N.

**Figura 22:** Ângulo de tonalidade (°hue) (A), saturação de cor (Croma) (B) e luminosidade (C) dos frutos dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) na safra de 2022.





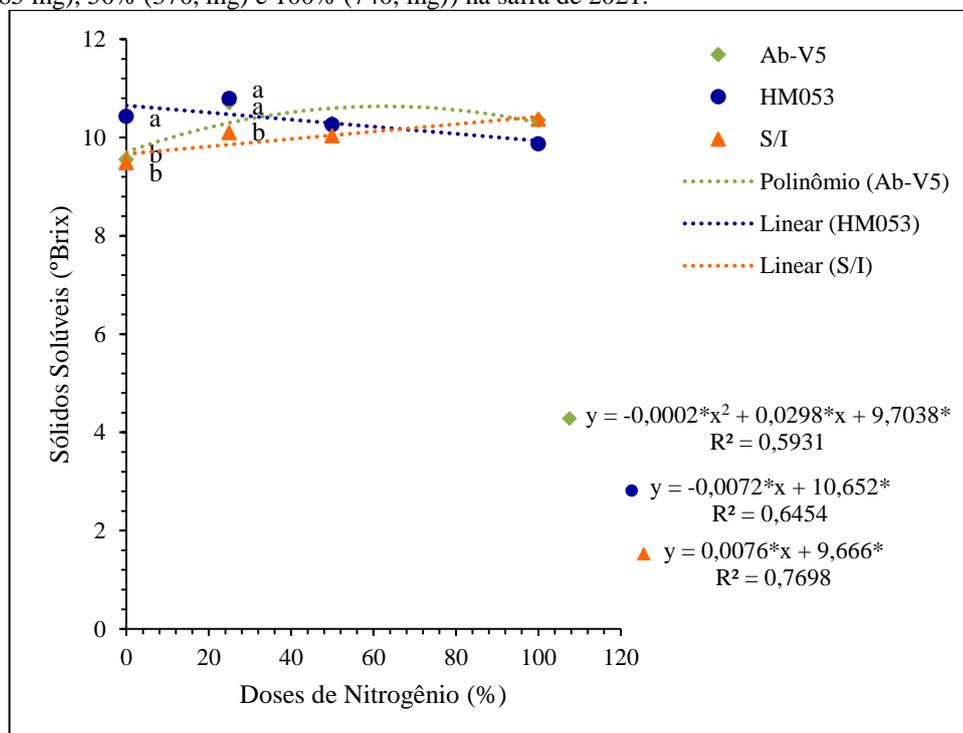
Os dados representam a média de 6 repetições. As linhas tracejadas correspondem ao modelo linear ou polinomial ajustado; os valores seguidos de \* indicam significância estatística (p.0,05). Letras iguais entre os tratamentos na mesma dose de nitrogênio não apresentam diferenças estatísticas, conforme determinado pelo teste de Tukey (p.0,05). Círculos verdes ou vermelhos representam valores inferiores ou superiores ao tratamento controle com dose completa de nitrogênio e sem inoculação, conforme determinado pelo teste de Dunnett (p.0,05).

### 3.2.3.2.1 Sólidos solúveis (SS), acidez titulável (AT), pH e relação sólidos solúveis/ acidez titulável (SS/AT).

O pH dos frutos não diferiu entre os tratamentos conforme avaliado pelo teste de Tukey (p. 0,05) em ambas as safras, com valores variando entre 3,04 a 3,7. A doçura do fruto, obtida através do teor de sólidos solúveis não foi afetado pela forma de aplicação do inoculante em ambas as safras, enquanto a acidez titulável e a relação sólidos solúveis/ acidez titulável (SS/AT) foram influenciadas pelo método de aplicação do inoculante, doses de nitrogênio e microrganismos inoculados.

Na safra de 2021, o maior teor de sólidos solúveis foi encontrado nos morangos dos tratamentos inoculados com *A. brasilense* HM053 + 25% de nitrogênio (10,79 °Brix) e *A. brasilense* HM053 e sem aplicação de nitrogênio (10,43 °Brix). Por outro lado, o menor teor de sólidos solúveis (9,49 °Brix) foi observado nos morangos do tratamento sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio (Figura 23). Embora tenha ocorrido interação entre as doses de nitrogênio e os microrganismos inoculados, os tratamentos não diferiram do controle de acordo com o teste de Dunnett (p. 0,05).

**Figura 23:** Teor de sólidos solúveis (°Brix) dos frutos dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) na safra de 2021.



Os dados representam a média de 6 repetições. As linhas tracejadas correspondem ao modelo linear ou polinomial ajustado; os valores seguidos de \* indicam significância estatística (p.0,05). Letras iguais entre os tratamentos na mesma dose de nitrogênio não apresentam diferenças estatística, conforme determinado pelo teste de Tukey (p.0,05).

A acidez titulável máxima (0,592% de ácido cítrico) foi relatada nos frutos dos morangueiros inoculados por aspersão foliar com *A. brasilense* HM053 e associado a 25% de nitrogênio, enquanto a acidez titulável mínima (0,307% de ácido cítrico) foi observada nos frutos do tratamento sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio (Tabela 10A). Em geral, apenas os morangueiros sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio e aqueles tratados com *A. brasilense* Ab-V5 e sem aplicação de nitrogênio apresentaram acidez titulável menor que a encontrada nos tratamentos controles. As doses de nitrogênio não demonstraram significância quando associadas à inoculação no solo de *A. brasilense* HM053 (Figura 24A).

Conforme apresentado na Tabela 10B, os frutos dos tratamentos sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio apresentaram uma maior relação SS/AT (31,21 para inoculação no solo e 24,62 para inoculação foliar), enquanto a menor relação SS/AT foi observada nos morangos das plantas inoculadas com *A. brasilense* HM053 + 50% de nitrogênio (16,75) e *A. brasilense* HM053 e dose completa de nitrogênio (16,88). Os resultados sugerem uma relação inversa entre as doses de nitrogênio e a acidez titulável em comparação com a relação SS/AT. Contudo, essa tendência não foi observada para os morangos das plantas inoculadas com *A. brasilense* HM053, onde as doses de nitrogênio parecem ter uma influência menos pronunciada (Figura 24B).

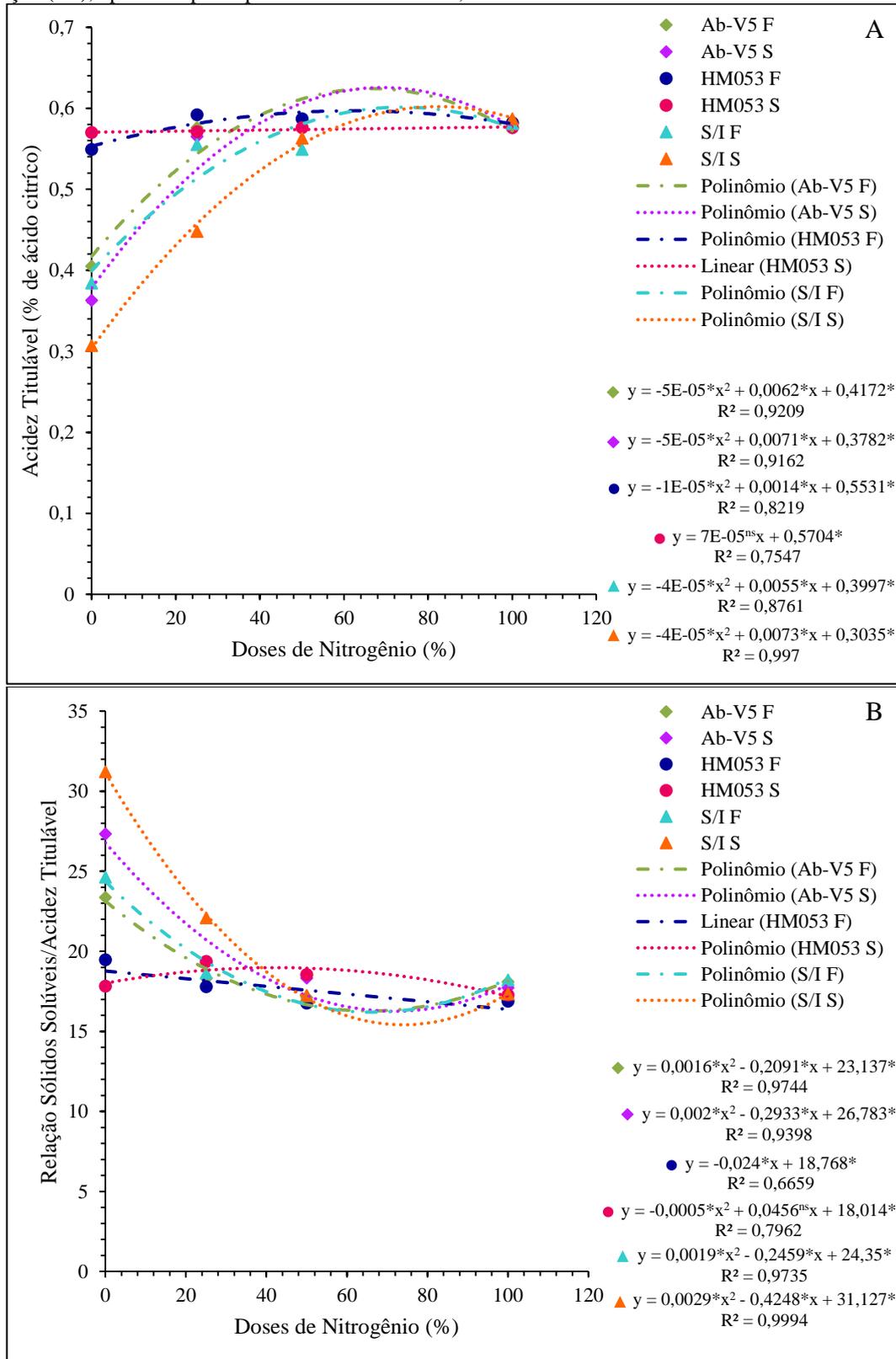
**Tabela 10:** Acidez titulável (% ácido cítrico) (A) e relação sólidos solúveis/acidez titulável (SS/AT) (B) dos frutos dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), em duas formas de inoculação (aspersão foliar e no solo, próximo a raiz), na safra de 2021.

| A Acidez Titulável (% ácido cítrico) |         |             |             |         |             |             |
|--------------------------------------|---------|-------------|-------------|---------|-------------|-------------|
| Doses de N (%)                       | Foliar  |             |             | Solo    |             |             |
|                                      | HM053   | Ab-V5       | S/I         | HM053   | Ab-V5       | S/I         |
| 0                                    | 0,549 a | 0,405 b A○○ | 0,384 b A○○ | 0,570 a | 0,363 b B○○ | 0,307 c B○○ |
| 25                                   | 0,592 a | 0,576 ab A  | 0,555 b     | 0,571 a | 0,565 a     | 0,448 b B○○ |
| 50                                   | 0,587 a | 0,587 a     | 0,549 b     | 0,576   | 0,576       | 0,563       |
| 100                                  | 0,582   | 0,576       | 0,581       | 0,576   | 0,582       | 0,587       |
| CV = 4,13%                           |         |             |             |         |             |             |

| B Relação sólidos solúveis/acidez titulável |         |             |             |         |             |             |
|---|---------|-------------|-------------|---------|-------------|-------------|
| Doses de N (%)                              | Foliar  |             |             | Solo    |             |             |
|   | HM053   | Ab-V5       | S/I         | HM053   | Ab-V5       | S/I         |
| 0   | 19,47 b | 23,36 a B○○ | 24,62 a B○○ | 17,81 c | 27,33 b A○○ | 31,21 a A○○ |
| 25  | 17,78   | 18,31       | 18,64 B     | 19,36 b | 19,27 b     | 22,08 a A○○ |
| 50  | 16,75 a | 17,11 a     | 17,23 a     | 18,54   | 18,32       | 17,23       |
| 100   | 16,88   | 18,08       | 18,21       | 17,26   | 17,71       | 17,33       |
| CV = 8,27%                                  |         |             |             |         |             |             |

Os dados representam a média de 6 repetições. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Scott Knott (p. 0,05). Letras minúsculas indicam diferenças entre as estirpes na mesma dose de nitrogênio. Letras maiúsculas representam diferenças entre a forma de inoculação. Círculos indicam comparação entre os tratamentos e os controles sem inoculação e dose completa de nitrogênio pelo teste de Dunnett (p.0,05). Círculos vermelhos ou verdes indicam médias maiores ou menores que o controle com inoculação foliar e círculos amarelos ou azuis, representam médias maiores ou menores que o controle com inoculação no solo.

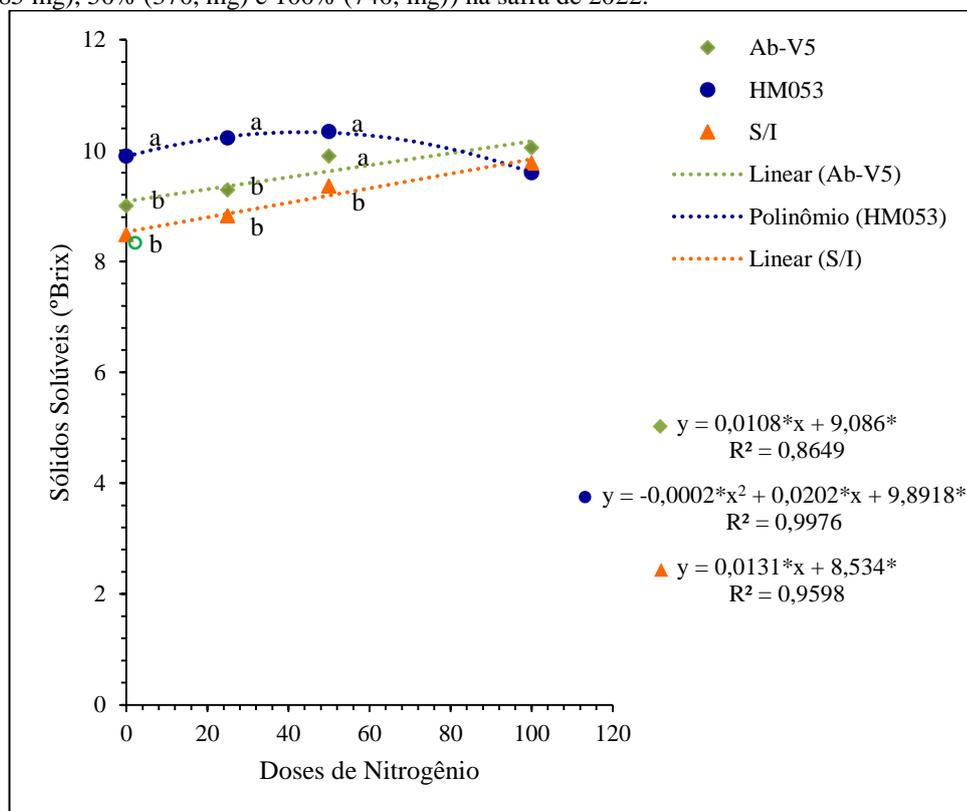
**Figura 24:** Efeito das diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) na acidez titulável (% ácido cítrico) (A) e relação sólidos solúveis/acidez titulável (SS/AT) (B) dos frutos dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), aplicados por aspersão foliar ou no solo, na safra de 2021.



