

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

DISSERTAÇÃO

***Inoculação da Estirpe Sp 245 de *Azospirillum
Brasilense* em Diferentes Genótipos de *Brachiaria****

Liliandra Barreto Emídio Gomes

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**INOCULAÇÃO DA ESTIRPE SP 245 DE *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*
EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE *BRACHIARIA***

LILIANDRA BARRETO EMÍDIO GOMES

Sob a Orientação da Professora
Veronica Massena Reis

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ
Março, 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G633i Gomes, Liliandra Barreto Emídio, 1992-
INOCULAÇÃO DA ESTIRPE SP 245 DE AZOSPIRILLUM
BRASILENSE EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE BRACHIARIA /
Liliandra Barreto Emídio Gomes. - 2017.
50 f.: il.

Orientadora: Veronica Massena Reis.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Pós graduação em Agronomia - Ciência
do Solo, 2017.

1. Brachiaria. 2. Azospirillum brasilense. 3. FBN.
4. Pastagens. 5. Recuperação de áreas degradadas. I.
Reis, Veronica Massena, 1961-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós
graduação em Agronomia - Ciência do Solo III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA CIÊNCIA DO SOLO

LILIANRA BARRETO EMÍDIO GOMES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra** no Curso de Pós-Graduação em Agronomia Ciência do solo, área de Concentração em Ciência do Solo.

APROVADA EM 30/03/2017.

Veronica Massena Reis. Dra. Embrapa Agrobiologia
(Orientadora)

Nivaldo Schultz. Dr. UFRRJ

Robert de Oliveira Macedo. Dr. UFRRJ

Márcia Reed. Dra. Embrapa Agrobiologia

Dedico

Ao meu esposo e amigo Diogo do Carmo Gomes
Aos meus pais Reinaldo Emídio e Ruth Alves Barreto Emídio,
A toda minha família e amigos
Pela paciência, apoio, força
E amor incondicional!

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser meu melhor amigo, me conceder o Dom da vida e as condições físicas e mentais para desenvolver este trabalho, sendo minha força nos momentos mais difíceis.

Ao curso de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo e a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade de aprendizagem e crescimento.

A Embrapa Agrobiologia pela possibilidade e suporte para a realização deste trabalho

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudos que me permitiu a dedicação exclusiva a pesquisa.

A minha orientadora Dra. Veronica Massena Reis pela confiança, os valiosos ensinamentos e conhecimento a mim repassados de maneira tão generosa.

A minha grande e amada família, meus pais, irmã, cunhados, sobrinhos e amigos pela paciência, compreensão nos momentos de ausência, apoio carinho e apoio e forças para superar as dificuldades e nunca desistir.

Ao meu grande amor, amigo e esposo Diogo do Carmo Gomes, pelo carinho, abraços, compreensão, muita paciência e amor a mim dispensados durante esta caminhada, sempre estando comigo nos momentos bons e ruins.

Aos amigos e funcionários da Embrapa Agrobiologia pela dedicação ao trabalho, eficiência e a ótima companhia diária: Wilson Cabral, Antônio Lucio, Roberto Carlos, Amarildo, Claudinho, Ernani, Alderi Josias e Juliane Fontana.

Aos pesquisadores da Embrapa Agrobiologia, Segundo Sacramento Urquiaga, Jose Ivo Baldani e Stefan Schwab.

A minha grande amiga Priscila Bahia, pelos momentos de alegria, companheirismo e amizade sincera e valiosa durante todos esses anos.

Aos amigos que contribuíram intensamente para a execução deste trabalho, especialmente Gabriela Alves, Thamires Ferreira Juliane Fontana, Cecília e Juliana Ferreira pela ajuda e incentivo.

Enfim, agradeço a todos os amigos e irmãos da Congregação Cristã no Brasil e familiares que de alguma forma contribuíram para o sucesso da minha caminhada. Jamais os esquecerei, para cada um todo o meu amor!

Sou grata!

BIOGRAFIA

Liliandra Barreto Emídio Gomes, filha de Reinaldo Emídio e Ruth Alves Barreto Emídio, nasceu em 14 de maio de 1992 na cidade de Barra do Piraí, RJ. Em 2007, cursou o ensino médio concomitante com o curso Técnico em Telemática na Escola Técnica Pandiá Calógeras em Volta Redonda, RJ. Graduiu-se em Engenharia Florestal pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no ano de 2014. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica na Embrapa Agrobiologia de Julho de 2011 a dezembro de 2014 sob orientação da Dr^a. Vera Lúcia Divan Baldani na área de Fixação Biológica de Nitrogênio no Laboratório de Gramíneas. Em 2015 ingressou no Mestrado no Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob orientação da Dr^a. Veronica Massena Reis.

RESUMO

GOMES, Liliandra Barreto Emídio. **Inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* em diferentes genótipos de *Brachiaria***. 2017. 50f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

A utilização da bactéria diazotrófica promotora de crescimento vegetal *Azospirillum brasilense* destaca-se como uma alternativa sustentável na redução da aplicação de N em pastagens, apresentando potencial para a redução dos níveis de degradação. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* em diferentes genótipos de *Brachiaria*. Para tal foram conduzidos experimentos em casa de vegetação e em laboratórios na Embrapa Agrobiologia (Seropédica-RJ). Foram estudados quatorze cultivares do gênero *Brachiaria*, sendo: *B. brizantha* (Marandú, Xaraés, Paiaguás, Piatã e B140); *B. decumbens* cv. Basilisk; *B. humidicola* (Comum, Tupi, H47 e Llanero); *B. ruziziensis* e híbridos (H331, Mulato e Mulato II) com ou sem a aplicação do inoculante turfoso contendo a estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* em diferentes épocas de cortes. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com cinco repetições. Os resultados obtidos em casa de vegetação, quanto a produção de biomassa e acúmulo de N na parte aérea, permitiram a seleção das cultivares Marandú, Basilisk e do híbrido Mulato II para a condução de dois experimentos onde foram analisados o desenvolvimento do sistema radicular das plantas através do software WinRhizo e a identificação da bactéria dentro da planta com a utilização da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* marcada com uma proteína verde fluorescente (GFP). Com os resultados obtidos, verificou-se que a estirpe Sp 245 promoveu um incremento de biomassa nas diferentes cultivares de *Brachiaria* com destaque para as cultivares Mulato II, Ruziziensis e Basilisk. O desenvolvimento radicular das cultivares Marandú, Basilisk e Mulato II foi favorecido pela inoculação, com melhor desenvolvimento para todas as variáveis analisadas. A contribuição da FBN variou para cada genótipo e em função da época de corte e a inoculação da estirpe Sp 245 foi capaz de contribuir com até 16% aos 60 dias de semeadura e 20% aos 180 dias, do N acumulado pela planta através da FBN. O uso da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* marcada com a proteína verde fluorescente (GFP) permitiu diferenciar as bactérias inoculadas experimentalmente daquelas pré-existentes na planta e confirmar a presença desta nos espaços intercelulares das raízes do híbrido Mulato II e da *B. decumbens* cv. Basilisk após dez dias de inoculação. Portanto, as análises mostraram que a inoculação das sementes de *Brachiaria* contribuiu para o melhor desenvolvimento vegetal, aumentando o sistema radicular e favorecendo o acúmulo de N através da FBN.

Palavras-chave: Pastagens. FBN. *Brachiaria*. *Azospirillum brasilense*.

ABSTRACT

GOMES, Liliandra Barreto Emídio. **Inoculation Sp 245 of *Azospirillum brasilense* in different genotypes of *Brachiaria***. 2017. 50p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

The use of diazotrophic plant growth promoter *Azospirillum brasilense* stands out as a sustainable alternative in reducing the application of N in pastures, presenting potential for the reduction of degradation levels. The objective of this study was to evaluate the effects of inoculation of strain Sp 245 of *Azospirillum brasilense* on different genotypes of *Brachiaria*. For that, experiments were carried out under greenhouse conditions and in laboratories at Embrapa Agrobiologia (Seropédica-RJ). Fourteen cultivars of the *Brachiaria* genus were studied: *B. brizantha* (Marandú, Xaraés, Paiaguás, Piatã and B140); *B. decumbens* cv. Basilisk; *B. humidicola* (Comum, Tupi, H47 and Llanero); *B. ruziziensis* and hybrids (H331, Mulato and Mulato II) with or without the application of the turfous inoculant containing the strain Sp 245 of *Azospirillum brasilense* at different times of cuts. The experimental design was a randomized complete block design with five replications. The results obtained in greenhouse, regarding the biomass production and accumulation of N in the aerial part, allowed the selection of the cultivars Marandú, Basilisk and the hybrid Mulato II for the conduction of two experiments where the development of the root system of the plants Through the software WinRhizo and the identification of the bacterium inside the plant using the strain Sp 245 of *Azospirillum brasilense* marked with a fluorescent green protein (GFP). With the results obtained, it was verified that the strain Sp 245 promoted an increase of biomass in the different cultivars of *Brachiaria*, highlighting the cultivars Mulato II, Ruziziensis and Basilisk. The root development of the cultivars Marandú, Basilisk and Mulato II was favored by the inoculation, with better development for all variables analyzed. The contribution of FBN varied for each genotype and as a function of the cutting season and the inoculation of the Sp 245 strain was able to contribute up to 16% at 60 days of sowing and 20% at 180 days of the N accumulated by the plant through the FBN. The use of the Sp 245 strain of *Azospirillum brasilense* marked with green fluorescent protein (GFP) allowed to differentiate the bacteria inoculated experimentally from those pre-existing in the plant and to confirm the presence of this in the intercellular spaces of the roots of the hybrid Mulato II and *B. decumbens* cv. Basilisk after ten days of inoculation. Therefore, the analyzes showed that the inoculation of the *Brachiaria* seeds contributed to the better plant development, increasing the root system and favoring the accumulation of N through the FBN.