Os dados representam a média de 6 repetições. As linhas tracejadas correspondem ao modelo linear ou polinomial ajustado; os valores seguidos \* indicam significância estatística (p.0,05). As letras “F” e “S” na legenda dos tratamentos simbolizam a forma de inoculação utilizada, foliar ou no solo, respectivamente.

Na safra de 2022, o maior teor de sólidos solúveis (10,34 °Brix) foi encontrado nos morangos das plantas tratadas com *A. brasilense* HM053 associado a 50% de nitrogênio, seguido pelos morangos do tratamento com *A. brasilense* HM053 + 25% de nitrogênio (10,34 °Brix). Já os morangos com menor teor de sólidos solúveis (8,48 °Brix) foram obtidos com a combinação sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio, sendo este, o único tratamento que diferiu, pelo teste de Dunnett (p.0,05), do controle sem inoculação e dose completa de nitrogênio (Figura 25).

**Figura 25:** Teor de sólidos solúveis (°Brix) dos frutos dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) na safra de 2022.



Os dados representam a média de 6 repetições. As linhas tracejadas correspondem ao modelo linear ou polinomial ajustado; os valores seguidos de \* indicam significância estatística (p.0,05). Letras iguais entre os tratamentos na mesma dose de nitrogênio não apresentam diferenças estatísticas, conforme determinado pelo teste de Tukey (p.0,05). Círculos verdes ou vermelhos representam valores inferiores ou superiores ao tratamento controle com dose completa de nitrogênio e sem inoculação, conforme determinado pelo teste de Dunnett (p.0,05).

De acordo com a tabela 11A, a maior acidez titulável (0,541% de ácido cítrico) foi observada nos morangos das plantas inoculadas por aspersão foliar de *A. brasilense* Ab-V5 associado a 25% de nitrogênio e nos frutos dos morangueiros inoculados no solo com *A. brasilense* HM053 + 50% de nitrogênio, enquanto os morangos com menor acidez titulável (0,386% de ácido cítrico) foram obtidos pela inoculação foliar de *A. brasilense* Ab-V5 associado a 50% de nitrogênio. Para ambos os tratamentos controle, a acidez do fruto tendeu a

umentar proporcionalmente à dose de nitrogênio (Figura 26A). Os frutos inoculados com a estirpe *A. brasilense* Ab-V5, com exceção da inoculação foliar e associação com aplicação de 25% de nitrogênio, foram estatisticamente menos ácidos que os frutos do tratamento controle. Já os frutos inoculados por aspersão foliar com *A. brasilense* HM053 e associado à aplicação de 25 ou 50% de nitrogênio e os morangos dos tratamentos inoculados no solo com *A. brasilense* HM053 + 0 a 50% de nitrogênio, foram significativamente mais ácidos que os controles.

De modo geral, os frutos dos morangueiros inoculados no solo com *A. brasilense* Ab-V5 e inoculados por aspersão foliar com a mesma estirpe e associados as doses de 50 e 100% de nitrogênio, apresentaram maior relação SS/AT (Tabela 11B) em relação aos controles sem inoculação, sendo a relação SS/AT máxima (25,97). Já os frutos do tratamento inoculados via foliar com *A. brasilense* Ab-V5 e associados a aplicação de 25% de nitrogênio demonstraram menor relação SS/AT (17,17). As doses de nitrogênio parecem não afetar a relação SS/AT ao serem associadas a inoculação no solo da estirpe HM053 (Figura 26B).

**Tabela 11:** Acidez titulável (% de ácido cítrico) (A) e relação sólidos solúveis/acidez titulável (SS/AT) (B) dos frutos dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), em duas formas de aplicação, na safra de 2022.

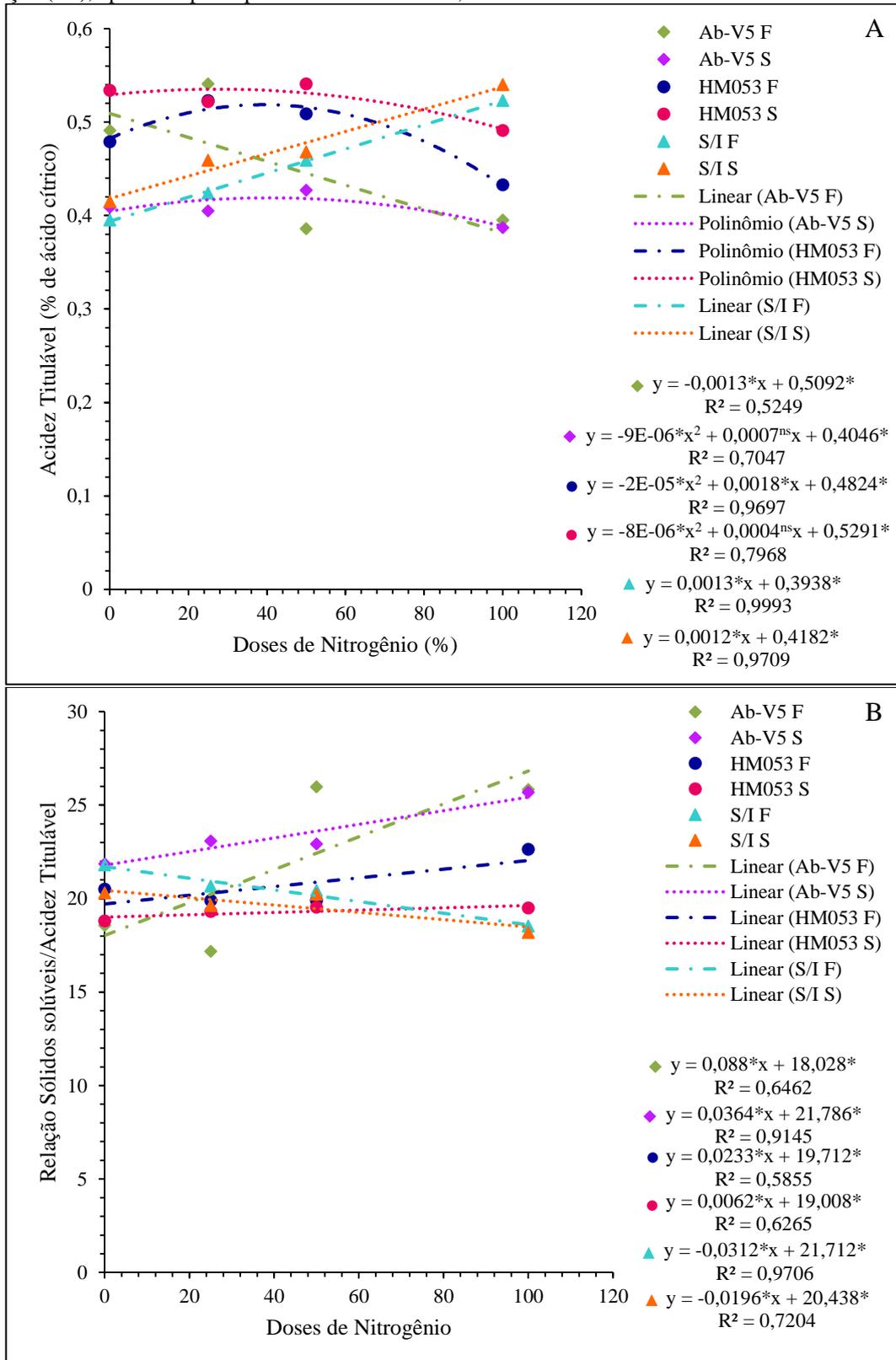
| A                                  |           |           |          |           |          |          |
|------------------------------------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|----------|
| Acidez Titulável (% ácido cítrico) |           |           |          |           |          |          |
| Doses de N (%)                     | Foliar    |           |          | Solo      |          |          |
|                                    | HM053     | Ab-V5     | S/I      | HM053     | Ab-V5    | S/I      |
| 0                                  | 0,479 a B | 0,491 a A | 0,395 b  | 0,534 a A | 0,409 bB | 0,415 b  |
| 25                                 | 0,523 a   | 0,541 a A | 0,424 bB | 0,522 a   | 0,405 cB | 0,459 bA |
| 50                                 | 0,509 a B | 0,386 cB  | 0,459 b  | 0,541 a A | 0,427 cA | 0,468 b  |
| 100                                | 0,433 bB  | 0,395 c   | 0,523 a  | 0,491 b A | 0,387 c  | 0,540 a  |
| CV = 5,74%                         |           |           |          |           |          |          |

| B   |          |          |           |          |          |         |
|---|----------|----------|-----------|----------|----------|---------|
| Relação sólidos solúveis/acidez titulável |          |          |           |          |          |         |
| Doses de N (%)                            | Foliar   |          |           | Solo     |          |         |
|   | HM053    | Ab-V5    | S/I       | HM053    | Ab-V5    | S/I     |
| 0   | 20,5 ab  | 18,55 bB | 21,79 a55 | 18,8 b   | 21,85 aA | 20,3 ab |
| 25  | 19,9 a   | 17,17 bB | 20,65 a   | 19,3 b   | 23,07 aA | 19,62 b |
| 50  | 19,89 b  | 25,97 aA | 20,42 b   | 19,53 b  | 22,92 aB | 20,23 b |
| 100                                       | 22,63 bA | 25,82 a  | 18,53 c   | 19,49 bB | 25,68 a  | 18,18 b |
| CV = 8,91%                                |          |          |           |          |          |         |

Os dados representam a média de 6 repetições. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Scott Knott (p. 0,05) para acidez titulável e Tukey (p.0,05) para a relação sólidos solúveis/acidez titulável. Letras minúsculas indicam diferenças entre as estirpes na mesma dose de nitrogênio. Letras maiúsculas representam diferenças entre a forma de inoculação. Círculos indicam comparação entre os tratamentos e os controles sem inoculação e dose completa de nitrogênio pelo teste de Dunnett (p.0,05). Círculos vermelhos ou verdes indicam médias maiores ou menores que o controle com inoculação foliar e círculos amarelos ou azuis, representam médias maiores ou menores que o controle com inoculação no solo.

**Figura 26:** Efeito das diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) na acidez titulável (% ácido cítrico) (A) e relação sólidos solúveis:acidez titulável (SS/AT) (B) dos frutos dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), aplicados por aspersão foliar ou no solo, na safra de 2022.



Os dados representam a média de 6 repetições. As linhas tracejadas correspondem ao modelo linear ou polinomial ajustado; os valores seguidos \* indicam significância estatística (p.0,05). As letras “F” e “S” na legenda dos tratamentos simbolizam a forma de inoculação utilizada, foliar ou no solo, respectivamente.

### 3.2.3.2.2 Compostos fenólicos, antocianinas e capacidade antioxidante

Na safra de 2021, o teor de compostos fenólicos foi influenciado pela forma de aplicação, pelas doses de nitrogênio e pelos microrganismos inoculados. Por outro lado, o teor de antocianinas foi afetado exclusivamente pelas doses de nitrogênio e microrganismos inoculados. Apenas o ensaio de captura do radical DPPH demonstrou significância na avaliação da atividade antioxidante (AAO), enquanto a captura do radical ABTS<sup>+</sup> apresentou similaridade entre os tratamentos, variando entre 250,69 a 258,50 mg de ácido ascórbico equivalente.100g de fruto.

Os frutos dos morangueiros inoculados com *A. brasilense* HM053 e associado às doses de 0 a 50% de nitrogênio, independente da forma de aplicação do inoculante, exibiram teores mais elevados de compostos fenólicos em comparação aos tratamentos controle. Essa tendência também foi observada nos morangos provenientes das plantas inoculadas por aspersão foliar com *A. brasilense* Ab-V5 e associado às doses de 0 e 25% de nitrogênio (Figura 27). O maior teor de compostos fenólicos (244,5 mg de ácido gálico equivalente.100g de fruto fresco) foi obtido no tratamento inoculado por aspersão foliar de *A. brasilense* HM053 + 25% de nitrogênio, enquanto o menor teor de compostos fenólicos (163,44 mg de ácido gálico equivalente.100g de fruto fresco) foi observado nos morangueiros das plantas sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio (Tabela 12).