Keywords: Pasture. FBN. *Brachiaria*. *Azospirillum brasilense*.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Visão geral do primeiro experimento para avaliação do efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* em quatorze genótipos de *Brachiaria*..... 14
- Figura 2.** Visão geral do segundo experimento para avaliação do efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* em sete genótipos de *Brachiaria*. 14
- Figura 3.** Visão geral do ensaio para caracterização morfológica do sistema radicular de *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II. 16
- Figura 4.** Visão geral do ensaio para visualização da estirpe Sp 45 de *Azospirillum brasilense* por meio de marcação molecular com a proteína verde fluorescente (GFP) em plantas de *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II..... 18
- Figura 5.** Produção de raízes da cultivar Mulatto II após 240 de semeadura. A parte A da figura representa o tratamento controle sem inoculação e a parte B representa o tratamento com a inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*..... 28
- Figura 6.** Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* no comprimento radicular da *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II após 15 dias de plantio. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes representam diferença estatística para os efeitos de inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* pelo teste de Tukey à 5%..... 34
- Figura 7.** Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* no número de bifurcações radiculares da *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II após 15 dias de plantio. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes representam diferença estatística para os efeitos de inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* pelo teste de Tukey à 5%..... 34
- Figura 8.** Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* na razão entre comprimento e volume radicular da *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II após 15 dias de plantio. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes representam diferença estatística para os efeitos de inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* pelo teste de Tukey à 5%. 35
- Figura 9.** Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* na área radicular projetada da *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II após 15 dias de plantio. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes representam diferença estatística para os efeitos de inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* pelo teste de Tukey à 5%..... 35
- Figura 10.** Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* na área de superfície ou superfície de contato radicular da *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II após 15 dias de plantio. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes representam diferença estatística para os efeitos de inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* pelo teste de Tukey à 5%. 36
- Figura 11.** Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* estirpe Sp 245 no número de pontas radiculares da *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II após 15 dias de plantio. 36

- Figura 12.** Efeito da inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* no diâmetro médio das raízes de *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II após 15 dias de plantio. 37
- Figura 13.** Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* volume radicular da *B. decumben* cv. Basilisk, *B.brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II após 15 dias de plantio. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes representam diferença estatística para os efeitos de inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* pelo teste de Tukey à 5%. 37
- Figura 14.** Imagens das raízes de *Brachiaria* após 15 dias de plantio obtidas através do software WinRhizo. A, B e C representam raízes de *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e do híbrido Mulato II sem inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*, respectivamente. D, E e F representam raízes de *B. decumbens* cv. Basilisk. *B. brizantha* cv. Marandú e do híbrido Mulato II com a inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*, respectivamente. 38
- Figura 15.** Imagens de microscopia visualizadas em microscópio de fluorescência com aumento de 400x utilizando um fotomicroscópio ZEN 2012 SPI (Black edition). Hibridização fluorescente in situ de raízes de braquiária após 10 dias de inoculação com a estirpe Sp 245 de *A. brasilense*. A amostra foi visualizada nos comprimentos de onda de 488 nm para as fluorescência verde-autofluorescência da clorofila. A figura mostra a raíz da cultivar Mulato II. 39

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos genótipos de <i>Brachiaria</i> utilizados e algumas características de cada espécie.....	12
Tabela 2. Análise química de terra retirada do horizonte A de um Planossolo, série Itaguaí, utilizado nos experimentos em casa de vegetação.....	13
Tabela 3. Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), Teor de N (%) e Acúmulo de N (mg.vaso ⁻¹) de cinco cultivares de <i>B. brizantha</i> spp. ao longo de quatro cortes sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de <i>Azospirillum brasilense</i>	20
Tabela 4. Produção de massa seca da raiz (MSR), acúmulo de massa seca da parte aérea e massa seca total (MST) de cinco cultivares de <i>B. brizantha</i> spp. após 240 dias de plantio sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de <i>Azospirillum brasilense</i>	21
Tabela 5. Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), Teor de N (%) e Acúmulo de N (mg.vaso ⁻¹) de <i>B. decumbens</i> cv. Basilisk ao longo de quatro cortes sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de <i>Azospirillum brasilense</i>	22
Tabela 6. Produção de massa seca da raiz (MSR), acúmulo de massa seca da parte aérea e massa seca total (MST) de <i>B. decumbens</i> cv. Basilisk após 240 dias de plantio sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de <i>Azospirillum brasilense</i>	23
Tabela 7. Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), Teor de N (%) e Acúmulo de N (mg.vaso ⁻¹) de <i>B. ruziziensis</i> ao longo de quatro cortes sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de <i>Azospirillum brasilense</i>	24
Tabela 8. Produção de massa seca da raiz (MSR), acúmulo de massa seca da parte aérea e massa seca total (MST) de <i>B. ruziziensis</i> após 240 dias de plantio sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de <i>Azospirillum brasilense</i>	25
Tabela 9. Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), Teor de N (%) e Acúmulo de N (mg.vaso ⁻¹) de quatro cultivares de <i>B. humidicola</i> spp. ao longo de quatro cortes sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de <i>Azospirillum brasilense</i>	26
Tabela 10. Produção de massa seca da raiz (MSR), acúmulo de massa seca da parte aérea e massa seca total (MST) de quatro cultivares de <i>B. humidicola</i> spp. após 240 dias de plantio sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de <i>Azospirillum brasilense</i>	26
Tabela 11. Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), Teor de N (%) e Acúmulo de N (mg.vaso ⁻¹) de três Híbridos de <i>Brachiaria</i> spp. ao longo de quatro cortes sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de <i>Azospirillum brasilense</i>	27
Tabela 12. Produção de massa seca da raiz (MSR), acúmulo de massa seca da parte aérea e massa seca total (MST) de três Híbridos de <i>Brachiaria</i> spp. após 240 dias de plantio sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de <i>Azospirillum brasilense</i>	28
Tabela 13. Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), teor de N (%) e acúmulo de N (mg.vaso ⁻¹) de sete genótipos de <i>Brachiaria</i> spp. após 30 dias de plantio sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de <i>Azospirillum brasilense</i>	30
Tabela 14. Contribuição do percentual da fixação biológica de nitrogênio (%FBN) estimada pela técnica de abundância natural de ¹⁵ N (δ ¹⁵ N), em sete cultivares de <i>Brachiaria</i> em duas épocas de corte, 60 e 180 dias após o plantio.....	31
Tabela 15. Efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de <i>Azospirillum brasilense</i> sob o desenvolvimento inicial das raízes de três genótipos de <i>Brachiaria</i>	33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Pastagens no Brasil	3
2.2. Gênero <i>Brachiaria</i>	3
2.2.1. <i>Brachiaria brizantha</i>	4
2.2.2. <i>Brachiaria decumbens</i>	5
2.2.3. <i>Brachiaria humidicola</i>	5
2.2.4. <i>Brachiaria ruziziensis</i>	6
2.2.5. Híbridos de <i>Brachiaria</i>	6
2.3. O Nitrogênio e a Fixação Biológica de Nitrogênio em Pastagens.....	8
2.4. Bactérias Diazotróficas e Ocorrência em Pastagens.....	9
2.5. Gênero <i>Azospirillum</i> e sua Importância.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Local, Organização do Estudo e Tratamentos	12
3.2. Experimentos em Casa de Vegetação	12
3.2.1. Preparo do inoculante e inoculação.....	12
3.2.2. Substrato.....	13
3.2.3. Delineamento experimental	13
3.2.4. Avaliação dos efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de <i>Azospirillum brasilense</i> em quatorze genótipos de <i>Brachiaria</i>	13
3.2.5. Avaliação dos efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de <i>Azospirillum brasilense</i> em sete genótipos de <i>Brachiaria</i>	14
3.2.6. Análise estatística.....	15
3.3. Produção de Biomassa Seca e Acúmulo de N	15
3.4. Técnica da Abundância Natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$)	15
3.5. Caracterização Morfológica do Sistema Radicular de Três Genótipos de <i>Brachiaria</i> sob os Efeitos de Inoculação da Estirpe Sp 245 de <i>Azospirillum brasilense</i>	16
3.6. Marcação da Estirpe Sp 245 de <i>Azospirillum brasilense</i> com o Gene Repórter GFP para Analisar sua Associação com as Plantas de <i>B. decumbens</i> cv. Basilisk e do Híbrido de <i>Brachiaria</i> Mulato II.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Efeito da Inoculação da Estirpe Sp 245 de <i>Azospirillum brasilense</i> em Quatorze Genótipos de <i>Brachiaria</i>	19

4.1.1. <i>Brachiaria brizantha</i>	19
4.1.2. <i>Brachiaria decumbens</i>	21
4.1.3. <i>Brachiaria ruziziensis</i>	24
4.1.4. <i>Brachiaria humidicola</i>	25
4.1.5. Híbridos de <i>Brachiaria</i> spp.....	27
4.2. Efeito da Inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> em Sete Genótipos Selecionados de <i>Brachiaria</i>	29
4.2.1. Produção de matéria seca da parte aérea.....	29
4.3. Contribuição da Fixação Biológica de N ₂ em Sete Genótipos de <i>Brachiaria</i> Avaliados Através da Técnica de Abundância Natural de ¹⁵ N (δ ¹⁵ N).....	31
4.4. Caracterização Morfológica do Sistema Radicular de Três Genótipos de <i>Brachiaria</i> sob os Efeitos da Inoculação da Estirpe Sp 245 de <i>Azospirillum brasilense</i>	32
4.5. Interação Entre a Estirpe Sp 245 de <i>Azospirillum brasilense</i> e a <i>B. decumbens</i> cv. Basilisk e o Híbrido Mulato II de <i>Brachiaria</i> Analisada com o Uso de Gene Repórter GFP	38
5. CONCLUSÕES	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se com um dos principais fornecedores de carne bovina no mundo com a criação e engorda de cerca de 212,8 milhões de cabeças, atrás apenas dos Estados Unidos. Com condições de clima, de solo e de área muito favoráveis, além do crescente uso de tecnologias em melhoramento, nutrição e sanidade, a pecuária de corte responde por cerca de 11% do Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio nacional. Em 2013 produziu em torno de 9,5 milhões de toneladas de carne bovina e exportou mais de 1,5 milhão de toneladas (BELING, 2013). Possui uma área de pastagens cultivada com aproximadamente 115 milhões ha sendo sua maioria constituída de gramíneas do gênero *Brachiaria*, devido a sua elevada adaptabilidade e tolerância às condições de solos ácidos e de baixa fertilidade, aliada ao seu valor forrageiro (BODDEY et al., 2006).