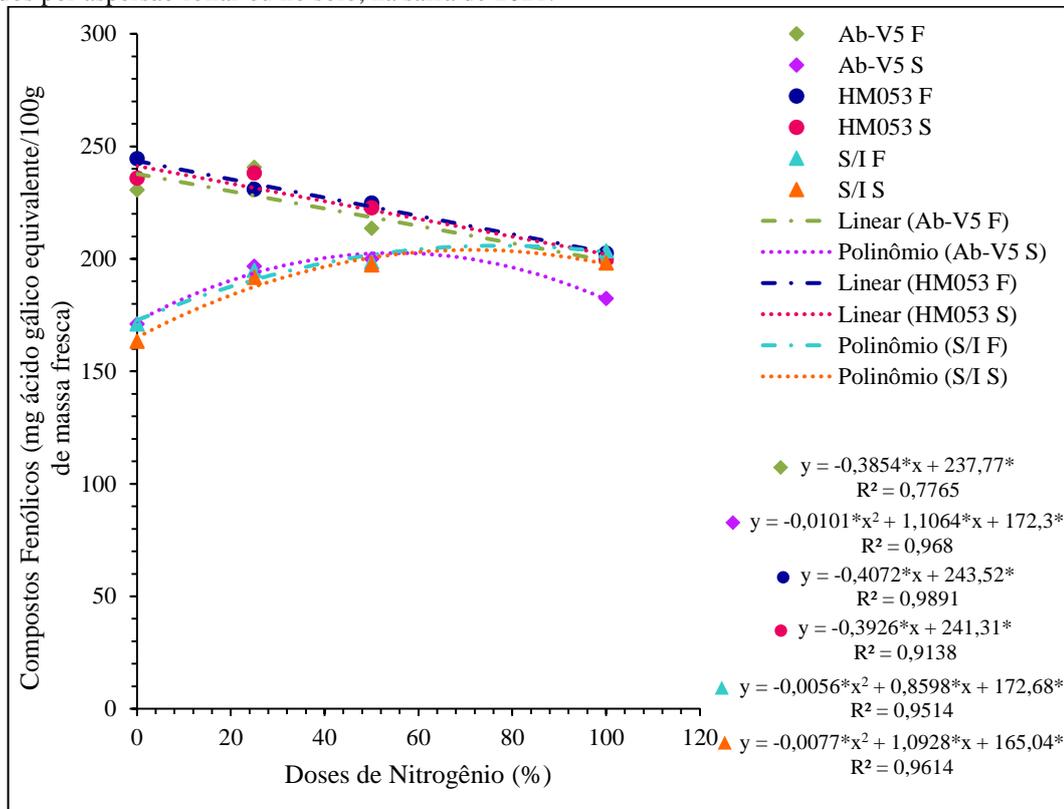
**Tabela 12:** Teor de Compostos Fenólicos (mg ácido gálico equivalente.100g de massa fresca) nos frutos de morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), em duas formas de inoculação (foliar e no solo), na safra de 2021.

| Doses de N<br>(%) | Compostos Fenólicos (mg ácido gálico equivalente.100g de massa fresca) |                        |                       |                       |                        |                       |
|-------------------|--|------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
|                   | Foliar   |                        |                       | Solo                  |                        |                       |
|                   | HM053  | Ab-V5                  | S/I                   | HM053                 | Ab-V5                  | S/I                   |
| 0                 | 244,50 a <sup>o</sup>  | 230,69 bA <sup>o</sup> | 171,11 c <sup>o</sup> | 235,84 a <sup>o</sup> | 171,11 bB <sup>o</sup> | 163,44 b <sup>o</sup> |
| 25                | 230,89 a <sup>o</sup>  | 240,78 aA <sup>o</sup> | 194,89 b              | 238,12 a <sup>o</sup> | 196,81 bB              | 191,83 b              |
| 50                | 224,87 a <sup>o</sup>  | 213,68 aA              | 198,61 b              | 223,69 a <sup>o</sup> | 200 bB                 | 197,32 b              |
| 100               | 202,56   | 198,47                 | 203,52 A              | 199,89 a              | 182,36 bB              | 198,21 a              |

CV = 5,63%

Os dados representam a média de 6 repetições. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (p.0,05). Letras minúsculas indicam diferenças entre as estirpes na mesma dose de nitrogênio. Letras maiúsculas representam diferenças entre a forma de inoculação. Círculos indicam comparação entre os tratamentos e os controles sem inoculação e dose completa de nitrogênio pelo teste de Dunnett (p.0,05). Círculos vermelhos ou verdes indicam médias maiores ou menores que o controle com inoculação foliar e círculos amarelos ou azuis, representam médias maiores ou menores que o controle com inoculação no solo.

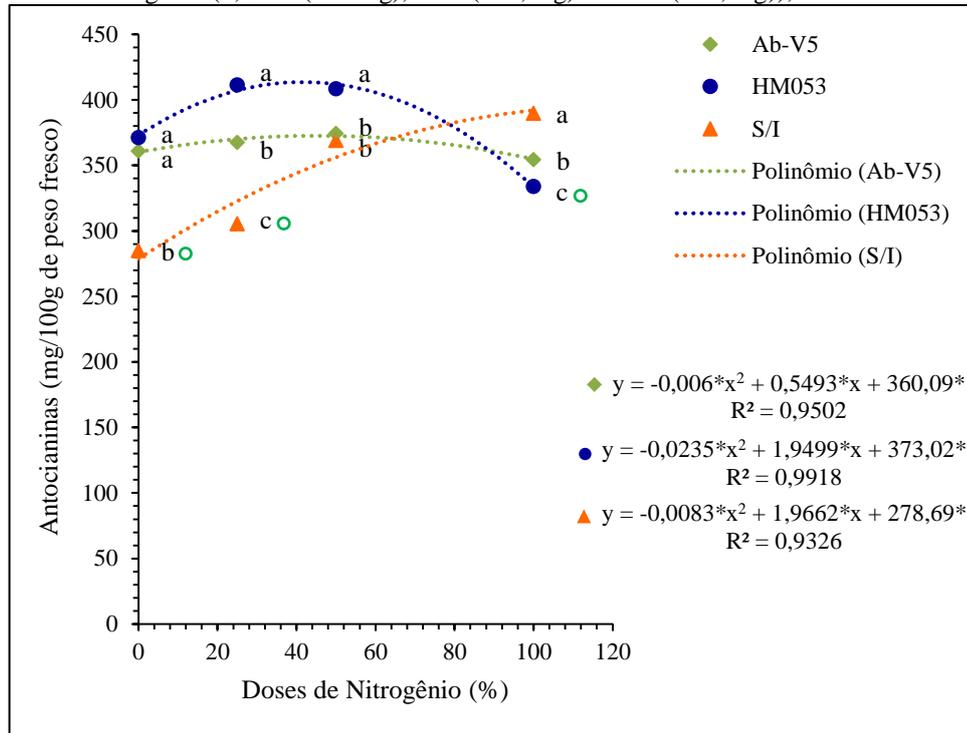
**Figura 27:** Efeito das diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) no teor de Compostos fenólicos (mg de ácido gálico equivalente.100 g de massa fresca) dos frutos dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), aplicados por aspersão foliar ou no solo, na safra de 2021.



Os dados representam a média de 6 repetições. As linhas tracejadas correspondem ao modelo linear ou polinomial ajustado; os valores seguidos \* indicam significância estatística (p.0,05). As letras “F” e “S” na legenda dos tratamentos simbolizam a forma de inoculação utilizada, foliar ou no solo, respectivamente.

O maior teor de antocianinas (411,47 mg. 100g de peso fresco) foi relatado nos morangos das plantas inoculadas com *A. brasilense* HM053 e combinadas a aplicação de 25% de nitrogênio, enquanto o menor teor de antocianinas (285,12 mg. 100g de peso fresco) foi obtido para os frutos do tratamento sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio (Figura 28). Como um todo, os frutos dos morangueiros inoculados com *A. brasilense* HM053 e associados as doses de 0 a 50% de nitrogênio, demonstraram teores mais elevados de antocianinas em comparação aos demais tratamentos nas mesmas doses de nitrogênio, contudo esses resultados não diferiram do controle sem inoculação e dose completa de nitrogênio, conforme confirmado pelo teste de Dunnett (p. 0,05).

**Figura 28:** Teor de Antocianinas (mg/100g de peso fresco) dos frutos dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), na safra de 2021.



Os dados representam a média de 6 repetições. As linhas tracejadas correspondem ao modelo linear ou polinomial ajustado; os valores seguidos de \* indicam significância estatística (p.0,05). Letras iguais entre os tratamentos na mesma dose de nitrogênio não apresentam diferenças estatísticas, conforme determinado pelo teste de Tukey (p.0,05). Círculos verdes ou vermelhos representam valores inferiores ou superiores ao tratamento controle com dose completa de nitrogênio e sem inoculação, conforme determinado pelo teste de Dunnett (p.0,05).

A avaliação da atividade antioxidante (AAO) nos frutos de morango foi influenciada pela dose de nitrogênio, microrganismo inoculado e forma de aplicação do inoculante. Os resultados demonstraram que a AAO, medida pelo consumo do radical DPPH, atingiu expressão máxima (50,95% de AAO) nos morangos submetidos ao tratamento de inoculação por aspersão foliar de *A. brasilense* Ab-V5 e sem inoculação. Em contraste, o menor consumo do radical DPPH (1,92% de AAO) foi observado nos morangos do tratamento sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio (Tabela 13). A atividade antioxidante aumentou proporcionalmente ao aumento das doses de nitrogênio nos tratamentos controle. Similarmente, a atividade antioxidante aumentou conforme a dose de nitrogênio (até 50%) nos morangos provenientes das plantas inoculadas com *A. brasilense* HM053 (Figura 29).

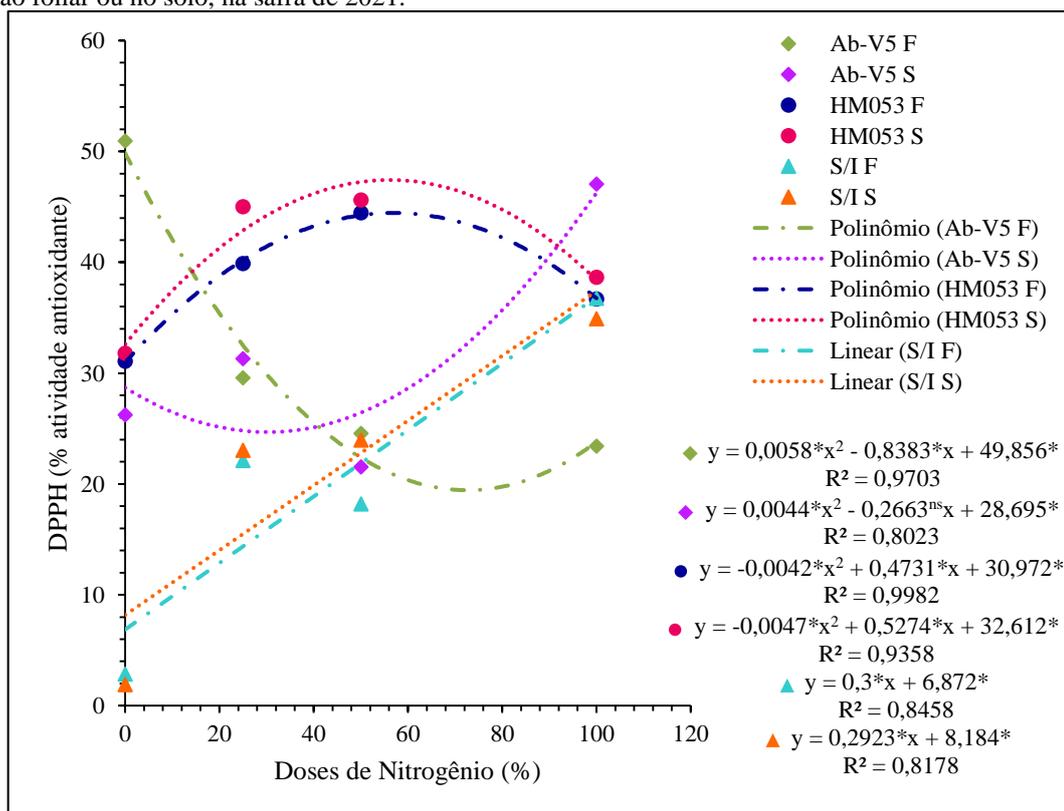
**Tabela 13:** Atividade antioxidante (AAO) referente ao consumo do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) nos frutos de morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), em duas formas de inoculação (foliar e no solo), na safra de 2021.

| Doses de N<br>(%) | DPPH (% AAO) |           |         |         |           |         |
|-------------------|--------------|-----------|---------|---------|-----------|---------|
|                   | Foliar       |           |         | Solo    |           |         |
|                   | HM053        | Ab-V5     | S/I     | HM053   | Ab-V5     | S/I     |
| 0                 | 31,09 b      | 50,95 a A | 2,87 c  | 31,80 a | 26,25 a B | 1,92 b  |
| 25                | 39,89 a      | 29,59 b   | 22,14 b | 45,03 a | 31,32 b   | 23,06 b |
| 50                | 44,48 a      | 24,57 b   | 18,22 b | 45,62 a | 21,54 b   | 23,97 b |
| 100               | 36,71 a      | 23,42 b B | 36,75 a | 38,67 b | 47,08 a A | 34,93 b |

CV = 27,74%

Os dados representam a média de 6 repetições. Letras iguais indicam ausência de diferenças estatísticas, conforme determinado pelo teste de Scott Knott (p.0,05). Letras minúsculas denotam diferenças entre as estirpes na mesma dose de nitrogênio, enquanto letras maiúsculas indicam variação entre as formas de inoculação. Círculos foram utilizados para comparação com os controles sem inoculação e aplicação da dose completa de nitrogênio, conforme determinado pelo teste de Dunnett (p.0,05). Círculos vermelhos ou verdes sinalizam médias superiores ou inferiores ao controle com inoculação foliar e círculos amarelos ou azuis, sinalizam médias superiores ou inferiores ao controle com inoculação no solo.

**Figura 29:** Efeito das diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) na atividade antioxidante (AAO) em relação ao radical DPPH nos frutos dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), aplicados por aspersão foliar ou no solo, na safra de 2021.



Os dados representam a média de 6 repetições. As linhas tracejadas correspondem ao modelo linear ou polinomial ajustado; os valores seguidos \* indicam significância estatística (p.0,05). As letras "F" e "S" na legenda dos tratamentos simbolizam a forma de inoculação utilizada, foliar ou no solo, respectivamente.

Na safra de 2022, não foram identificadas diferenças significativas nos teores de compostos fenólicos entre os diferentes tratamentos, com variação de 302,75 a 337,83 mg de ácido gálico equivalente.100g de fruto fresco. Contudo, os teores de antocianinas e a atividade

antioxidante em relação ao radical DPPH foram influenciados pela dose de nitrogênio, tipo de microrganismo inoculado e forma de aplicação do inoculante. Já a atividade antioxidante em relação ao radical ABTS<sup>+</sup> foi exclusivamente afetada pela dose de nitrogênio e tipo de microrganismos inoculados.

Os morangos provenientes das plantas inoculadas com *A. brasilense* Ab-V5 e associadas à dose completa de nitrogênio demonstraram o maior teor de antocianinas (533,17 mg. 100 g de peso fresco), enquanto os frutos do tratamento sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio exibiram o menor teor de antocianinas (201,05 mg. 100 g de peso fresco) (Tabela 14). Nos frutos dos morangueiros inoculados por aspersão foliar com a estirpe *A. brasilense* Ab-V5, o aumento nos teores de antocianinas aumentou conforme o aumento das doses de nitrogênio. De forma semelhante, até a aplicação de 50% de nitrogênio, houve um aumento proporcional nos teores de antocianinas nos morangos das plantas inoculadas com *A. brasilense* HM053, independente da forma de inoculação (Figura 29). Em geral, todos os tratamentos com inoculação resultaram em frutos com maiores teores de antocianinas se comparados aos tratamentos controle.

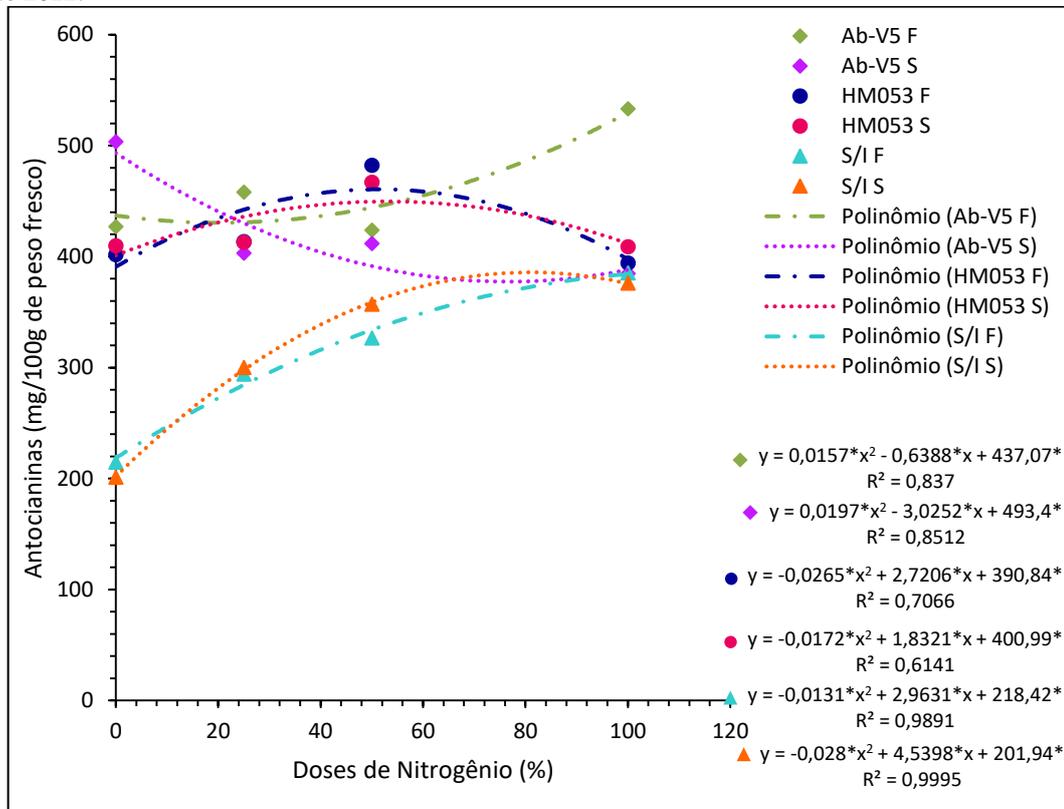
**Tabela 14:** Teor de Antocianinas (mg.100 g de peso fresco) dos frutos dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), aplicados por aspersão foliar ou no solo, na safra de 2022.

| Doses de N<br>(%) | Antocianinas (mg.100 g de peso fresco) |                                     |                                     |                                    |                                     |                                    |
|-------------------|--|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
|                   | Foliar                                 |                                     |                                     | Solo                               |                                     |                                    |
|                   | HM053                                  | Ab-V5                               | S/I                                 | HM053                              | Ab-V5                               | S/I                                |
| 0                 | 407,39 b <sup>○</sup> <sup>○</sup>     | 426,90 aB <sup>○</sup> <sup>○</sup> | 214,74 c <sup>○</sup> <sup>○</sup>  | 409,69 b <sup>○</sup> <sup>○</sup> | 503,54 aA <sup>○</sup> <sup>○</sup> | 201,05 c <sup>○</sup> <sup>○</sup> |
| 25                | 413,39 b <sup>○</sup> <sup>○</sup>     | 458 aA <sup>○</sup> <sup>○</sup>    | 294,17 c <sup>○</sup> <sup>○</sup>  | 412,83 a <sup>○</sup> <sup>○</sup> | 403,06 aB <sup>○</sup> <sup>○</sup> | 300,28 b <sup>○</sup> <sup>○</sup> |
| 50                | 482,26 a <sup>○</sup> <sup>○</sup>     | 423,94 b <sup>○</sup> <sup>○</sup>  | 326,58 cB <sup>○</sup> <sup>○</sup> | 466,9 a <sup>○</sup> <sup>○</sup>  | 411,73 b <sup>○</sup> <sup>○</sup>  | 357,10 cA                          |
| 100               | 394,15 b                               | 533,17 aA <sup>○</sup> <sup>○</sup> | 381,9 b                             | 408,94 a <sup>○</sup> <sup>○</sup> | 384,74 bB                           | 375,99 b                           |

CV = 3,85%

Os dados representam a média de 6 repetições. Letras iguais indicam ausência de diferenças estatísticas, conforme determinado pelo teste de Scott Knott (p.0,05). Letras minúsculas denotam diferenças entre as estirpes na mesma dose de nitrogênio, enquanto letras maiúsculas indicam variação entre as formas de inoculação. Círculos foram utilizados para comparação com os controles sem inoculação e aplicação da dose completa de nitrogênio, conforme determinado pelo teste de Dunnett (p.0,05). Círculos vermelhos ou verdes sinalizam médias superiores ou inferiores ao controle com inoculação foliar e círculos amarelos ou azuis, sinalizam médias superiores ou inferiores ao controle com inoculação no solo.

**Figura 30:** Efeito das diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) no Teor de Antocianinas (mg.100 g de peso fresco) dos frutos dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), aplicados por aspersão foliar ou no solo, na safra de 2022.



Os dados representam a média de 6 repetições. As linhas tracejadas correspondem ao modelo linear ou polinomial ajustado; os valores seguidos \* indicam significância estatística (p.0,05). As letras “F” e “S” na legenda dos tratamentos simbolizam a forma de inoculação utilizada, foliar ou no solo, respectivamente.

Os resultados obtidos para a atividade antioxidante em relação ao radical DPPH revelaram valores mais elevados nos morangos provenientes das plantas inoculadas por aspersão foliar de *A. brasilense* Ab-V5 ou HM053, associados à aplicação de 25% de nitrogênio (55,98% e 54,47% de AAO, respectivamente). Apenas esses dois tratamentos diferiram do controle sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio, conforme evidenciado pelo teste de Dunnett (p.0,05). Em contrapartida, a menor AAO foi observada nos morangos do tratamento sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio (3,29% AAO) (Tabela15). As doses de nitrogênio não apresentaram significância quando associadas à estirpe Ab-V5 e inoculação no solo, enquanto nos tratamentos sem inoculação, observou-se que quanto maior a dose de nitrogênio, maior foi a atividade antioxidante (Figura 31).

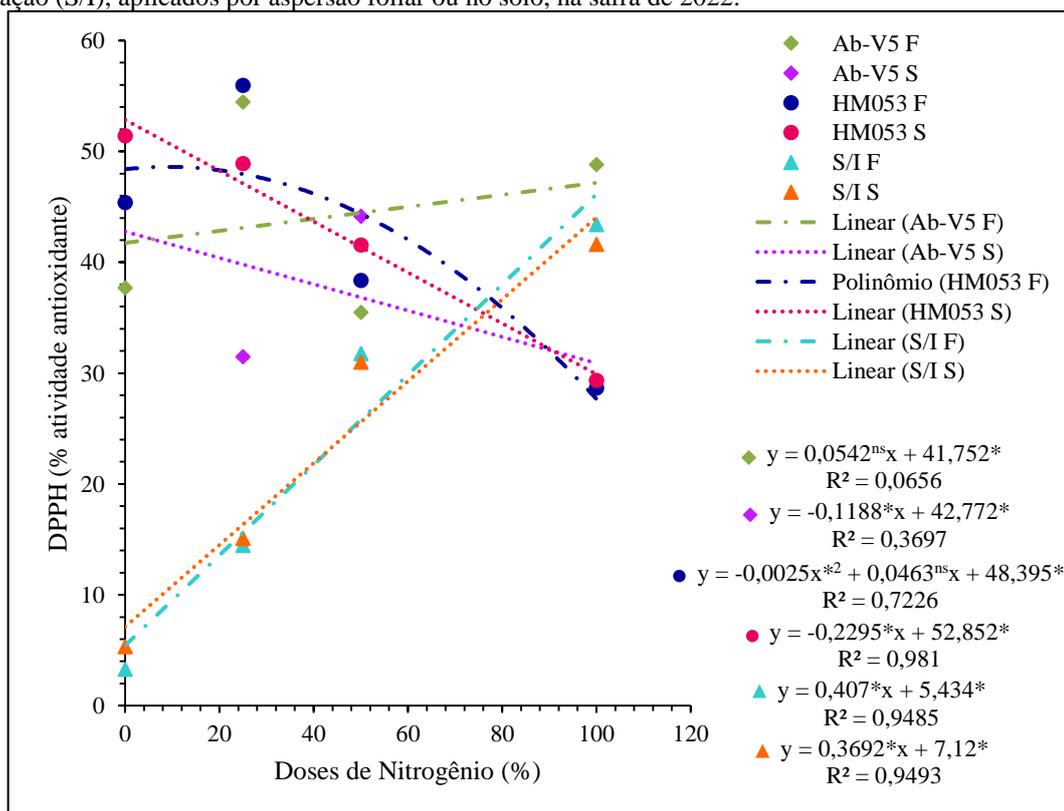
**Tabela 15:** Atividade antioxidante (AAO) em relação ao radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) dos frutos dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), aplicados por aspersão foliar ou no solo, na safra de 2022.

| Doses de N (%) | DPPH (% AAO) |           |         |          |           |         |
|----------------|--------------|-----------|---------|----------|-----------|---------|
|                | Foliar       |           |         | Solo     |           |         |
|                | HM053        | Ab-V5     | S/I     | HM053    | Ab-V5     | S/I     |
| 0              | 45,39 a      | 37,72 b B | 3,29 c  | 51,42 a  | 45,34 a A | 5,34    |
| 25             | 55,98 aA     | 54,47 aA  | 14,47 b | 48,9 a B | 31,5 b B  | 15,11 c |
| 50             | 38,36        | 35,48 B   | 31,78   | 41,55 a  | 44,15 a A | 31 b    |
| 100            | 28,67 b      | 48,82 a A | 43,42   | 29,36 b  | 29,31 b B | 41,64 a |

CV = 17,14%

Os dados representam a média de 6 repetições. Letras iguais indicam ausência de diferenças estatísticas, conforme determinado pelo teste de Scott Knott (p.0,05). Letras minúsculas denotam diferenças entre as estirpes na mesma dose de nitrogênio, enquanto letras maiúsculas indicam variação entre as formas de inoculação. Círculos foram utilizados para comparação com os controles sem inoculação e aplicação da dose completa de nitrogênio, conforme determinado pelo teste de Dunnett (p.0,05). Círculos vermelhos ou verdes sinalizam médias superiores ou inferiores ao controle com inoculação foliar e círculos amarelos ou azuis, sinalizam médias superiores ou inferiores ao controle com inoculação no solo.

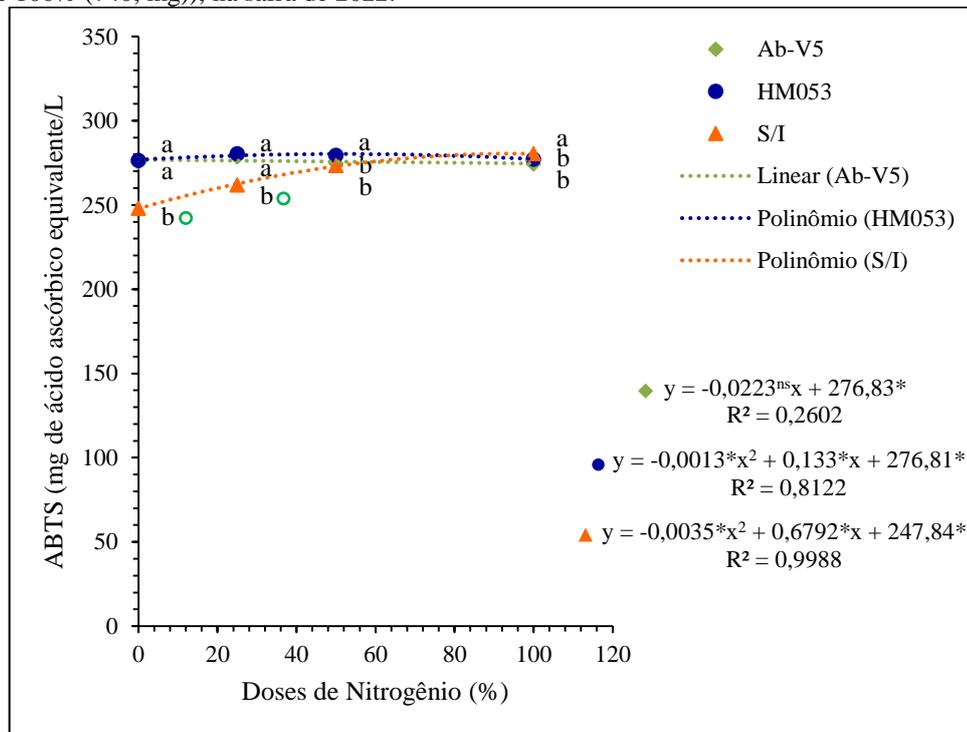
**Figura 31:** Efeito das diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)) na atividade antioxidante (AAO) em relação ao radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) dos frutos dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), aplicados por aspersão foliar ou no solo, na safra de 2022.