O gênero *Brachiaria* representa um marco na pecuária nacional com a ocupação de grandes áreas do Cerrado na região central do Brasil. A utilização de espécies e/ou cultivares foi proporcionada pelo conjunto de características desejáveis dessas forrageiras. Por isso, a supremacia deste gênero pode se estender por muito tempo, tendo-se em vista a extensão das áreas cultivadas e o fato de os programas de seleção e melhoramento de forrageiras da Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (Embrapa) contemplar esse gênero (FAGUNDES et al., 2006).

Um dos maiores problemas da pecuária do Brasil é a degradação e a baixa produtividade das pastagens. Cerca de 100 milhões de ha de pastagens no país apresentam nível de degradação forte ou moderado (IBGE, 2007), e no Cerrado este cenário é ainda mais preocupante com cerca de 80% das pastagens degradadas. Aponta-se a baixa disponibilidade de nitrogênio do solo como um dos fatores mais limitantes para as pastagens, fortemente influenciado pela excessiva pressão de pastejo, além da baixa capacidade de suporte da pastagem estabelecida.

O Brasil assumiu voluntariamente a responsabilidade de recuperar cerca de 15 milhões ha de pastagens degradadas com o protocolo da COP-15. Para atingir essas metas a estratégia é aumentar a taxa de lotação (animal/ha) nas áreas já estabelecidas e a diversidade de variedades forrageiras além de recuperar as áreas degradadas. Nesse contexto a FBN, um dos processos naturais de grande importância para a agricultura, vem sendo priorizada.

O nitrogênio é um dos nutrientes mais limitantes para o aumento da produtividade das forrageiras, trata-se de elemento que é exigido pelas plantas em maior quantidade, geralmente representa de 20 a 40 g/kg da massa seca dos tecidos vegetais e é componente integral de muitos tecidos (TAIZ e ZEIGER, 2004). No caso das pastagens quando aplicado é feito em cobertura sem a incorporação ao solo, levando assim a baixa eficiência de uso em razão das perdas no sistema solo-planta. As doses de nitrogênio aplicadas variam desde 50 kg N/ha para pastagens em fase de estabelecimento (VILELA et al., 2009) podendo chegar a mais de 200 kg N/ha nos casos de pastagem já estabelecidas e com nível tecnológico muito alto (CANTARUTTI et al., 1999). Em revisão sobre a recomendação de níveis de N para *Brachiaris* cultivadas em áreas de solos de cerrado, Costa et al (2006) recomendam que a aplicação de N deve ser revisada constantemente já que a espécies modernas de *Brachiaria* foram selecionadas para serem cada vez mais precoces e produtivas e, portanto, apresentam diferentes níveis de exigências nutricionais.

Os altos custos econômicos e ambientais relacionados à fertilização nitrogenada têm estimulado a busca por alternativas que possam diminuir a utilização deste fertilizante sem que haja redução do rendimento.

Uma das possibilidades para viabilizar maior rendimento e diminuir custos sem prejudicar o ambiente é a utilização do potencial genético das plantas, aliado aos recursos biológicos do solo, como as bactérias diazotróficas, que podem fixar N₂ para a planta e produzir hormônios que estimulam o crescimento vegetal, principalmente de raízes, por aumentar a absorção de nutrientes e água. Relatos na literatura indicam que determinados genótipos de *Brachiaria*, não apresentam reduções significativas em sua produtividade mesmo considerando as perdas de nitrogênio em pastagens. Acredita-se que essas perdas poderiam estar sendo compensadas pela fixação biológica do nitrogênio (FBN), que segundo alguns autores pode ser responsável pela introdução de até 40 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N no sistema solo-planta (BODDEY e VICTORIA, 1986; LOUREIRO e BODDEY, 1988). Neste sentido, as possibilidades de pesquisas com fontes alternativas de nitrogênio como, por exemplo, o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), são enormes e poderiam contribuir principalmente em áreas onde a aplicação de doses de N são baixas ou mesmo no desenvolvimento de cultivares responsivos a FBN ou que usem mais eficientemente o N aplicado quando associado à inoculação com bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal.

Bactérias diazotróficas, como por exemplo, as espécies do gênero *Azospirillum*, além de fixarem nitrogênio, podem auxiliar no crescimento radicular, através da produção de fitohormônios e com isso aumentar a densidade e o crescimento de raízes laterais, assim como a sua área superficial. Essas bactérias apresentam grande potencial na reabilitação de áreas e principalmente na sustentabilidade dos agroecossistemas, por incorporarem nitrogênio de forma biológica, além de produzirem e disponibilizar substâncias reguladoras e promotoras do crescimento vegetal, como é o caso das auxinas, giberilinas e citocininas, que podem melhorar a nutrição mineral assim como a utilização de água pelas plantas (BAZZICALUPO e OKON, 2000; KUSS et al., 2007).

Muitos avanços foram realizados na pesquisa sobre bactérias diazotróficas associadas, todavia, ainda há muito a ser feito, desde estudos sobre os micro-organismos e os processos envolvidos na associação com as plantas hospedeiras até a aplicação dessa biotecnologia pelos agricultores (SILVEIRA; FREITAS, 2007). A Embrapa dispõe de bancos de germoplasma de *Brachiaria* que ainda não foram explorados quanto ao potencial de associação com bactérias diazotróficas, à participação no processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) e, conseqüentemente, na promoção de crescimento vegetal. Neste sentido, a identificação de interações mais responsivas ao processo de FBN que levem ao aumento de produtividade deverá impactar positivamente na sustentabilidade das pastagens e no cumprimento das metas do programa Agricultura de Baixo Carbono.

Bactérias diazotróficas podem melhorar o desenvolvimento das braquiárias e a associação entre *Azospirillum brasilense* e *Brachiaria spp.* permite vislumbrar a possibilidade de inoculação de áreas de pastagens. Portanto, para avaliar os efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* em quatorze genótipos de *Brachiaria*, foram propostos os seguintes objetivos:

- a) Avaliar e constatar os dados de produção de matéria seca e teor de N no material inoculado com o controle sem inoculação;
- b) Avaliar o acúmulo de N no material em oferta e a contribuição da FBN através da técnica de abundância natural ($\delta^{15}\text{N}$); e
- c) Avaliar o desenvolvimento radicular de três cultivares, pré-selecionadas quanto ao acúmulo de biomassa e teor de N na parte aérea, quando inoculadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Pastagens no Brasil

O Brasil destaca-se como um dos principais fornecedores de carne bovina do mundo com a criação e engorda de aproximadamente 212 milhões de cabeças de gado. De acordo com estimativas do último Censo Agropecuário Brasileiro, o de 2006 (IBGE, 2007), a área total de pastagens (naturais e plantadas) no Brasil é de 172,3 milhões de hectares. A bovinocultura brasileira ocupa uma área cultivada por pastagens com cerca de 115 milhões ha, o dobro da área destinada à produção de grãos (IBGE, 2006), e aproximadamente 88% da carne bovina produzida no Brasil é de origem quase que exclusiva de rebanhos mantidos em pastagens (COSTA et al., 2009).

Acredita-se que introdução do gênero *Brachiaria* foi responsável pela expansão da pecuária nacional. Essa forrageira, originária da África, adaptou-se bem as condições de clima e solos brasileiros e apresenta característica de crescimento vigoroso. O sucesso do gênero *Brachiaria* em solos brasileiros está evidenciado pelo fato de que cerca de 70 a 80% da área cultivada com pastagens no Brasil, são constituídos por espécies do gênero *Brachiaria*.

Um dos maiores problemas da pecuária do Brasil são a degradação e a baixa produtividade das pastagens. Com base no total das áreas de pastagens do Brasil, segundo cálculos oficiais (IBGE, 2007), seria possível estimar que em torno de 100 milhões de hectares de pastagens no País estariam com nível de degradação forte ou moderado, necessitando sofrer alguma forma de intervenção. Aponta-se entre as principais causas da degradação das pastagens a utilização de germoplasma inadequado; má formação inicial; manejo e práticas culturais inadequadas; pragas, doenças e plantas invasoras; manejo animal; falta de reposição de nutrientes e práticas de conservação do solo incorreta. (MACEDO, 2000).

O cenário atual de constantes pressões exercidas pela sociedade em favor da preservação dos recursos naturais, fez com que a atividade pecuária brasileira adotasse novos modelos estratégicos onde a ocupação de novas áreas de produção pecuária tem sido substituída pelo aumento da produtividade da terra nas áreas já estabelecidas. Assim a pecuária tradicional, de baixa produtividade, não tem condições de competir com esse novo modelo. Desta forma, é fundamental obter ganhos em produtividade que permitam tornar a pecuária, principalmente em regiões de terras mais valorizadas, mais rentável e competitiva em relação às alternativas de uso do solo.

Dentre os principais fatores responsáveis pela degradação das pastagens a deficiência de N é apontada como um dos mais importantes. Se existe limitação do nitrogênio, a pastagem perde vigor e problemas como aparecimento de invasoras menos exigentes em N, exposição do solo, compactação, erosão, entre outros, causam degradação tornando cada vez mais difícil e caro o restabelecimento da capacidade produtiva da pastagem (BODDEY et al., 2000).