Os dados representam a média de 6 repetições. As linhas tracejadas correspondem ao modelo linear ou polinomial ajustado; os valores seguidos \* indicam significância estatística (p.0,05). As letras "F" e "S" na legenda dos tratamentos simbolizam a forma de inoculação utilizada, foliar ou no solo, respectivamente.

Quanto a atividade antioxidante em relação ao radical ABTS<sup>+</sup>, os frutos inoculados com *A. brasilense* HM053 + 25% de nitrogênio apresentaram maior consumo (280,38 mg de ácido ascórbico equivalente.100g de fruto), enquanto a menor captura do radical ABTS<sup>+</sup> (248,08 mg de ácido ascórbico equivalente.100g de fruto) foi registrada nos frutos da combinação sem inoculação e sem aplicação de nitrogênio (Figura 32). Os frutos dos morangueiros inoculados apresentaram AAO semelhante às do controle sem inoculação e dose completa de nitrogênio, enquanto os frutos dos morangueiros sem inoculação e com aplicação de 0 e 25% de nitrogênio apresentaram AAO significativamente menor à do tratamento controle, conforme o teste de Dunnett (p.0,05). As doses de nitrogênio não foram significativas para estirpe Ab-V5.

**Figura 32:** Atividade antioxidante (AAO) em relação ao radical ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azinobis-3-etilbenzoatiazolina-6-ácido sulfônico) dos frutos dos morangueiros inoculados com *Azospirillum brasilense* Ab-V5, ou *Azospirillum brasilense* HM053 ou sem inoculação (S/I), combinados a diferentes doses de nitrogênio (0, 25% (185 mg), 50% (370, mg) e 100% (740, mg)), na safra de 2022.



Os dados representam a média de 6 repetições. As linhas tracejadas correspondem ao modelo linear ou polinomial ajustado; os valores seguidos de \* indicam significância estatística (p.0,05). Letras iguais entre os tratamentos na mesma dose de nitrogênio não apresentam diferenças estatística, conforme determinado pelo teste de Tukey (p.0,05). Círculos verdes ou vermelhos representam valores inferiores ou superiores ao tratamento controle com dose completa de nitrogênio e sem inoculação, conforme determinado pelo teste de Dunnett (p.0,05).

### 3.2.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, duas estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5 e HM053) foram associadas a quatro doses de nitrogênio e duas formas de inoculação e avaliadas quanto ao seu efeito no desenvolvimento, crescimento e produção de morangueiros, cultivar Florida Festival, cultivados em duas safras consecutivas em condições de campo. Os resultados obtidos para o

desenvolvimento da planta indicam que a inoculação das estirpes de *A. brasilense* beneficiou o crescimento dos morangueiros, especialmente a inoculação de *A. brasilense* HM053 associada as menores doses de nitrogênio.

Embora estudos sobre o potencial de promoção do crescimento vegetal da estirpe *A. brasilense* HM053 em frutíferas seja escasso na literatura, os resultados aqui obtidos estão de acordo com o relatado por inúmeros autores para culturas gramíneas. Por exemplo, Pankievicz e colaboradores (2015) demonstraram que *A. brasilense* HM053 foi capaz de promover o crescimento e fornecer 100% das necessidades diárias de nitrogênio em *Setaria viridis*. A estirpe HM053 também foi capaz de colonizar de forma eficiente a superfície de raízes de trigo cultivados em condições axênicas, aumentando a massa seca da parte aérea e das raízes em 30 e 49% em relação a plantas não inoculadas e em 30 e 31% quando comparadas a estirpe *A. brasilense* FP2 (Santos *et al.*, 2017a). De forma semelhante, Santos e colaboradores (2017b) apontaram a eficácia da estirpe HM053 em colonizar raízes de cevada cultivadas *in vitro*, melhorando o crescimento das raízes e peso seco das plantas.

A aplicação dos inoculantes, seja por aspersão foliar ou no solo, próximo as raízes, demonstrou significância apenas em alguns parâmetros. Na safra de 2021, foram observadas diferenças significativas na acidez titulável, relação sólidos solúveis/acidez titulável, compostos fenólicos e atividade antioxidante em relação ao consumo do radical DPPH. Já na safra de 2022, além desses parâmetros, com exceção dos compostos fenólicos, a altura da planta, massa fresca e seca das raízes e teor de antocianinas também foram afetadas. Exceto pela massa seca e fresca das raízes e acidez titulável em 2022, a inoculação de *A. brasilense* Ab-V5 mostrou-se mais influenciada pela forma de aplicação. Embora não tenha havido uma diferenciação definitiva, a aplicação foliar mostrou-se ligeiramente prevalente.

Ao testarem diferentes métodos de inoculação com *Azospirillum*, Fukami e colaboradores (2016), observaram aumento na colonização interna das partes aéreas de plantas de trigo inoculadas por pulverização foliar, sugerindo uma elevada mobilidade desses microrganismos através da planta. Em concordância, Hungria e colaboradores (2022) obtiveram alterações benéficas nas características morfológicas das raízes de plantas de milho inoculadas por pulverização foliar com *A. brasilense*. Já Pedraza e colaboradores (2007) demonstraram a ocorrência natural de *A. brasilense* colonizando os tecidos superficiais e internos das raízes de morangueiros, bem como o tecido interno de estolões. Enquanto Guerrero-Molina e colaboradores (2012) ao inocularem plantas de morango com *A. brasilense*, observaram a colonização eficaz das raízes e posterior colonização de plantas filhas através de estolões, apoiando a mobilidade do *Azospirillum* nos tecidos vegetais.

Com base nas evidências citadas, pode-se formular as seguintes hipóteses: I. A inoculação por aspersão foliar favoreceu a colonização dos tecidos superficiais da parte aérea das plantas de morango. Como observado para outras espécies agrícolas (Baldotto *et al.*, 2011; Fukami *et al.*, 2016), sugere-se que os estômatos tenham atuado como uma via passiva para entrada dos microrganismos nos tecidos das folhas, possibilitando sua sobrevivência e subsequente colonização, o que pode ter contribuído para o desenvolvimento dos morangueiros. II. Por outro lado, a inoculação no solo, próxima às raízes, pode ter reduzido o estresse associado à inoculação, favorecendo a rápida colonização radicular, possibilitando a manifestação dos efeitos promotores de crescimento inerentes ao gênero *Azospirillum*.

Ao final da safra de 2021, a altura das plantas não apresentou diferença significativa em relação ao controle com dose completa de nitrogênio e sem inoculação, enquanto ao final da safra de 2022 os morangueiros inoculados por aspersão foliar com ambas as estirpes de *A. brasilense* apresentaram alturas maiores em comparação com aquelas inoculadas no solo. O número de folhas, em ambas as safras, não diferiu do controle sem inoculação e dose completa de nitrogênio. Embora as plantas inoculadas com *A. brasilense* HM053 e associadas às doses de 0 a 50% de nitrogênio não tenham apresentado diferenças em relação à massa fresca e seca da parte aérea quando comparadas com o controle, observou-se um pequeno incremento de aproximadamente 7% e 14,7%, respectivamente, nas plantas inoculadas. O mesmo padrão foi observado para a biomassa total, onde, embora não tenham sido observadas diferenças em relação ao controle sem inoculação e dose completa de nitrogênio, as plantas inoculadas com *A. brasilense* HM053 associadas às doses de 0 a 50% de nitrogênio apresentaram, em média, um aumento de 17% em sua biomassa total.

Os resultados também indicaram uma resposta significativa do sistema radicular dos morangueiros às inoculações com as estirpes de *A. brasilense*. Notavelmente a combinação da estirpe HM053 associada a aplicação de 25% ou 50% de nitrogênio resultou em um aumento de 11,8% (3,50 cm) e 14,72% (4,35 cm) no comprimento das raízes, respectivamente, em comparação ao tratamento controle sem inoculação e dose completa de nitrogênio. Além disso, os morangueiros inoculados por aspersão foliar de *A. brasilense* HM053 e associados a aplicação de 0 ou 25% de nitrogênio apresentaram maior massa fresca e massa seca das raízes em comparação aos demais tratamentos. Sendo possível observar um incremento de 27,63 g (36,6%) e 20,11 g (26,6%) na massa fresca e 29,48 g (82,34%) e 14,47 g (40%) na massa seca das raízes em relação ao controle sem inoculação e dose completa de nitrogênio.

Resultados semelhantes foram obtidos por Pedraza e colaboradores (2010) ao avaliar a inoculação de estirpes de *A. brasilense* isoladas de diferentes tecidos de morangueiros. De modo

semelhante, Soltaniband e colaboradores (2022), demonstraram um aumento de 20 e 12% para o número de folhas e diâmetro da copa, respectivamente, em morangueiros inoculados com uma combinação de *A. brasilense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Bacillus amyloliquefaciens* quando comparados ao controle sem inoculação.

Estudando os efeitos da associação entre RPCV e adubação nitrogenada, de Andrade e colabores (2019) mostraram aumento nos parâmetros de crescimento tanto em morangueiros inoculados apenas com *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V5 + 50% de nitrogênio, quanto na associação de 3 RPCV e diferentes doses de nitrogênio. Os mesmos autores também relatam que na presença de 50% de fertilizantes nitrogenados, a associação das RPCV *Enterobacter cloacae* CCMA 1285, *A. brasilense* Ab-v5 e *Burkholderia cepacia*-CCMA 0056 resultou em um aumento de 60,61% da biomassa total em plantas de morango quando comparadas a plantas não inoculadas. Em concordância, Chebotar e colaboradores (2022), após 3 safras consecutivas com a inoculação de *Bacillus velezensis* BS89, obtiveram um aumento de 120% no peso das raízes de morangueiros. Já Silva e colaboradores (2022) demonstraram melhora no diâmetro da copa, área foliar e alongamento das raízes de morangueiros suplementados com 30% da demanda de fosforo e nitrogênio e inoculados com as RPCV *A. brasilense* (Ab-v5), *Bacillus megaterium* (CCMA 0004) e *Bacillus fluminis* (MET12M2) isoladamente e associadas entre si.

Acredita-se que o gênero *Azospirillum* promova o crescimento das plantas por dois mecanismos principais, a fixação biológica de nitrogênio e a produção de fitohormônios (Cassán *et al.*, 2020). A estirpe HM053, caracterizada por hiperfixar N<sub>2</sub> e excretar amônio constitutivamente, também é capaz de produzir altos níveis de auxina como ácido indol-3-acético (AIA) e proporcionar melhor assimilação de ferro nas plantas (Pedrosa *et al.*, 2017; Housh *et al.*, 2021; Housh *et al.*, 2023). O AIA está envolvido no processo de divisão celular, desenvolvimento e alongamento das raízes e indução de raízes laterais, em consequência, a superfície radicular mais densa e extensa possibilita maior exploração do solo pelas plantas em busca de água e nutrientes (de Andrade *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020; Silva *et al.* 2022; Valle-Romero *et al.*, 2023; Fasusi *et al.*, 2023). Assim, pode-se supor que os mecanismos de ação da estirpe *A. brasilense* HM053 desempenharam um papel fundamental na modulação do sistema radicular dos morangueiros.

Os resultados obtidos para o número de frutos por plantas, peso médio dos frutos e produtividade por hectare indicam um impacto positivo da inoculação de *A. brasilense* nos morangueiros em ambas as safras. Embora o peso médio dos frutos não tenha variado entre as safras, a produtividade foi relativamente maior na safra de 2022, conforme esperado para

cultivar Florida Festival, cuja produção tende a melhorar no segundo ano de cultivo (Chandler *et al.*, 2000).

Notavelmente, na safra de 2021, a produtividade das plantas inoculadas com *A. brasilense* HM053 e aplicação de 25% de nitrogênio mostrou-se 11,67% superior à observada no tratamento controle. Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas nas produtividades das plantas inoculadas com *A. brasilense* HM053 e associada à aplicação de 0 ou 50% de nitrogênio, bem como as inoculadas com *A. brasilense* Ab-V5 e associadas à aplicação de 50% ou 100% de nitrogênio, em comparação com o tratamento controle, é notável um aumento, mesmo que pequeno, na produtividade dessas plantas. Por exemplo, a inoculação de *A. brasilense* HM053 e sem aplicação de nitrogênio levou a um aumento de 2,77 toneladas de morangos por hectare cultivado, enquanto a inoculação de *A. brasilense* Ab-V5 associada a aplicação de 50% de nitrogênio gerou um aumento de 2,53 toneladas de morangos por hectare cultivado.

Na safra de 2022, as plantas inoculadas com *A. brasilense* HM053 e associadas às doses de 0 a 50% de nitrogênio, bem como as inoculadas com *A. brasilense* Ab-V5 e associadas às doses de 0 ou 100% de nitrogênio apresentaram produtividade semelhante à observada nas plantas do controle sem inoculação e dose completa de nitrogênio. Porém, como inferido para a safra anterior, foi possível notar um discreto aumento na produtividade dessas plantas. Por exemplo os morangueiros inoculados com *A. brasilense* HM053 e associados às doses de 0 ou 50% de nitrogênio, obtiveram, em média, acréscimo de 1,36 toneladas de morango por hectare produzido, enquanto a combinação dessa estirpe com a aplicação de 25% de nitrogênio resultou em um aumento de 2,29 toneladas de fruto por hectare.

Resultados semelhantes foram observados por Chebotar e colaboradores (2022), em experimentos a campo com a inoculação de *Bacillus velezensis* BS89 em três safras consecutivas, com aumento de 6,7 a 36,4% na produtividade dos frutos em relação ao controle não inoculado. Um aumento significativo de 29,9 e 32,6% na produção de morangueiros inoculados com *Methylobacterium symbioticum* combinadas a 25 e 75% de nitrogênio (em forma de nitrato), respectivamente, foi observado por Torres Vera e colaboradores (2023).

Ao testar a eficiência de *A. brasilense* HM053 como biofertilizante para o milho, Pedrosa e colaboradores (2020) observaram que essa estirpe, combinada com uma adubação de base de 30% de N, aumentou a produção entre 4,7 a 29%, um incremento de cerca de 460 a 1769 kg ha<sup>-1</sup>, enquanto a estirpe comercial Ab-V5, nas mesmas condições, levou a um aumento de 2,2 a 10,4% na produção (178 a 760 Kg ha<sup>-1</sup>). Por outro lado, Chandramohan Reddy e Goyal (2021), obtiveram melhores valores na produção e qualidade de morangos inoculados com

*Azotobacter* ou *Azospirillum* associadas a 100% da dose de nitrogênio recomendada para cultura do morango. De modo semelhante, Rueda e colaboradores (2016), ao utilizarem as mesmas estirpes, encontraram melhor produtividade em morangueiros inoculados e associados a dose completa de nitrogênio.

Considerando uma média de produtividade entre as duas safras, observou-se que os morangueiros inoculados com *A. brasilense* HM053 e associados à aplicação de 0, 25% ou 50% de nitrogênio apresentaram um aumento de 2,3 t.ha, 2,92 t.ha e 1,87 t.ha, respectivamente, em relação ao controle sem inoculação e dose completa de nitrogênio. Essa melhoria na produtividade poderia resultar em benefícios econômicos significativos para o produtor. Ao aplicar apenas 25% da dose recomendada de nitrogênio, os custos de produção com adubos nitrogenados seriam reduzidos em 75%. Com base no preço da ureia a R\$ 2.200 por tonelada e no uso de 100 a 150 kg de ureia por hectare, a redução de 75% na aplicação de fertilizantes nitrogenados resultaria em uma economia de aproximadamente R\$ 198 por hectare. Além dessa redução nos custos, o aumento de 2,92 t.ha obtido com a inoculação de *A. brasilense* HM053 associado a aplicação de 25% de nitrogênio, considerando um preço de R\$ 15 o kg do fruto, resultaria em um lucro adicional de aproximadamente R\$ 43.800 por hectare.

Segundo as indicações do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, 2006), onde 1 kg de fertilizante nitrogenado equivale a 10,5 kg de dióxido de carbono equivalente (CO<sub>2</sub>-e), ao substituir 50% dos adubos nitrogenados no cultivo do morango por *A. brasilense* HM053, aproximadamente 630 kg de CO<sub>2</sub>-e por hectare não seriam emitidos. Já ao substituir 75% dos adubos nitrogenados, obter-se-ia uma redução na emissão de CO<sub>2</sub>-e de 945 kg de CO<sub>2</sub>-e por hectare cultivado. Indicando que a utilização de microrganismos promotores do crescimento vegetal, como *A. brasilense*, não apenas reduz os custos de produção, mas também aumenta o lucro do produtor, bem como é uma abordagem estratégica para mitigar as emissões de gases de efeito estufa e contribuir para agricultura sustentável.

Em relação aos parâmetros de qualidade do fruto, a inoculação das estirpes de *A. brasilense* Ab-V5 e HM053 demonstrou influenciar positivamente o teor de antocianinas nos frutos. Na safra de 2021 observaram-se maiores valores de antocianinas nos morangos das plantas inoculadas com *A. brasilense* HM053 e associadas à aplicação de 0 a 50% de nitrogênio, já na safra de 2022, independente da forma de inoculação, os frutos das plantas inoculadas com ambas as estirpes apresentaram maiores teores de antocianinas em comparação com os tratamentos controle. Com destaque para inoculação foliar de *A. brasilense* Ab-V5 associada à aplicação de 100% de nitrogênio, e a inoculação foliar de *A. brasilense* HM053 associada à

aplicação de 50% de nitrogênio, que registraram aumentos de 39,6% (151,27 mg.100 g de peso fresco) e 26,3% (100,36 mg.100 g de peso fresco), respectivamente, em relação ao controle.

Resultados semelhantes foram obtidos por Soltaniband e colaboradores (2022), onde morangueiros inoculados com uma combinação de *Rhizoglyphus irregularis* (micorriza) e *Azospirillum brasilense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Bacillus amyloliquefaciens* produziram frutos com 17% mais antocianinas que o tratamento controle. Antocianinas possuem capacidade antioxidante e são os pigmentos mais importantes para as plantas vasculares, associados a atração, cor e sabor dos frutos (Flores-Felix *et al.*, 2018).

Destacam-se entre os indicadores que influenciam diretamente a preferência do consumidor em relação aos frutos o seu valor nutricional e cor (Wang *et al.*, 2023). Nos membros do gênero *Fragaria*, a cor dos frutos é determinada pela biossíntese e acúmulo de antocianinas, compostos bioativos considerados essenciais nos morangos, sendo responsáveis por aproximadamente 70% da atividade antioxidante presente nos mesmos. A principal antocianina encontrada nos morangos é a pelargonidina 3-glicosídeo, conhecida por seu efeito anti-inflamatório (Newerli-Guz *et al.*, 2023). Portanto, o aumento no teor de antocianinas encontrado nos frutos das plantas inoculadas com as estirpes de *A. brasilense* sugere morangos mais nutritivos e visualmente atrativos ao consumidor, o que pode agregar valor aos frutos.

Ambas as estirpes bacterianas, em geral, melhoraram os parâmetros de qualidade dos frutos em ambas as safras. Com destaque, a estirpe HM053 combinada à aplicação das doses de 0 a 50% de nitrogênio, produziu resultados superiores ou estatisticamente equivalentes aos frutos das plantas sem inoculação e 100% de nitrogênio. Por exemplo, o teor de sólidos solúveis, que influenciam na doçura do fruto, apresentou valores médios de 10° Brix nos frutos das plantas inoculadas, não diferindo do tratamento controle. Esses resultados estão dentro do esperado para cultivar Florida Festival e ultrapassam o limite mínimo de 7° Brix, determinado para aceitação do fruto.

Quanto à acidez titulável, os frutos das plantas inoculadas com ambas as estirpes na safra de 2021 demonstraram similaridade significativa com o controle. Na safra de 2022, independentemente do método de inoculação, os frutos das plantas inoculadas com *A. brasilense* HM053, exceto quando associado à aplicação da dose completa de nitrogênio, apresentaram resultados semelhantes ao controle. O valor máximo registrado para a acidez titulável (0,59% de ácido cítrico) encontra-se dentro dos parâmetros esperados para o morango, sendo valores acima de 0,8% de ácido cítrico considerados indesejáveis.

O sabor do morango, assim como de muitos outros frutos, é determinado pela relação sólidos solúveis e acidez titulável, ou seja, quanto maior essa relação mais, doce são os frutos.

A relação sólidos solúveis/acidez titulável considerada adequada para frutos frescos de morango é de, no mínimo, 8,75 (Martins de Lima *et al.*, 2020). Os frutos da safra de 2022 foram relativamente mais doces que os da safra de 2021, destacando-se os frutos inoculados no solo com *A. brasilense* Ab-V5, que demonstraram uma média de 23,38 na relação SS/AT. Considerando que as características organolépticas do morango dependem de um equilíbrio entre doçura e acidez, valores muito elevados entre essa relação podem indicar frutos excessivamente doces. Assim, pode-se inferir que os frutos da safra de 2021, bem como aqueles provenientes das plantas inoculadas com *A. brasilense* HM053, exceto na dose completa de nitrogênio, e inoculadas por aspersão foliar de *A. brasilense* Ab-V5 e associados as doses de 0 ou 25% de nitrogênio, na safra de 2022, produziram frutos com sabor mais equilibrado.

Semelhante ao obtido em nosso estudo, Nam e colaboradores (2022), demonstraram morangos mais vermelhos e maiores teores de sólidos solúveis e acidez titulável em morangueiros inoculados com *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Pseudomonas monteilii*. Já Morais e colaboradores (2019), observaram aumento no conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides nas folhas e frutos maiores e com elevada concentração de sólidos solúveis em morangos inoculados com *Pedobacter* sp. CC1. Enquanto Chandramohan Reddy e Goyal (2021), descrevem valores máximos de sólidos solúveis, acidez total, ácido ascórbico e teor de antocianinas em plantas inoculadas com *Azospirillum* ou *Azotobacter* associadas a 100% de N se comparadas ao controle com dose ideal de nitrogênio e sem inoculação.

O efeito positivo dos microrganismos inoculados e, em sua maioria, associados as menores doses de nitrogênio, pode ser explicado pelas características de promoção de crescimento intrínsecas ao gênero *Azospirillum*, como a fixação biológica de nitrogênio e rápida liberação do mesmo para as plantas, visto que esse nutriente é considerado limitante no desenvolvimento e produção dos morangueiros (Fukami *et al.*, 2018; Seema *et al.*, 2018; Pathânia *et al.*, 2020; Fasusi *et al.*, 2023) e a produção de fitormônios, que, ao melhorarem o desenvolvimento de órgãos vegetais como as raízes, permitem absorção equilibrada de nutrientes e água e conseqüente síntese de carboidratos e proteínas que podem ser consumidos pelos frutos durante o amadurecimento, gerando frutos ricos em nutrientes e visualmente atrativos para o consumidor (Kumar *et al.*, 2020; Martins de Lima *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2022).

Em oposição aos efeitos positivos observado para inoculação de *A. brasilense* HM053 nas menores doses de nitrogênio, a associação dessa estirpe à dose completa de nitrogênio teve um efeito negativo sobre a maioria dos parâmetros observados. Supomos que a capacidade de *A. brasilense* HM053 em excretar amônia e fixar nitrogênio constitutivamente, somada a

elevadas doses de nitrogênio, poderia levar a um excesso de nitrogênio para planta, dificultando a absorção de outros nutrientes como magnésio e boro. Barbosa e colaboradores (2022) sugerem que raramente doses maiores que 50% de nitrogênio associadas a biofertilizantes, trazem efeitos benéficos as culturas.

### 3.2.5 CONCLUSÃO

A utilização de *A. brasilense* HM053 e Ab-V5 apresentou efeitos positivos no desenvolvimento da parte aérea e raízes, produção e qualidade dos frutos de morangueiros da cultivar Florida Festival. A associação da estirpe HM053 com as menores doses de nitrogênio (0 a 50%) destacou-se por apresentar resultados estatisticamente equivalentes ou superiores a aplicação de 100% de nitrogênio.

A inoculação de *A. brasilense* HM053 demonstrou ser uma estratégia viável para reduzir significativamente o uso de fertilizantes nitrogenados na cultura do morango Florida Festival, sem perdas na produção e qualidade dos frutos. Nesse estudo, observou-se que a substituição de 75% do adubo nitrogenado em forma de ureia pela inoculação de *A. brasilense* HM053, resultaria em uma diminuição de aproximadamente R\$ 198 por hectare nos custos de produção, enquanto a produtividade aumentaria em cerca de 2,92 t.há, gerando um lucro adicional de R\$43.800. Além disso a substituição de 75% dos adubos nitrogenados no cultivo do morango levaria a uma redução de 945 kg de CO<sub>2</sub>-e por hectare cultivado.

Os resultados promissores obtidos para os parâmetros de desenvolvimento vegetativo, produção e qualidade dos frutos em plantas inoculadas com a estirpe HM053 destacam o potencial desse microrganismo como biofertilizante para morangueiros. Sua utilização pode contribuir significativamente para redução do uso de adubos nitrogenados, resultando em custos de produção mais baixos, aumento da produtividade e, conseqüentemente, promovendo uma agricultura mais sustentável. Contudo, são necessários estudos adicionais em diferentes tipos de solo e condições de cultivo para validar e aprimorar os resultados obtidos neste estudo.

## REFERÊNCIAS

- AGEHARA, S.; NUNES, M. C. D. N. Season and nitrogen fertilization effects on yield and physicochemical attributes of strawberry under subtropical climate conditions. **Agronomy**, v. 11, n. 7, p. 1391, 2021.
- ALFIAN, M.; PURWANTO, W. W. Multi-objective optimization of green urea production. **Energy Science & Engineering**, v. 7, n. 2, p. 292-304, 2019.
- ANTUNES, L. E. C.; REISSER JUNIOR, C.; SCHWENGBER, J. E. Morangueiro. **Embrapa Clima Temperado-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2016.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods, **Association of official analytical chemists (AOAC)**, 2000.
- Arlington, VA, USA.
- AZIZOGLU, U.; YILMAZ, N.; SIMSEK, O.; IBAL, J. C.; TAGELE, S. B.; SHIN, J. H. The fate of plant growth-promoting rhizobacteria in soilless agriculture: Future perspectives. **3 Biotech**, v. 11, n. 8, p. 1-13, 2021.
- BACA, B. E.; SOTO, U. L.; PARDO, R. M. P. Fijación biológica de nitrógeno. 2000.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. V. M.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, V. L. D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindustria**, Caxias do Sul: EDUCS, p.195-232, 2002.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p.549-579, 2005.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and soil**, v. 384, n. 1-2, p.413-431, 2014.
- BALDOTTO, L. E. B.; OLIVARES, F. L.; BRESSAN-SMITH, R. Structural interaction between GFP-labeled diazotrophic endophytic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 and pineapple plantlets' Vitória'. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 114-125, 2011.
- BARBOSA, J. Z.; DE ALMEIDA ROBERTO, L.; HUNGRIA, M.; CORRÊA, R. S.; MAGRI, E.; CORREIA, T. D. Meta-analysis of maize responses to *Azospirillum brasilense* inoculation in Brazil: Benefits and lessons to improve inoculation efficiency. **Applied Soil Ecology**, v. 170, p. 104276, 2022.
- BARUA, N.; CLOUSE, K. M.; RUIZ DIAZ, D. A.; WAGNER, M. R.; PLATT, T. G.; HANSEN, R. R. Screening the maize rhizobiome for consortia that improve *Azospirillum brasilense* root colonization and plant growth outcomes. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 7, p. 1106528, 2023.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. In: **Advances in agronomy**. Academic Press, p. 77-136, 2010.

BASU, A.; PRASAD, P.; DAS, S. N.; KALAM, S.; SAYYED, R. Z.; CHANDRAMOHAN REDDY, M. S.; EL ENSHASY, H. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. **Sustainability**, v. 13, n. 3, p. 1140, 2021.