Embora o montante estimado atualmente das áreas de pastagens degradadas no Brasil seja um dado preocupante, essa constatação traz perspectivas animadoras, pois nessas áreas degradadas reside um imenso potencial para aumento de produtividade por meio de estratégias de recuperação (DIAS-FILHO, 2011), sem aumento da área de pastagens e sem derrubada de florestas, mas com competição com alimentos (grão) e energia.

2.2. Gênero *Brachiaria*

O gênero *Brachiaria*, pertence à tribo *Panicaceae*, possui aproximadamente cem espécies que ocorrem em regiões tropicais e subtropicais dos continentes americano, asiático,

Oceania e, principalmente, no continente africano. Há autores que questionam quanto à validade do nome *Brachiaria* classificando-o dentro do gênero *Urochloa*, ou ainda, dentro do gênero *Panicum*. As braquiárias normalmente apresentam enraizamento nos nós, quando entram em contato com o solo, dando boa cobertura vegetal, protegendo contra erosão. Por isso a utilização da maioria das espécies do gênero *Brachiaria* na formação de pastagens em áreas declivosas é uma opção viável. Capins do gênero *Brachiaria* desempenham um papel primordial na produção de carne e leite, por viabilizarem a pecuária em solos ácidos e de baixa fertilidade, predominantes no Cerrado, e por criarem novos polos de desenvolvimento, graças a uma pujante indústria de produção de sementes, colocando o Brasil como o maior exportador desse insumo para o mundo.

Os sistemas brasileiros de pastagens cultivadas são ocupados predominantemente pelas braquiárias que teve na espécie *B. decumbens*, introduzida em 1950 no Norte do país, a grande expansão na década de 70 a 80 quando ocupou milhões de hectares pela boa adaptação e produtividade em solos ácidos e pobres, como os do cerrado brasileiro (VALLE et al., 2004). Inicialmente os pastos foram formados com sementes da cultivar *B. decumbens* cv. Basilisk, porém em razão de ser suscetível à cigarrinha das pastagens e provocar fotossensibilização em bezerros e não ser consumida por equinos a mesma deixou de ser comercializada sendo a área de pastagens ocupada por outras espécies de *Brachiaria* que estavam sendo selecionadas nos programas de melhoramento da Embrapa desde o ano 1986 com a introdução de coleção de ecótipos de *Brachiaria* trazidas com apoio do CIAT. O Banco tem mais de 500 acessos de 13 espécies diferentes coletados nas regiões do centro de origem das espécies mais relevantes, como *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruziziensis* e *B. humidicola*, portanto, a coleção é bastante representativa da variabilidade natural existente (VALLE et al., 2004).

Dentre as espécies mais cultivadas e utilizadas, a *Brachiaria brizantha* tem apresentado alta capacidade de adaptação, sendo responsável por grande parte da alimentação do rebanho bovino criado a pasto, representando considerável aumento da área plantada (MACEDO, 2005). Trata-se de uma excelente fonte de alimento, de boa qualidade, desde que se obedeça à exigência nutricional da planta, com adubação e manejo adequado, caso contrário, perde o valor nutritivo rapidamente, principalmente após o florescimento (VALLE et al., 2001).

Dentre as cultivares de *Brachiaria brizantha* que ocupam quase que 80% das áreas cultivadas de pastagens no Brasil, selecionadas a partir do banco de germoplasma e registradas no MAPA para comercialização destacamos: a Marandú, a Xaraés, a Arapoty, a BRS Paiaguás, a BRS Piatã e a Caiporã. Além dessas estão disponíveis para comercialização a espécie *B. humidicola* cv. BRS Tupi e a *B. decumbens* cv. Basilisk. A *B. brizantha* cv. Marandú, lançada em 1983 pela Embrapa Gado de Corte e Embrapa Cerrados (VALLE et al., 2003), é adotada em todas as regiões do país, e cultivada nos estados da Bahia, Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná. Apesar de essa planta ocupar hoje quase a totalidade da área com pastagens cultivadas no Brasil existe a preocupação dos melhoristas de plantas para a introdução de novas cultivares, espécies ou mesmos diferentes gramíneas visando reduzir possíveis problemas de ataques de doenças e pragas que podem levar a chamada síndrome da morte das pastagens, aumentando o risco de vulnerabilidade da pecuária brasileira.

2.2.1. *Brachiaria brizantha*

Ocorre em toda a África Tropical, sob uma precipitação anual acima de 800 mm, principalmente em campos onde os arbustos foram eliminados. Esta espécie tem sido

cultivada experimentalmente com moderado sucesso, no leste e oeste da África, Madagascar, Sri-Lanka, Austrália, Fiji e Suriname. É propagada por sementes. A origem da *Brachiaria brizantha* varia consideravelmente e podem ser selecionados tipos distintos. É, no entanto, inferior a outras espécies de *Brachiaria* cultivadas. *B. brizantha* é uma espécie apomítica e tetraploide ($2n=36$). Segundo Serrão e Simão Neto (1971) esta espécie diferencia-se de *B. decumbens* e *B. ruziziensis* por ser de porte quase ereto, enraizar muito pouco nos nós, possuir folhas glabras em forma de canoa e racemos geralmente mais longos. É uma espécie perene, cespitosa, com colmos eretos ou sub-eretos. Porte de 1 a 1,5 m de altura, folhas glabras ou pilosas, linear lanceoladas com 50 até 400 mm de comprimento e com largura de 6-15 mm. Apresenta rizomas curtos, 30-50 mm de comprimento, cobertos de escamas amareladas e brilhantes. Os nós são glabros e salientes, as inflorescências são formadas por 2-12 racemos com 50-150 mm de comprimento. A ráquis apresenta geralmente cor roxa escura, com 1mm de largura. As espiguetas apresentam de 4 a 6 mm de comprimento, glabras ou ligeiramente pilosas na parte apical (SEIFFERT, 1984).

2.2.2. *Brachiaria decumbens*

Segundo Bogdan (1977) esta espécie pode florescer profusamente, mas poucas sementes serão formadas e apresentarão pouca germinação, que é atribuída principalmente à impermeabilidade das peças florais que envolvem firmemente a cariopse. Segundo o autor, quando há falta de sementes pode ser empregada a propagação vegetativa, usando-se pedaços de colmos que enraízam facilmente durante a estação chuvosa. A escarificação através de ácido sulfúrico concentrado aumenta significativamente a porcentagem de germinação de sementes. A armazenagem de sementes à temperatura ambiente, durante 10 meses, proporcionou germinação adequada, no entanto, o tratamento destas sementes com ácido também melhorou bastante a porcentagem de germinação. Vilela (1977) recomenda o emprego de 4 a 6 Kg de sementes de *B. decumbens* por hectare ou 2.000 Kg de mudas. O tamanho relativamente grande da semente permite o estabelecimento em solos preparados grosseiramente, entretanto são obtidos melhores resultados em solo bem preparado para a semeadura. O crescimento é rápido e sob boas condições, uma completa cobertura do solo pode ser obtida três meses após o plantio (SEIFFERT, 1984).

2.2.3. *Brachiaria humidicola*

É uma espécie indígena do leste e sudeste da África, onde ocorre em áreas relativamente úmidas, sendo exótica na Austrália e Fiji. No ano de estabelecimento e também muitas vezes no ano seguinte, as inflorescências são numerosas, mas a semente é muito esparsa. A planta é facilmente propagada por seções das hastes ou pedaços de touceiras com raízes. Tem sido considerada uma espécie promissora, sendo uma das poucas gramíneas usadas em áreas úmidas, onde oferece altas produções de forragem e apresenta boa resposta a nitrogênio. Segundo Serrão (1977), devido a perdas sérias causadas a pastagens de *Brachiaria decumbens* em 1972-73 por cigarrinhas, foi sugerida a propagação de *B. humidicola* por apresentar-se tolerante ao inseto na região Amazônica. A partir de 1973 a *B. humidicola* começou a difundir-se em larga escala nesta região, havendo tendência para substituir gradualmente a *B. decumbens*. Esta espécie também vem ampliando sua área plantada na região dos Cerrados. Apresenta um número de cromossomos $2n=72$. É uma espécie perene, com hastes floríferas com mais de 500 mm e numerosos estolões, formando uma cobertura densa. Atinge normalmente 1m de altura e os estolões são finos, de cor avermelhada, enraizando nos nós. Os rizomas apresentam-se em dois tipos: um em nódulos pequenos, compactos e outro em nódulos longos e finos, semelhantes aos estolões. As folhas dos

estolões são curtas e lanceoladas, com 50-60 mm de comprimento e 8-10 mm de largura. As dos ramos floríferos são mais estreitas e longas do que as dos estolões, com 70-170 mm de comprimento e 6-8 mm de largura. As dos ramos vegetativos são lineares, com 300 mm de comprimento e 5 mm de largura, glabras, às vezes ligeiramente denticuladas na parte apical da folha. As inflorescências apresentam 2-5 racemos de 30-40 mm de comprimento. Ráquis de 1mm de largura. Espiguetas de 5 mm de comprimento, bisseriadas ao longo da ráquis (SEIFFERT, 1984).