BHARDWAJ, D.; ANSARI, M. W.; SAHOO, R. K.; TUTEJA, N. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. **Microbial cell factories**, v. 13, p. 1-10, 2014.

BHAT, M. A.; MISHRA, A. K.; JAN, S.; BHAT, M. A.; KAMAL, M. A.; RAHMAN, S.; SHAH, A. A.; JAN, A. T. Plant growth promoting rhizobacteria in plant health: A perspective study of the underground interaction. **Plants**, v. 12, n. 3, p. 629, 2023.

BICER, Y.; KHALID, F. Life cycle environmental impact comparison of solid oxide fuel cells fueled by natural gas, hydrogen, ammonia and methanol for combined heat and power generation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 5, p. 3670-3685, 2020.

BORAH, P.; GOGOI, N.; ASAD, S. A.; RABHA, A. J.; FAROOQ, M. An insight into plant growth-promoting rhizobacteria-mediated mitigation of stresses in plant. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 5, p. 3229-3256, 2023.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 2, p. 440-459, 2014.

CASSÁN, F.; CONIGLIO, A.; LÓPEZ, G.; MOLINA, R.; NIEVAS, S.; DE CARLAN, C. L. N.; DONADIO, F.; TORRES, D.; ROSAS, S.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E.; ZORITA, M. D.; DE-BASHAN, L.; MORA, V. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, n. 4, p. 461-479, 2020.

CASTANHEIRA, N. L.; DOURADO, A. C.; PAIS, I.; SEMEDO, J.; SCOTTI-CAMPOS, P.; BORGES, N.; CARVALHO, G.; CRESPO, M. T. B.; FARELEIRA, P. Colonization and beneficial effects on annual ryegrass by mixed inoculation with plant growth promoting bacteria. **Microbiological Research**, v. 198, p. 47-55, 2017.

CHANDLER, C. K.; LEGARD, D. E.; DUNIGAN, D.; CROCKER, T. E.; SIMS, C. A. 'Strawberry festival' strawberry. **Papers in Plant Pathology**, v. 35, n. 7, 2000.

CHANDRAMOHAN REDDY, G.; GOYAL, R. K. Growth, yield and quality of strawberry as affected by fertilizer N rate and biofertilizers inoculation under greenhouse conditions. **Journal of Plant Nutrition**, v. 44, n. 1, p. 46-58, 2020.

CHÁVEZ-HERRERA, E.; HERNÁNDEZ-ESQUIVEL, A. A.; CASTRO-MERCADO, E.; GARCÍA-PINEDA, E. Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides on wheat plant development. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 37, n. 3, p. 859-866, 2018.

CHEBOTAR, V. K.; CHIZHEVSKAYA, E. P.; VOROBYOV, N. I.; BOBKOVA, V. V.; POMYAKSHEVA, L. V.; KHOMYAKOV, Y. V.; KONOVALOV, S. N. The quality and productivity of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) improved by the inoculation of PGPR *Bacillus velezensis* BS89 in field experiments. **Agronomy**, v. 12, n. 11, p. 2600, 2022.

CHEN, Y.; LYU, Y.; YANG, X.; ZHANG, X.; PAN, H.; WU, J.; LEI, Y.; ZHANG, Y.; WANG, G.; XU, M.; LUO, H. Performance comparison of urea production using one set of integrated indicators considering energy use, economic cost and emissions' impacts: A case from China. **Energy**, v. 254, p. 124489, 2022.

CHIEB, M.; GACHOMO, E. W. The role of plant growth promoting rhizobacteria in plant drought stress responses. **BMC Plant Biology**, v. 23, n. 1, p. 407, 2023.

CHIOMENTO, J. L. T.; JÚNIOR, E. P. L.; D'AGOSTINI, M.; DE NARDI, F. S.; DOS SANTOS TRENTIN, T.; DORNELLES, A. G.; HUZAR-NOVAKOWISKI, J.; CALVETE, E. O. Horticultural potential of nine strawberry cultivars by greenhouse production in Brazil: A view through multivariate analysis. **Scientia Horticulturae**, v. 279, p. 109738, 2021.

CRUZ-HERNÁNDEZ, M. A.; MENDOZA-HERRERA, A.; BOCANEGRA-GARCÍA, V.; RIVERA, G. *Azospirillum* spp. from plant growth-promoting bacteria to their use in bioremediation. **Microorganisms**, v. 10, n. 5, p. 1057, 2022.

DA SILVA, J. F.; DA SILVA, T. R.; ESCOBAR, I. E. C.; FRAIZ, A. C. R.; DOS SANTOS, J. W. M.; DO NASCIMENTO, T. R.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Screening of plant growth promotion ability among bacteria isolated from field-grown sorghum under different managements in Brazilian drylands. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 1-10, 2018.

DANIEL, A. I.; FADAKA, A. O.; GOKUL, A.; BAKARE, O. O.; AINA, O.; FISHER, S.; BURT, A. F.; MAVUMENGWANA, V.; KEYSTER, M.; KLEIN, A. Biofertilizer: the future of food security and food safety. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, p. 1220, 2022.

DE ANDRADE, F. M.; DE ASSIS PEREIRA, T.; SOUZA, T. P.; GUIMARÃES, P. H. S.; MARTINS, A. D.; SCHWAN, R. F.; DORIA, J. Beneficial effects of inoculation of growth-promoting bacteria in strawberry. **Microbiological Research**, v. 223, p. 120-128, 2019.

DE ANDRADE, L. A.; SANTOS, C. H. B.; FREZARIN, E. T.; SALES, L. R.; RIGOBELLO, E. C. Plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 1088, 2023.

DE MOURA, G. G. D.; DE BARROS, A. V.; MACHADO, F.; DA SILVA DAMBROZ, C. M.; GLIENKE, C.; PETTERS-VANDRESEN, D. A. L.; E. Alves, R. F. Schwan, M. Pasqual; DÓRIA, J. The Friend Within: Endophytic Bacteria as a Tool for Sustainability in Strawberry Crops. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, p. 2341, 2022.

DELAPORTE-QUINTANA, P.; LOVAISA, N. C.; RAPISARDA, V. A.; PEDRAZA, R. O. The plant growth promoting bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Azospirillum brasilense* contribute to the iron nutrition of strawberry plants through siderophores production. **Plant Growth Regulation**, v. 91, n. 2, p. 185-199, 2020.

DÖBEREINER, J.; Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. *Microbiologia do solo*. **Sociedade Brasileira de Ciências do Solo**. p. 173-180, 1992.

DOS SANTOS FERREIRA, N.; CONIGLIO, A.; PUENTE, M.; SANT'ANNA, F. H.; MARONICHE, G.; GARCÍA, J.; MOLINA, R.; NIEVAS, S.; VOLPIANO, C. G.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P.; PEDRAZA, R. O.; REIS, V. M.; ZILLI, J. E.; CASSAN, F. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Az39 as the type strain of *Azospirillum argentinense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 72, n. 8, p. 005475, 2022.

ELIAS, J. M.; GUERRERO-MOLINA, M.F.; MARTÍNEZ-ZAMORA, M.G.; DÍAZ-RICCI, J. C.; PEDRAZA, R. O. Role of ethylene and related gene expression in the interaction between strawberry plants and the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Plant Biology**, v. 20, n. 3, p. 490-496, 2018.

- ESITKEN, A.; YILDIZ, H. E.; ERCISLI, S.; DONMEZ, M. F.; TURAN, M.; GUNES, A. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. **Scientia Horticulturae**, v. 124, n. 1, p. 62-66, 2010.
- FAHAD, S.; HUSSAIN, S.; BANO, A.; SAUD, S.; HASSAN, S.; SHAN, D.; KHAN, F. A.; KHAN, F.; CHEN, Y.; WU, C.; TABASSUM, M. A.; CHUN, M. X.; AFZAL, M.; JAN, A.; JAN, M. T.; HUANG, J. Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 4907-4921, 2014.
- FAHAD, S.; HUSSAIN, S.; MATLOOB, A.; KHAN, F. A.; KHALIQ, A.; SAUD, S.; HASSA, S.; SHAN, D.; KHAN, F.; ULLAH, N.; FAIQ, M.; KHAN, M. R.; TAREEN, A. K.; KHAN, A.; ULLAH, A.; ULLAH, N.; HUANG, J. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. **Plant growth regulation**, v. 75, p. 391-404, 2015.
- FASUSI, O. A.; BABALOLA, O. O.; ADEJUMO, T. O. Harnessing of plant growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystem sustainability. **CABI Agriculture and Bioscience**, v. 4, n. 1, p. 26, 2023.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; Nogueira, D. A. ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portugues). **R package version 1.2.2**, 2021.
- FLORES-FÉLIX, J. D.; VELÁZQUEZ, E.; GARCÍA-FRAILE, P.; GONZÁLEZ-ANDRÉS, F.; SILVA, L. R.; RIVAS, R. Phyllobacterium bacterial inoculants increase bioactive compounds and quality of strawberries cultivated in field conditions. **Food Research International**, v. 111, p. 416-422, 2018.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAOSTAT. Production Quantities of Strawberries by Country 2021. Disponivel online: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>.
- FU, H. A.; HARTMANN, A.; LOWERY, R. G.; FITZMAURICE, W. P.; ROBERTS, G. P.; BURRIS, R. H. Posttranslational regulatory system for nitrogenase activity in *Azospirillum* spp. **Journal of bacteriology**, v. 171, n. 9, p. 4679-4685, 1989.
- FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 3, 2016.
- FUKAMI, J.; OLLERO, F. J.; MEGIAS, M.; HUNGRIA, M. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.
- FUKAMI, J.; CERZINI, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 73, 2018.
- GHAVAM, S.; TAYLOR, C. M.; STYRING, P. The life cycle environmental impacts of a novel sustainable ammonia production process from food waste and brown water. **Journal of Cleaner Production**, v. 320, p. 128776, 2021.
- GHENOV, F.; GERHARDT, E. C. M.; HUERGO, L. F.; PEDROSA, F. O.; WASSEM, R.; SOUZA, E. M. Characterization of glutamine synthetase from the ammonium-excreting strain HM053 of *Azospirillum brasilense*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2021.
- GUERRERO-MOLINA, M. F.; WINIK, B. C.; PEDRAZA, R. O. More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense*. **Applied soil ecology**, v. 61, p. 205-212, 2012.

- GUERRERO-MOLINA, M. F.; L OVAISA, N. C.; SALAZAR, S. M.; DÍAZ-RICCI, J. C.; PEDRAZA, R. O. Elemental composition of strawberry plants inoculated with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* REC 3, assessed with scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray analysis. **Plant Biology**, v. 16, n. 4, p. 726-731, 2014.
- GUPTA, S.; KAUSHAL, R.; SOOD, G. Impact of plant growth-promoting Rhizobacteria on vegetable crop production. **International Journal of Vegetable Science**, v. 24, n. 3, p. 289-300, 2018.
- GUREEVA, M. V.; GUREEV, A. P. Molecular Mechanisms Determining the Role of Bacteria from the Genus *Azospirillum* in Plant Adaptation to Damaging Environmental Factors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, p. 9122, 2023.
- HA-TRAN, D. M.; NGUYEN, T. T. M.; HUNG, S. H.; HUANG, E.; HUANG, C. C. Roles of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in stimulating salinity stress defense in plants: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 3154, 2021.
- HARTMANN, A.; FU, H.; BURRIS, R. H. Regulação da atividade nitrogenase pelo cloreto de amônio em *Azospirillum* spp. **Journal of bacteriology**, v. 165, n. 3, pág. 864-870, 1986.
- HOSSEINI, A.; HOSSEINI, M.; SCHAUSBERGER, P. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Defense of Strawberry Plants Against Spider Mites. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2022.
- HOUSH, A. B.; POWELL, G.; SCOTT, S.; ANSTAETT, A.; GERHEART, A.; BENOIT, M.; WALLER, S.; POWELL, A.; GUTHRIE, J. M.; HIGGINS, B.; WILDER, S. L.; SCHUELLER, M. J.; FERRIERI, R. A. Functional mutants of *Azospirillum brasilense* elicit beneficial physiological and metabolic responses in *Zea mays* contributing to increased host iron assimilation. **The ISME journal**, v. 15, n. 5, p. 1505-1522, 2021.
- HOUSH, A. B.; NOEL, R.; POWELL, A.; WALLER, S.; WILDER, S. L.; SOPKO, S.; BENOIT, M.; POWELL, G.; SCHUELLER, M. J.; FERRIERI, R. A. Studies using mutant strains of *Azospirillum brasilense* reveal that atmospheric nitrogen fixation and auxin production are light dependent processes. **Microorganisms**, v. 11, n. 7, p. 1727, 2023.
- HUANG, W. Y.; ZHANG, H. C.; LIU, W. X.; LI, C. Y. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 13, p. 94-102, 2012.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p. 413-425, 2010.
- HUNGRIA, M.; BARBOSA, J. Z.; RONDINA, A. B. L.; NOGUEIRA, M. A. Improving maize sustainability with partial replacement of N fertilizers by inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Agronomy Journal**, v. 114, n. 5, p. 2969-2980, 2022.
- IPCC. IPCC Guidelines for national greenhouse gas inventories. IPCC, 2006. <<https://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/index.html>> acesso em 20 de novembro de 2023.
- JIAO, H.; WANG, R.; QIN, W.; YANG, J. Screening of rhizosphere nitrogen fixing, phosphorus and potassium solubilizing bacteria of *Malus sieversii* (Ldb.) Roem. and the effect on apple growth. **Journal of Plant Physiology**, v. 292, p. 154142, 2024.
- KHATOON, Z.; HUANG, S.; RAFIQUE, M.; FAKHAR, A.; KAMRAN, M. A.; SANTOYO, G. Unlocking the potential of plant growth-promoting rhizobacteria on soil health and the

sustainability of agricultural systems. **Journal of Environmental Management**, v. 273, p. 111118, 2020.

KIROVA-YORDANOVA, Z. Exergy-based estimation and comparison of urea and ammonium nitrate production efficiency and environmental impact. **Energy**, v. 140, p. 158-169, 2017.

KONG, Z.; LIU, H. Modification of rhizosphere microbial communities: A possible mechanism of plant growth promoting rhizobacteria enhancing plant growth and fitness. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 920813, 2022.