2.2.4. *Brachiaria ruzizensis*

Esta espécie está mais proximamente relacionada com *B. decumbens*, da qual difere, no entanto, por ser de porte maior e apresentar a gluma inferior distante do resto da espiguetas. É originária da África, onde ocorre em condições úmidas e não inundáveis, tendo sido encontrada no Zaire e oeste do Kenya. Foi cultivada inicialmente no Congo (Zaire). Segundo Sertão & Simão Neto (1971) esta espécie emana um odor peculiar, semelhante ao capim gordura. É uma espécie perene, subereta, com 1-1,5 m de altura, apresenta a base decumbente e radicante nos nós inferiores. Possui rizomas fortes, em forma de tubérculos arredondados e com até 15 mm de diâmetro. As folhas são lineares e lanceoladas, com 100-200 mm de comprimento e 15 mm de largura, pubescentes, verde amareladas. A inflorescência está formada por 3-6 racemos de 4-10 mm de comprimento. Ráquis largamente alada, com 4 mm de largura, geralmente de cor arroxeada, Espiguetas de 5 mm de comprimento, pilosas na parte apical, bisseriadas ao longo da ráquis. A gluma inferior tem 3 mm de comprimento e surge 0,5 a 1 mm abaixo do resto da espiguetas. O flósculo fértil apresenta 4 mm de comprimento (SEIFFERT, 1984).

2.2.5. Híbridos de *Brachiaria*

No Brasil existe grande demanda por variedades melhoradas e adaptadas aos diversos ecossistemas pastoris. Nos Cerrados brasileiros as pastagens cultivadas baseiam-se no uso de poucos cultivares forrageiros das espécies *B. brizantha* e *B. decumbens*, caracterizando um monocultivo, portanto com baixa variabilidade genética, em função de cultivares que ocupam extensas áreas de plantio. Além disso, são conhecidas várias deficiências qualitativas e adaptativas em algumas delas, as quais podem ser corrigidas por complementação de caracteres por meio do melhoramento genético. Comercialmente são poucas as variedades de braquiária conhecidas e por serem exóticas e se reproduzirem essencialmente por apomixia, uma nova variedade não é criada naturalmente. Até o momento, através da superação da barreira de ploidia, foi possível gerar híbridos interespecíficos férteis do complexo agâmico, que compreende as espécies *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria ruzizensis* (VALLE et al., 2008).

A partir de meados da década de 1980, e com a coleta de recursos genéticos forrageiros, tanto no Brasil, como na África, formou-se um novo conceito de desenvolvimento de cultivares, visando a explorar a variabilidade natural das coleções, bem como a gerar nova variabilidade por meio de cruzamentos (SAVIDAN et al., 1985). No programa de melhoramento de *Brachiaria*, são reconhecidas algumas deficiências dos cultivares utilizados comercialmente: *B. decumbens* cv. Basilisk é susceptível à cigarrinhas-das-pastagens; *B. brizantha* cv. Marandú é resistente ao inseto, mas susceptível a *Rhizoctonia* e menos persistente em solos ácidos, pobres e mal drenados; *B. humidicola* comum é bem adaptada a condições de solos mal drenados, mas apresenta menor valor nutritivo e é apenas tolerante a cigarrinhas-das-pastagens; *B. ruzizensis*, a única espécie sexual, mas diploide, entre essas, apresenta o melhor valor nutritivo, porém é susceptível a cigarrinhas-das-pastagens e não persiste em solos ácidos nem tolera longos períodos secos (MILES e VALLE, 1996; MILES

et al., 2004). A avaliação agrônômica de acessos do banco de germoplasma descortinou uma variabilidade significativa, permitindo a seleção de ecótipos promissores e potenciais parentais apomíticos, tanto no Brasil, como na Colômbia (VALLE e MILES, 2001; MILES et al., 2004). O programa de melhoramento da Embrapa Gado de Corte foi iniciado com o objetivo de obter híbridos persistentes, que reunissem características desejáveis de dois ou mais progenitores agronomicamente promissores, tais como adaptação a solos ácidos, alta produtividade, bom valor nutritivo e, principalmente, resistência a cigarrinhas-das-pastagens (VALLE et al., 2009).

Cruzamentos com genótipos de *B. brizantha*/*B. decumbens* com *B. ruziziensis* sexual, tetraploidizada artificialmente, viabilizaram a produção de híbridos interespecíficos para avaliação de desempenho agrônômico, ao mesmo tempo em que se estudou a herança da apomixia, que, em *Brachiaria*, é simples e dominante sobre a sexualidade (SAVIDAN & VALLE, 1996). Num estudo envolvendo 45 híbridos pré-selecionados e duas testemunhas, cv. Marandu e cv. Basilisk, utilizou-se um índice visando a facilitar a seleção de genótipos superiores, com base em diversos caracteres de importância agrônômica (VALLE et al., 2004). As características herdabilidade individual no sentido amplo, repetibilidade individual e valores médios de produção, para os 47 genótipos e para cada característica, mostraram valores altos, refletindo a boa sensibilidade para seleção de genótipos superiores, bem como o potencial de vários desses genótipos como futuros cultivares. Com base nos valores obtidos foi possível identificar híbridos sexuais superiores, para integrarem novos cruzamentos no programa de seleção recorrente recíproca, bem como híbridos apomíticos, para alocação em ensaios regionais e de Valor de Cultivo e Uso, visando a avaliar a interação genótipos-ambientes. Híbridos interespecíficos exibiram, normalmente, anormalidades meióticas, que afetaram em graus variados a fertilidade e a obtenção de sementes viáveis (VALLE & PAGLIARINI, 2009), cruciais para assegurar a ampla adoção de novos cultivares.

Híbridos intra-específicos foram recentemente obtidos em *B. humidicola*, uma espécie bem adaptada a solos de drenagem deficiente ou alagados. Nessa população, fez-se o uso de marcadores RAPD, para estudo da diversidade genética na coleção, identificação de híbridos e descarte das plantas de autofecundação. Foi também encontrado um marcador para apomixia (ZORZATTO et al., 2008). Os 50 melhores clones dessa população fazem parte de um ensaio agrônômico, visando a estimar componentes genéticos, fenotípicos e ambientais, pela análise da variabilidade intrapopulacional nessa progênie de irmãos germanos, bem como a identificar híbridos apomíticos superiores, candidatos a novos cultivares, e genitores sexuais de elite, para novos cruzamentos nessa espécie.

As atividades do programa têm gerado conhecimentos e métodos para a melhoria da eficiência de seleção de gramíneas do gênero *Brachiaria* e, com isso, tem agilizado a liberação de novos cultivares para diversificar as pastagens no Brasil. A adoção de cultivares melhorados deverá aumentar a produtividade por animal e por área, bem como contribuir para a diversificação de pastagens no Brasil tropical (VALLE et al., 2009).

Como nova opção para escolha da forrageira no sistema produtivo, foi lançada a *Brachiaria* híbrida cv. Mulato II (CIAT 36087) que é o resultado do cruzamento e seleção iniciado em 1989 na Colômbia entre a *Brachiaria ruziziensis* e a *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, (ARGEL et al., 2007). A *Brachiaria* híbrida cv. mulato, popularmente conhecida como capim mulato, tem origem no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), na Colômbia, sendo uma planta com hábito de crescimento em touceira com tendência a decumbente.

Apresenta de média a alta exigência em fertilidade de solo e precipitações pluviométricas anuais mínimas de 600 mm, não tolerando solos encharcados (PIRES, 2006). O capi m mulato é uma gramínea perene e vigorosa. A altura da planta, sem incluir a inflorescência, varia de 90 a 100 cm. Suas folhas são lineares, lanceoladas de cor verde intenso, com uma média de 35 a 40 cm de comprimento e de 2,5 a 3,0 cm de largura,

apresentando abundante pubescência. A arquitetura da planta se caracteriza por apresentar um número de folhas que varia de 9 a 10 por talo, que se projeta vertical e horizontalmente até a cobertura vegetal, efeito que se traduz em uma estrutura de pastagem composta por uma elevada densidade e volume de folhas. Como planta forrageira, a *Brachiaria* híbrida cv. Mulato apresenta alguns pontos positivos: alta resistência às geadas, média a alta resistência ao sombreamento, muito boa aceitabilidade pelos animais, sistema radicular profundo, tolerância à cigarrinha-das-pastagens, rápida rebrota, florescimento tardio e alto teor de proteína. A altura de corte recomendada para a espécie é de 25 a 30 cm e o tempo médio de formação da pastagem é de 60 a 90 dias. Em virtude de ser um híbrido, o custo da semente é mais alto do que as demais braquiárias disponíveis atualmente no mercado (PIRES, 2006).

2.3. O Nitrogênio e a Fixação Biológica de Nitrogênio em Pastagens

A adubação nitrogenada se apresenta como uma das práticas de maior importância e dificuldade de manejo, uma vez que a deficiência deste nutriente tem se destacado como uma das principais causas na degradação de pastagens cultivadas. O Nitrogênio representa cerca de 10 a 40 g/Kg na massa seca total sendo um dos maiores limitantes ao desenvolvimento vegetal. Este nutriente pode ser removido do sistema solo-planta mediante a exportação por produto animal (carne, principalmente), lixiviação, desnitrificação e volatilização. É fundamental o manejo adequado desse nutriente no solo para garantir o balanço positivo e a sustentabilidade do sistema.

O nitrogênio é um dos fatores mais limitantes para o aumento da produtividade e no caso das pastagens quando aplicado é feito em cobertura sem a incorporação ao solo levando assim a baixa eficiência de uso em razão das perdas no sistema solo-planta. De acordo com Kluthcouski e Aidar (2003) a adubação nitrogenada proporciona um aumento imediato e visível na produção de forragem em razão da quantidade de N disponível no solo não ser suficiente para suprir adequadamente as necessidades das plantas. As doses de nitrogênio aplicadas variam desde 50 Kg N /ha para pastagens em fase de estabelecimento (VILELA et al., 2009) podendo chegar a mais de 200 Kg N/ha nos casos de pastagem já estabelecidas e com nível tecnológico muito alto (CANTARUTTI et al., 1999). Em revisão sobre a recomendação de níveis de N para *Brachiaria* cultivadas em áreas de solos de cerrado Costa et al. (2006) sugerem que o nível de N deve ser revisado constantemente já que as espécies modernas de *Brachiaria* foram selecionadas para serem cada vez mais precoces e produtivas e, portanto, apresentam diferentes níveis de exigências nutricionais.

O elevado preço dos fertilizantes nitrogenados, que são em grande parte responsável pelo aumento dos custos de produção, e a problemática ambiental associada ao manejo desses adubos, principalmente no que tange a contaminação de corpos hídricos, tem intensificado a busca por alternativas de manejo que visem à sustentabilidade do sistema, o uso mínimo de insumos, o melhor uso da terra e maiores produtividades.

Neste sentido, a Fixação Biológica de Nitrogênio pode ter papel importante no balanço de N mais positivo para o sistema de gramíneas para pastagens, sendo uma alternativa ao manejo sustentável dos insumos e em especial da adubação, contribuindo com a recuperação de áreas degradadas e principalmente na manutenção da viabilidade das pastagens. Os primeiros estudos que confirmaram a contribuição da FBN em pastagens foram de De Polli et al. (1977) e Morris et al. (1985), que encontraram significativo ingresso de ^{15}N nas plantas crescidas em atmosfera enriquecida com $^{15}\text{N}_2$. Em estudos desenvolvidos na Embrapa Agrobiologia aplicou-se a técnica de diluição isotópica de ^{15}N , onde as plantas cresceram em vasos ou cilindros preenchidos com solo e sob condições de campo.

Em dois estudos, trabalhando-se com quatro espécies de *Brachiaria* e 11 ecótipos de *Panicum maximum*, encontrou-se que *B. humidicola* e *B. decumbens* e vários ecótipos de *P.*

maximum apresentaram consistentemente maior acumulação de N e menor enriquecimento de ^{15}N que a espécie controle (*B. arrecta*). Destes estudos concluiu-se que a contribuição da FBN nestas espécies foi de 7 a 10 Kg N ha⁻¹ mês⁻¹, durante os meses de verão chuvoso (BODDEY e VICTORIA, 1986; MIRANDA e BODDEY, 1987). Em outro estudo, Miranda et al., (1990) trabalhando com 25 ecótipos de *Panicum maximum*, encontraram que com exceção do genótipo KK16, a contribuição da FBN nos outros genótipos variou de 16 a 39%. Todos estes resultados foram obtidos em ótimas condições de crescimento das plantas, condições estas difíceis de serem encontradas nas diversas áreas de pastagens do país. Considerando se tratar de um sistema de produção de baixa demanda de N e sabendo-se que um animal de 450 Kg de peso vivo, no momento de abate, possui apenas 10-13 Kg N, é possível que uma pastagem bem manejada, onde a FBN nativa associada às plantas consiga contribuir com cerca de 30-40 Kg N/ha/ano, seria suficiente para a produção sustentável da pastagem.

2.4. Bactérias Diazotróficas e Ocorrência em Pastagens

As bactérias diazotróficas são microrganismos capazes de realizar a conversão do nitrogênio gasoso (N₂) em formas acessíveis aos demais eucariotos (NH₃, etc.). Esses microrganismos podem associar-se a rizosfera de gramíneas (associativos) ou até mesmo colonizar o interior dos tecidos das mesmas (endofíticos) (BALDANI et al., 1997). Além da fixação biológica de nitrogênio, alguns desses microrganismos têm a capacidade de promover o crescimento vegetal através da solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo e produzem, ou alteram, a concentração de hormônios vegetais (ROESCH, 2003). Por essas características, essas bactérias foram coletivamente chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (CATTELAN, 1999).

As bactérias diazotróficas têm sido encontradas em associação com diversas culturas, tais como, milho, arroz, cana-de-açúcar, trigo, café, palmeiras, gramíneas, entre outros. Há também relatos de sua presença em solos contaminados com metais pesados (MOREIRA et al., 2008), em solos tratados com resíduos siderúrgicos e bio-sólido industrial (MELLONI et al., 2000), em áreas sob reabilitação de bauxita (MELLONI et al., 2004; Nóbrega et al., 2004) e em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia (SILVA, 2006). A interação dessas bactérias com as culturas tem sido pesquisada em todo o mundo, devido ao potencial no aumento da produtividade das culturas, o que pode reduzir custos de produção, diminuindo o volume de adubos nitrogenados e, conseqüentemente, melhorar conservação dos recursos ambientais (KUSS, 2006).

Estudos tem mostrado que a contribuição de N fixado para gramíneas estão em torno de 25 a 50 Kg.ha⁻¹.ano⁻¹, o que equivale ao suprimento médio de cerca de 17% das demandas das culturas. Considerando a importância que as espécies produtoras de grãos, como trigo, arroz e milho, dentre outras, são a principal fonte de carboidratos da dieta humana e a produção de forrageiras para a pecuária, e o alto potencial fotossintético das gramíneas C4 nos trópicos, esta taxa de FBN, mesmo baixa representa uma grande economia nos custos de produção. A contribuição da FBN associativa a nutrição vegetal não é tão significativa como nas simbioses, entretanto se for considerada a grande extensão de terras recobertas por gramíneas e cereais, esta se torna importante, em termos globais. Estimativas da FBN em *Brachiaria decumbens* e *B. humidicola* indicam valores de 30 a 45 Kg.ha⁻¹.ano⁻¹ de N advindo da FBN (BODDEY e VICTORIA, 1986), é importante ressaltar que espécies de *Brachiaria* recebem contribuições diferentes da FBN.

2.5. Gênero *Azospirillum* e sua Importância

Dentre os microorganismos fixadores de N encontrados em associações com poáceas, as espécies do gênero *Azospirillum* constituem um dos grupos mais estudados (BALDANI et al., 1997; BASHAN; HOLGUIN, 1997; HARTMANN; BALDINI, 2006). Esses microorganismos pertencem à subclasse α das proteobactérias, a qual comporta um grande número de bactérias simbióticas e associativas a plantas, tais como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* e *Gluconacetobacter* (HARTMANN; BALDINI, 2006). Espécies do gênero *Azospirillum* foram isoladas em todo o mundo e de uma diversidade de ambientes e rizosfera de plantas (LIN et al., 2011). Cada estirpe do gênero *Azospirillum* interage com a raiz da planta hospedeira de forma diferente, algumas predominantemente colonizam a superfície da raiz, enquanto outras podem infectar o interior da raiz e, assim, atuar como endófitos, vivendo no interior de uma planta pelo menos durante parte da sua vida sem aparentemente causar doença a esta (MISRA, 2012).

O gênero *Azospirillum* possui atualmente 15 espécies: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. halopraeferens*, *A. largimobile*, *A. doebereineriae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. canadense*, *A. zaeae*, *A. rugosum*, *A. picis* e *A. thiophilum*, *A. formosense*, *A. humicireducens* e *A. fermentarium* (FALEIRO, 2014). Recentemente algumas espécies foram estudadas e seu gênero modificado como o caso do *Azospirillum* amazonense que pertence ao novo gênero *Nitrospirillum* (LIN et al., 2014) e *A. irakense* como *Niveispirillum* (LIN et al. 2014). Dentre as espécies descritas as mais estudadas são *A. lipoferum* e *A. brasilense*, normalmente encontradas em áreas tropicais associadas com forrageiras e cereais como milho, arroz, trigo, sorgo além de outras gramíneas como a cana-de-açúcar e de diversas plantas de outras famílias (HARTMAN; BALDANI, 2006; ZAMBRANO et al., 2007). Essas bactérias são gram-negativas de vida livre, com metabolismo de carbono e N bastante versáteis, conferindo-lhes competitividade durante o processo de colonização (QUADROS, 2009). Utilizam no seu metabolismo fontes de N como amônia, nitrato, nitrito, aminoácidos e nitrogênio molecular (TRENTINI, 2010). O *Azospirillum* spp. apresenta ampla distribuição nos solos tropicais e subtropicais, mas, a literatura é escassa sobre a sua sobrevivência nesses solos na ausência de planta hospedeira (DEL GALLO; FENDIRIK, 1994).

Azospirillum como muitas outras bactérias podem detectar sinais ambientais no solo por um traço chamado quimiotaxia. Quimiotaxia fornece uma vantagem às bactérias contra outros micróbios coexistentes na comunidade mista do solo, permitindo aos *Azospirillum* mover-se em direção as raízes ou um meio que é rico em nutrientes. O estudo de campo de Basã e Holguin (1997) mostrou que o *Azospirillum brasilense* pode mover-se até 30 cm a partir do local da inoculação a superfície da raiz. As bactérias da espécie *Azospirillum* auxiliam, por diversos mecanismos, na nutrição nitrogenada das culturas. Dentre esses mecanismos, destacam-se a produção de hormônios, que interferem no crescimento das plantas e podem alterar a morfologia das raízes, possibilitando a exploração de maior volume de solo (ZAIED et al., 2003), o aumento do processo da redução assimilatória de nitrato disponível no solo (BODDEY et al., 1986) e a fixação biológica do N_2 atmosférico (INIGUEZ et al., 2004). A fixação biológica do N_2 atmosférico pelo *Azospirillum* pode acontecer em condições microaeróbias com níveis baixos de N_2 , através da ação do complexo da nitrogenase. Esta enzima é constituída a partir de dois componentes: a proteína dinitrogenase (proteína MoFe, NifDK), que contém um cofator de ferro e molibdênio, é o sítio de redução de N_2 ; a proteína dinitrogenase redutase (proteína Fe, NifH) transfere elétrons de um doador de elétrons para a proteína nitrogenase (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

Diferentemente das bactérias simbióticas, bactérias associativas como os *Azospirillum*s excretam somente uma parte do nitrogênio fixado diretamente para a planta associada; posteriormente, a mineralização das bactérias pode contribuir com aportes adicionais de nitrogênio para as plantas, contudo, é importante salientar que o processo de fixação biológica

por essas bactérias consegue suprir apenas parcialmente as necessidades das plantas. Desse modo, deve-se lembrar de que, ao contrário das leguminosas, a inoculação de não-leguminosas com bactérias endofíticas ou associativas, ainda que essas consigam fixar nitrogênio, não consegue suprir totalmente as necessidades das plantas em nitrogênio (HUNGRIA, 2011).