KUMAR, P.; SHARMA, N.; SHARMA, S.; GUPTA, R. Rhizosphere stoichiometry, fruit yield, quality attributes and growth response to PGPR transplant amendments in strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) growing on solarized soils. **Scientia Horticulturae**, v. 265, p. 109215, 2020.

LOVAISA, N. C.; GUERRERO MOLINA, M. F.; DELAPORTE QUINTANA, P. A. G.; SALAZAR, S.M. Response of strawberry plants inoculated with *Azospirillum* and *Burkholderia* at field conditions. **Revista Agrônômica do Noroeste da Argentina**, 2015.

MA, Q.; WU, X.; LUO, Z.; GE, Z.; LI, D.; WU, D.; ZHANG, X.; CHEN, Y.; LI, L.; XU, Y. Lipidomic analysis revealed dynamic changes of lipidic compounds of postharvest strawberry in response to gray mold. **Postharvest Biology and Technology**, v. 199, p. 112296, 2023.

MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. D. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian journal of microbiology**, v. 37, n. 7, p. 549-553, 1991.

MORAIS, M. C.; MUCHA, Â.; FERREIRA, H., GONÇALVES, B.; BACELAR, E.; MARQUES, G. Comparative study of plant growth-promoting bacteria on the physiology, growth and fruit quality of strawberry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2019.

MARTINEZ-DE LA CRUZ, S.; GONZALEZ-FUENTES, J. A.; ROBLEDO-OLIVO, A.; MENDOZA-VILLARREAL, R.; HERNANDEZ-PEREZ, A.; DAVILA-MEDINA, M. D.; ALVARADO-CAMARILLO, D. Humic substances and rhizobacteria enhance the yield, physiology and quality of strawberries. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 50, n. 1, p. 12578-12578, 2022.

MARTINS DE LIMA, J.; WELTER, P. D.; SOARES DOS SANTOS, M. F.; KAVCIC, W.; MIRANDA COSTA, B.; FAGHERAZZI, A. F.; NERBAS, F. R.; KRETZSCHMAR, A. A.; RUFATO; BARUZZI, G. Planting density interferes with strawberry production efficiency in southern Brazil. **Agronomy**, v. 11, n. 3, p. 408, 2021.

MOREIRA, F. M. S; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do solo. In: MOREIRA, F. M. S; SIQUEIRA, J. O. 2 Ed. **Transformações bioquímicas e ciclo dos elementos no solo**. Lavras, MG: UFLA, p. 313-404, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAM, J. H.; THIBODEAU, A.; QIAN, Y. L.; QIAN, M. C.; PARK, S. H. Multidisciplinary evaluation of plant growth promoting rhizobacteria on soil microbiome and strawberry quality. **AMB Express**, v. 13, n. 1, p. 18, 2023.

NEMZER, B. V.; KALITA, D.; YASHIN, A. Y.; YASHIN, Y. I. Bioactive Compounds, Antioxidant Activities, and Health Beneficial Effects of Selected Commercial Berry Fruits: A Review. **Journal of Food Research**, v. 9, n. 5, p. 1-78, 2021.

- NEWERLI-GUZ, J., ŚMIECHOWSKA, M., DRZEWIECKA, A.; TYLINGO, R. Bioactive ingredients with health-promoting properties of strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duchesne). **Molecules**, v. 28, n. 6, p. 2711, 2023.
- NITSCHKE, P. R.; CARAMORI, P. H.; RICCE, W. D. S.; PINTO, L. F. D. Atlas climático do estado do Paraná. **Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná**, 2019.
- NOSHEEN, S.; AJMAL, I.; SONG, Y. Microbes as biofertilizers, a potential approach for sustainable crop production. **Sustainability**, v. 13, n. 4, p. 1868, 2021.
- NUNES, M. C. N.; BRECHT, J. K.; MORAIS, A. M.; SARGENT, S. A. Possible influences of water loss and polyphenol oxidase activity on anthocyanin content and discoloration in fresh ripe strawberry (cv. Oso Grande) during storage at 1° C. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 1, p. S79-S84, 2005.
- NWACHUKWU, B. C.; BABALOLA, O. O.; HASSEN, A. I. Rhizosphere competence and applications of plant growth-promoting rhizobacteria in food production-a review. **Scientific African**, p. e02081, 2024.
- OLEŃSKA, E.; MAŁEK, W.; WÓJCIK, M.; SWIECICKA, I.; THIJS, S.; VANGRONSVELD, J. Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. **Science of the Total Environment**, v. 743, p. 140682, 2020.
- PATHANIA, P.; RAJTA, A.; SINGH, P. C.; BHATIA, R. Role of plant growth-promoting bacteria in sustainable agriculture. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 30, p. 101842, 2020.
- PANKIEVICZ, V. C.; DO AMARAL, F. P.; SANTOS, K. F.; AGTUCA, B.; XU, Y.; SCHUELLER, M. J.; ARISI, A. C. M.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; STACEY, G.; FERRIERI, R. A.; Robust biological nitrogen fixation in a model grass–bacterial association. **The Plant Journal**, v. 81, n. 6, p. 907-919, 2015.
- PEDRAZA, R. O.; MOTOK, J.; TORTORA, M. L.; SALAZAR, S. M.; DÍAZ-RICCI, J. C. Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. **Plant and soil**, v. 295, p. 169-178, 2007.
- PEDROSA, F. O.; OLIVEIRA, A. L. M.; GUIMARÃES, V. F.; ETO, R. M.; SOUZA, E. M.; FURMAM, F. G.; GONÇALVES, D. R. P.; SANTOS, O. J. A. P.; GONÇALVES, L. S. A.; A. G. BATTISTUS, A. G.; GALVÃO, C. W. The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053: a new alternative inoculant for maize. **Plant and Soil**, v. 451, n. 1, p. 45-56, 2020.
- PII, Y.; GRAF, H.; VALENTINUZZI, F.; CESCO, S.; MIMMO, T. The effects of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on the growth and quality of strawberries. In: **VIII International Symposium on Mineral Nutrition of Fruit Crops 1217**, p. 231-238, 2017.
- PIRES, J.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, v. 12, p. 1-6, 2017.
- PRASHAR, P.; KAPOOR, N.; SACHDEVA, S. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 13, n. 1, p. 63-77, 2014.

R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2021. URL <https://www.R-project.org/>.

RAMAKRISHNA, W.; YADAV, R.; LI, K. Plant growth promoting bacteria in agriculture: two sides of a coin. **Applied Soil Ecology**, v. 138, p. 10-18, 2019.

RAMOS, H. J. O.; RONCATO-MACCARI, L. D.B.; SOUZA, E. M.; SOARES-RAMOS, J. R. L.; HUNGRIA, M.; PEDROSA, F. O. Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using the *gfp* and *gusA* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. **Journal of Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 243-252, 2002.

RICHARDSON, M. L.; ARLOTTA, C. G.; LEWERS, K. S. Yield and nutrients of six cultivars of strawberries grown in five urban cropping systems. **Scientia Horticulturae**, v. 294, p. 110775, 2022.

RODRIGUEZ CACERES, E. A.; DI CIOCCO, C. A.; CARLETTI, S. M. Años de investigación de *Azospirillum brasilense* Az39 en Argentina. ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 2008.

ROHILLA, P.; YADAV, J. P. Promoter of Nitrate Reductase Gene Behaves Differently Under Salinity Stress in Contrasting Rice Genotype. **Journal of Plant Growth Regulation**, p. 1-11, 2023.

RUEDA, D.; VALENCIA, G.; SORIA, N.; RUEDA, B. B.; MANJUNATHA, B.; KUNDAPUR, R. R.; SELVANAYAGAM, M. Effect of *Azospirillum* spp. and *Azotobacter* spp. on the growth and yield of strawberry (*Fragaria vesca*) in hydroponic system under different nitrogen levels. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 01, p. 48-54, 2016.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning a Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, K. F. D. N.; MOURE, V. R.; HAUER, V.; SANTOS, A. S.; DONATTI, L.; GALVÃO, C. W.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; WASSEM, R.; STEFFENS, M. B. R. Wheat colonization by an *Azospirillum brasilense* ammonium-excreting strain reveals upregulation of nitrogenase and superior plant growth promotion. **Plant and Soil**, v. 415, n. 1, p. 245-255, 2017a.

SANTOS, A. R. S.; ETTO, R. M.; FURMAM, R. W.; DE FREITAS, D. L.; SANTOS, K. F. D. E. N.; DE SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; AYUB, R. A.; STEFFENS, M. B. R.; GALVÃO, C. W. Labeled *Azospirillum brasilense* wild type and excretion-ammonium strains in association with barley roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 422-426, 2017a.

SCOTT, S.; HOUSH, A.; POWELL, G.; ANSTAETT, A.; GERHEART, A.; BENOIT, M.; WILDER, S.; SCHUELLER, M.; FERRIERI, R. Crop yield, ferritin and Fe (II) boosted by *Azospirillum brasilense* (HM053) in corn. *Agronomy*, v. 10, n. 3, p. 394, 2020.

SCUDELETTI, D.; CRUSCIOL, C. A. C.; MOMESSO, L.; BOSSOLANI, J. W.; MORETTI, L. G.; DE OLIVEIRA, E. F.; TUBAÑA, B. S.; SILVA, M. A.; CASTRO, S.G.Q.; HUNGRIA, M. Inoculation with *Azospirillum brasilense* as a strategy to enhance sugarcane biomass production and bioenergy potential. **European Journal of Agronomy**, v. 144, p. 126749, 2023.

- SILVA, L. I. D.; OLIVEIRA, I. P. D.; JESUS, E. D. C.; PEREIRA, M. C.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, R. C. D.; DÓRIA, J. Fertilizer of the future: Beneficial bacteria promote strawberry growth and yield and may reduce the need for chemical fertilizer. **Agronomy**, v. 12, n. 10, p. 2465, 2022.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.
- SEEMA, K.; MEHTA, K.; SINGH, N. Studies on the effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on growth, physiological parameters, yield and fruit quality of strawberry cv. chandler. Chandler. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 2, p. 383-387, 2018.
- SHI, L.; LIU, L.; YANG, B.; SHENG, G.; XU, T. Evaluation of industrial urea energy consumption (EC) based on life cycle assessment (LCA). **Sustainability**, v. 12, n. 9, p. 3793, 2020.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO (SBCS). Núcleo Estadual do Paraná (NEPAR). **Manual de adubação e calagem para o Estado do Paraná**. Curitiba: SBCS/NEPAR, ed. 1, p. 369 – 380, 2017.
- SOLTANIBAND, V.; BRÉGARD, A.; GAUDREAU, L.; DORAIS, M. Biostimulants promote plant development, crop productivity, and fruit quality of protected strawberries. **Agronomy**, v. 12, n. 7, p. 1684, 2022.
- SONG, C.; MA, J., TANG, X.; ZHANG, Z.; ZHOU, P.; HOU, Z. Cloning of strawberry FaEtr2 gene and its plant expression vector construction for antisense RNA. **Frontiers of Agriculture in China**, v. 3, n. 1, p. 55-59, 2009.
- TANABE, Y.; NISHIBAYASHI, Y. Developing more sustainable processes for ammonia synthesis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 17-18, p. 2551-2564, 2013.
- TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian journal of microbiology**, v. 24, n. 8, p. 967-980, 1978.
- TORRES, P. B.; PIRES, J. S.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Ensaio do potencial antioxidante de extratos de algas através do sequestro do ABTS•+ em microplaca. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, p. 1-4, 2017.
- TORTORA, M. L.; DÍAZ-RICCI, J. C.; PEDRAZA, R. O. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of microbiology**, v. 193, n. 4, p. 275-286, 2011.
- TORRES VERA, R.; GARCÍA, A. J. B.; ÁLVAREZ, F. J. C.; RUIZ, J. M.; MARTÍN, F. F. Application and effectiveness of *Methylobacterium symbioticum* as a biological inoculant in maize and strawberry crops. **Folia microbiologica**, 2023.
- VALLE-ROMERO, P.; GARCÍA-LÓPEZ, J. V.; REDONDO-GÓMEZ, S.; FLORES-DUARTE, N. J.; RODRÍGUEZ-LLORENTE, I. D.; IDASZKIN, Y. L.; PAJUELO, E.; MATEOS-NARANJO, E. Biofertilization with PGP Bacteria Improve Strawberry Plant Performance under Sub-Optimum Phosphorus Fertilization. **Agronomy**, v. 13, n. 2, p. 335, 2023.

VEJAN, P.; ABDULLAH, R.; KHADIRAN, T.; ISMAIL, S.; NASRULHAQ BOYCE, A. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 573, 2016.

VIEJOBUEÑO, J.; ALBORNOZ, P. L.; CAMACHO, M.; DE LOS SANTOS, B.; MARTÍNEZ-ZAMORA, M. G.; SALAZAR, S. M. Protection of strawberry plants against Charcoal rot disease (*Macrophomina phaseolina*) induced by *Azospirillum brasilense*. **Agronomy**, v. 11, n. 2, p. 195, 2021.

WANG, J.; LI, R.; ZHANG, H.; WEI, G.; LI, Z. Beneficial bacteria activate nutrients and promote wheat growth under conditions of reduced fertilizer application. **BMC microbiology**, v. 20, p. 1-12, 2020.

WANG, L.; YANG, S.; NI, J.; TENG, Y.; BAI, S. Advances of anthocyanin synthesis regulated by plant growth regulators in fruit trees. **Scientia Horticulturae**, v. 307, p. 111476, 2023.

WIJERATHNA-YAPA, A.; PATHIRANA, R. Sustainable Agro-Food Systems for Addressing Climate Change and Food Security. **Agriculture**, v. 12, n. 10, p. 1554, 2022.

ZHANG, F.; SHEN, J.; ZHANG, J.; ZUO, Y.; LI, L.; CHEN, X. Rhizosphere processes and management for improving nutrient use efficiency and crop productivity: implications for China. In: **Advances in agronomy**. Academic Press, p. 1-32, 2010.

ZHU, Y.; WANG, Y.; HE, X.; LI, B.; DU, S. Plant growth-promoting rhizobacteria: A good companion for heavy metal phytoremediation. **Chemosphere**, p. 139475, 2023.