Bactérias do gênero *Azospirillum* têm estimulado o crescimento vegetal e o aumento da produção, também através do aumentando da concentração de N em plantas de diversas culturas como algodão, tomate, cana-de-açúcar e *Brachiaria sp* (REIS et al., 2000). Barassi et al. (2008) observaram aumento da eficiência fotossintética das folhas e condutância estomática, incremento na produção de matéria seca e maior altura em várias espécies de vegetais. Segundo Hungria et al. (2010), em gramíneas a adoção desta tecnologia pode proporcionar redução de 50% no uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos. Além disso, a inoculação em gramíneas poderia acelerar a taxa de germinação de sementes e incrementar a produção de matéria seca e o acúmulo de N na planta, aumentando a produção de grãos (FAGES, 1994; FALLIK; OKON, 1996; PANDEY et al., 1998).

O *Azospirillum* além da FBN contribui com o desenvolvimento do sistema radicular da planta, sendo consideradas bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV). Em um levantamento de ensaios conduzidos por 20 anos, Okon e Labandera-Gonzales (1994) relataram que em 60% a 70% dos experimentos foram obtidos incrementos na produtividade devido à inoculação, com aumentos estatisticamente significativos na ordem de 5% a 30%. Em 1996, a Embrapa Soja e o grupo da Universidade Federal do Paraná estabeleceram uma parceria, através de projetos de pesquisa financiados pela Embrapa e pelo Ministério da Ciência e Tecnologia para a realização de ensaios de laboratório e testes de eficiência agrônômica de *Azospirillum* a campo. Obedecendo a todos os critérios da legislação brasileira para inoculantes (MAPA) foram testadas e selecionadas estirpes de *Azospirillum* que apresentavam maior sobrevivência no solo, maior promoção de crescimento das plantas e maior adaptação às tecnologias utilizadas nas culturas do milho e do trigo. O rendimento médio dos tratamentos inoculados, para trigo, foi de 2653 Kg/ha, enquanto que a média nacional na safra 2009/10 foi de 2428 Kg /ha. Para milho, o rendimento médio dos tratamentos inoculados foi de 3407 Kg /ha, 24% superior ao do tratamento controle. Após os resultados houve a autorização pelo MAPA de estirpes de *Azospirillum* para a produção de inoculante para trigo e milho.

Bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* destacaram-se dentre aquelas associadas ao gênero *Brachiaria spp*, com densidade populacional de *Azospirillum spp* variando entre 10^3 e 10^7 células por grama de raízes frescas, a associação entre *Azospirillum* e *Brachiaria* permite vislumbrar a possibilidade de inoculação de áreas de pastagem (REIS et al., 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local, Organização do Estudo e Tratamentos

O estudo foi desenvolvido na Embrapa Agrobiologia localizada no município de Seropédica – RJ (latitude 22° 45' S, longitude 43°) e dividido em duas fases: no primeiro momento foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação, sob condições de temperatura, umidade e irrigação controladas, para avaliação da produção de biomassa sob os efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* em quatorze genótipos de *Brachiaria*. Posteriormente, com base nos resultados obtidos na primeira fase, iniciou-se a segunda etapa onde foram conduzidos dois experimentos em laboratório: uma para análise de crescimento do sistema radicular através do software WinRhizo para as cultivares de *Brachiaria* selecionadas em acúmulo de massa e nitrogênio e outro com a utilização da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* marcada com uma proteína fluorescente verde (GFP) para a identificação da bactéria dentro da planta.

Foram estudados quatorze cultivares do gênero *Brachiaria*, sendo: *B. brizantha* (Marandú, Xaraés, Paiaguás, Piatã e B140); *B. decumbens* cv. Basilisk; *B. humidicola* (Comum, Tupi, H47 e Llanero); *B. ruziziensis* e híbridos (H331, Mulato e Mulato II) com ou sem a aplicação do inoculante contendo a estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* (Tabela 1).

Tabela 1. Lista dos genótipos de *Brachiaria* utilizados e algumas características de cada espécie.

Espécie	Cultivar	Nome vulgar	Exigência nutricional	Precipitação o mm	pH do solo
<i>B. brizantha</i>	B140	-	Média	590-2770	4,0-8,0
	Piatã	Capim-piatã			
	Xaraés	Capim-xaraés ou MG-5			
	Paiaguás	Capim-paiaguás			
	Marandú	Braquiarão; Marandú			
<i>B. decumbens</i>	Basilisk	Braquiária; Decumbens; Braquiárinha	Baixa	870-1900	4,9-7,0
<i>B. ruziziensis</i>	Ruziziensis	Ruziziensis	Média	890-1710	5,0-6,8
<i>B. humidicola</i>	Comum	Braquiária ou Quicúio da Amazônia	Baixa	600-2800	4,0-7,0
	Llanero	Capim-dicioneura			
	H47	-			
	Tupi	Tupi			
Híbridos	Mulatto	Mulato I	Média	700-2200	5,0-7,0
	Mulatto II	Mulato II			
	H331	-			

3.2. Experimentos em Casa de Vegetação

3.2.1. Preparo do inoculante e inoculação

A estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* foi crescida em tubo de ensaio contendo 5 mL de meio DYGS por 24h a 30° C sob agitação a 150 rpm. Transferiu-se todo o conteúdo do

tubo para um Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio DYGS e incubou-se por 24h sob agitação de 150 rpm. Após o crescimento, mediu-se a densidade ótica da suspensão de células bacterianas obtidas. O inoculante à base de turfa, foi preparado adicionando 15 mL da suspensão contendo $1,4 \times 10^9$ células da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* em sacos de polietileno contendo 35 g de turfa (previamente moída, seca, analisada e a acidez corrigida, com carbonato de cálcio), esterilizada a 120° C em autoclave por 2 dias com intervalos de 24h. O inoculante foi mantido por 24h a 30°C antes de ser utilizado. Após o preparo, o inoculante foi usado para a peletização das sementes, e para tal foi pesada uma proporção de 10 g de turfa Kg de semente⁻¹ e foi adicionada uma solução de água e açúcar (10%) na proporção de 6 mL Kg de semente⁻¹ onde as sementes foram imersas, em seguida envoltas na turfa e colocadas para secar à sombra antes do plantio.

3.2.2. Substrato

Para a condução dos experimentos em casa de vegetação utilizou-se os 20 cm superficiais de terra colhida de uma gleba da Estação Experimental da Embrapa Agrobiologia sendo este solo caracterizado como Planossolo série Itaguaí. Este solo foi escolhido previamente devido a marcação ideal de átomos de ¹⁵N naturalmente enriquecidos nesta classe de solo, permitindo avaliação isotópica de ¹⁵N nestes ensaios da dissertação. A análise química desta terra está descrita na tabela 2.

Para a correção da fertilidade foi realizada uma adubação antes do plantio com a aplicação de 9,2 g de superfosfato simples (P), 1,93 g de sulfato de potássio (K) e 0,5 g de FTE-BR12 (B=1,8%; Cu=0,8%; Fe=3,0%; Mn=2,0%; Mo= 0,1%) para cada 10 Kg de solo. Não houve adição de N-fertilizante e não foi realizada calagem, uma vez que não havia níveis tóxicos de Al no solo e o pH estava próximo ao ideal para a cultura. Em cada caixa foi utilizada uma pequena tela de plástico para padronização do plantio e foram plantadas 30 sementes por caixa para cada cultivar. Após a germinação das sementes a tela foi retirada para não interferir no crescimento da planta. As sementes foram fornecidas pela Embrapa Gado de Corte.

Tabela 2. Análise química de terra retirada do horizonte A de um Planossolo, série Itaguaí, utilizado nos experimentos em casa de vegetação.

C	Al	Ca	K	Mg	N	P	pH
(%)	(cmolc/d)				(%)	(mg/L)	(Unid)
1,19	0,07	1,65	34,30	0,87	0,12	1,22	5,5

Fonte: (Nogueira e Souza, 2005).

3.2.3. Delineamento experimental

Para a condução dos experimentos em casa de vegetação foram utilizadas caixas de polietileno com capacidade para 15 Kg, contendo 14 Kg de solo. O delineamento experimental foi de blocos completamente casualizados com cinco repetições para os tratamentos sem inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* (controle) e com inoculação (Sp 245).

3.2.4. Avaliação dos efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* em quatorze genótipos de *Brachiaria*

No primeiro experimento, realizado na Casa de Vegetação 07 da Embrapa Agrobiologia, os quatorze genótipos de *Brachiaria* foram testados (Figura 1). O experimento

foi estabelecido no fim do mês de julho de 2015 com duração aproximada de 260 dias. A coleta dos dados foi realizada em quatro ciclos. Foram realizados cortes das plantas até uma altura de 5 cm do solo, coletando-se apenas a parte aérea e deixando os 5 cm residuais para possibilitar a rebrota, conforme descrito por Bonfim-Silva e Monteiro (2007), aos 60, 120 e 180 dias após o plantio (DAP). No último corte aos 240 DAP as plantas foram cortadas rente ao solo e as raízes foram coletadas e lavadas com água corrente para total remoção das partículas do substrato. Todas as amostras coletadas foram levadas para a estufa a 65°C até atingir peso constante para a obtenção da massa seca. Após a secagem as amostras de parte aérea foram processadas em moinho de faca do tipo Willey para a determinação dos teores de N.

As amostras da primeira e terceira coletas (60 e 180 DAP) de sete genótipos foram processadas em moinho do tipo bola para a determinação dos valores delta de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) utilizando-se a técnica da abundância natural de ^{15}N para avaliação da contribuição da FBN. O acúmulo de biomassa ao longo dos quatro cortes e os resultados dos teores de N foram utilizados para seleção de sete genótipos que apresentaram interação, positiva ou não, com a estirpe inoculada, para segunda avaliação destes em casa de vegetação.



Figura 1. Visão geral do primeiro experimento para avaliação do efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* em quatorze genótipos de *Brachiaria*.

3.2.5. Avaliação dos efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* em sete genótipos de *Brachiaria*

Neste segundo experimento (Figura 2) sete (7) genótipos de *Brachiaria* sendo: *B. decumbens* cv. Basilisk; *B. brizantha* (Marandú, B140 e Paiaguás); *B. humidicola* cv Llanero; *B. ruziziensis* e o híbrido Mulato II, pré-selecionados no primeiro experimento com base no acúmulo de biomassa e nitrogênio ao longo de quatro cortes, foram novamente avaliados quanto aos efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*.

O experimento foi estabelecido no dia 07 de outubro de 2016 com duração de trinta (30) dias. Ao fim do experimento foi realizado um corte da parte aérea e as raízes foram coletadas e lavadas com água corrente para total remoção do solo. As amostras coletadas foram levadas para a estufa a 65°C até atingirem peso constante para a obtenção da massa seca. Após a secagem as amostras de parte aérea foram processadas em moinho de faca do tipo Willey para a determinação dos teores de N.



Figura 2. Visão geral do segundo experimento para avaliação do efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* em sete genótipos de *Brachiaria*.

3.2.6. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística para verificar a normalidade e homogeneidade das variâncias pelos testes de Liliefors e Cochran e Barlett, respectivamente, pelo software SAED 9.1. Em seguida foram submetidos à análise de variância pelo software SISVAR, sendo as médias comparadas pelo teste Tukey com nível de significância de 5%. Foram comparadas as médias do desdobramento do efeito de tratamentos dentro de cada genótipo em cada corte realizado.

3.3. Produção de Biomassa Seca e Acúmulo de N

Foi determinado o peso da matéria seca (MS) de cada parcela para estimativa da produção de cada genótipo. As amostras de plantas foram pesadas logo após os cortes para a obtenção do peso fresco e em seguida colocadas em estufa a 65°C durante 72 horas ou até atingirem peso constante para determinação da matéria seca.

Após a colheita, a parte aérea foi pesada, moída e analisada quimicamente, determinando-se o teor de N. Para a digestão das amostras, 200 mg de material vegetal, seco e moído, foram colocados em tubos de digestão, adicionando 1 mL de solução contendo H₂O₂ a 30 %, 1,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e, por último 0,7 g de uma mistura catalisadora contendo 100 g de sulfato de sódio, 10 g de sulfato de cobre e 1,0 g de selênio. As amostras foram mantidas no bloco digestor até digestão total do material vegetal. Para a quantificação do teor de nitrogênio, foi adotada metodologia proposta por Tedesco et al. (1985), a qual possibilita a recuperação do nutriente de forma semelhante à obtida com o método de Kjeldahl. O acúmulo de N foi obtido pelo produto entre a massa seca e o teor do nutriente em cada parte do vegetal.

3.4. Técnica da Abundância Natural de ¹⁵N (δ¹⁵N)

A técnica da abundância natural de ¹⁵N (δ¹⁵N) tem como um de seus princípios, a utilização de uma testemunha não fixadora que possua um valor de delta semelhante ao do solo, pois se nutrindo somente do N existente no solo, seu valor de delta será semelhante ou igual ao do mesmo. Esta testemunha pode ser qualquer planta não fixadora de nitrogênio que esteja ocorrendo espontaneamente na área de estudo. A contribuição da FBN associada às pastagens será estimada utilizando-se a técnica da abundância natural de ¹⁵N (SHEARER e KOHL, 1986), em espectrômetro de massa Finnigan Mat, modelo Delta plus na Embrapa Agrobiologia. De acordo com esta técnica, a contribuição percentual de nitrogênio derivado da FBN, para a pastagem será calculada através da fórmula:

$$\%FBN = \left(\frac{(\delta^{15}N \text{ planta testemunha} - \delta^{15}N \text{ planta teste})}{(\delta^{15}N \text{ planta testemunha} - B)} \right) \times 100$$

Onde:

δ¹⁵N da planta testemunha: valor de δ¹⁵N do solo obtido através de plantas não fixadoras, utilizadas como referência;

δ¹⁵N da planta teste: valor de δ¹⁵N da planta fixadora de N² (pastagem);

B: valor da discriminação isotópica de ¹⁵N feita pelas plantas durante o processo de FBN. Em plantas não nodulantes, o fracionamento isotópico, parece não ser da mesma magnitude que em plantas nodulantes, portanto para gramíneas, o valor B da fórmula geral foi considerado 0 (zero), conforme trabalho efetuado por Yoneyama et al. (1997).

3.5. Caracterização Morfológica do Sistema Radicular de Três Genótipos de *Brachiaria* sob os Efeitos de Inoculação da Estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*

Na segunda fase do estudo foi conduzido um ensaio na Casa de Vegetação 01 da Embrapa Agrobiologia para caracterização morfológica do desenvolvimento inicial do sistema radicular de três cultivares de *Brachiaria*, sendo: *B. decumbens* cv. Basilisk; *B. brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II (Figura 3).

Para tal foram utilizados copos contendo aproximadamente 0,5 Kg de substrato areia + vermiculita (2:1 v/v). Foram semeadas cinco sementes por copo e após cinco dias da emergência das plântulas foi realizado um desbaste para a homogeneização mantendo-se três plantas por copo. Foram aplicados 25 mL de solução de Hoagland modificada (pH médio de 5,1 - HOAGLAND e ARNON, 1951) a cada cinco dias.

Neste experimento a estirpe bacteriana *Azospirillum brasilense* (Sp245) foi cultivada durante dois dias em meio Dygs (BALDANI et al., 2014) 100 mL e aplicada sobre a semente no ato do plantio numa dosagem de 1 mL por copo. As sementes foram fornecidas pela Embrapa Gado de Corte. O delineamento experimental foi de blocos completamente casualizados com quatro repetições para os tratamentos sem inoculação (Controle) e com inoculação (Sp245).

O ensaio foi estabelecido no dia 16 de dezembro de 2016 e foi colhido após 15 dias de emergência das sementes. As amostras foram retiradas cuidadosamente para não danificar a raiz que foi separada da parte aérea e lavada em água corrente até que o sistema radicular das plântulas estivesse totalmente livre de partículas do substrato. As raízes lavadas foram armazenadas em frascos contendo solução de etanol 50%, para evitar sua desidratação.

Para a análise da morfologia do sistema radicular: utilizou-se o sistema WinRHIZO Pro 2016 (Régent Instr. Inc.), acoplado a um scanner profissional EPSON Flatbed Scanner EPSON Expression 11000XL. Foi utilizada uma definição de 400 (dpi) para as medidas de morfologia de raiz, como descrito por Bauhus & Christian (1999), Bouma et al. (2000) e Costa et al. (2002). As raízes foram dispostas em uma cuba de acrílico de 20 cm de largura por 30 cm de comprimento contendo água. A utilização deste acessório permitiu a obtenção de imagens em três dimensões, evitando também a sobreposição das raízes; as leituras foram realizadas em quatro plantas por genótipo. As características avaliadas foram: comprimento de raízes, volume, diâmetro, área projetada, área de superfície, pontas, razão entre o comprimento e volume das raízes e bifurcações.



Figura 3. Visão geral do ensaio para caracterização morfológica do sistema radicular de *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II.

3.6. Marcação da Estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* com o Gene Repórter GFP para Analisar sua Associação com as Plantas de *B. decumbens* cv. Basilisk e do Híbrido de *Brachiaria* Mulato II

Para um melhor detalhamento da colonização das plantas de *Brachiaria* pela bactéria inoculada, utilizou-se a estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* marcada com a proteína verde fluorescente (GFP), cedida pela Professora Adriana Ermelick, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, com o objetivo de diferenciar as bactérias inoculadas experimentalmente daquelas pré-existentes na planta. (Figura 4)

O plasmídeo pHRGFPGUS (RAMOS et al., 2002) foi transferido para a estirpe Sp 245 de *A. brasilense* por conjugação com *E. coli* S17.1 contendo o plasmídeo. A estirpe de *A. brasilense* (receptora) e *E. coli* S17.1 pHRGFPGUS (doadora) foram cultivadas até saturação nos meios NFbHPN e LB (SAMBROOK et al., 1989), respectivamente. Cinco microlitros da cultura de *E. coli* foram utilizados para inocular 2 mL de meio LB sem antibióticos e 100 µL da cultura de *A. brasilense* foram utilizados para inocular 5 mL de meio NFbHPN sem antibióticos. As culturas foram mantidas a 37°C e 30°C, respectivamente, sob agitação constante (120 rpm) por 5 h. Em seguida, 50 µL de *A. brasilense* foram misturados com 5 µL de *E. coli*, as células foram depositadas como uma gota em meio LA/NFbHPN (1:1 v/v) e incubadas a 30°C durante 20 h. A massa de células foi raspada, suspensa em 1 mL de NFbHPN, diluída e plaqueada em meio NFbHPN (contendo NH₄Cl 20 mM) e os antibióticos estreptomicina (80 µg/mL), ácido nalidíxico (10 µg/mL) e canamicina (100 µg/mL). A seleção dos clones positivos foi feita também pela visualização da fluorescência sob radiação UV em transiluminador ou por microscopia de fluorescência utilizando microscópio.

Posteriormente a estirpe bacteriana conjugada foi cultivada durante dois dias em meio Dygs modificado (BALDANI et al., 2014) contendo 6,25 µg 50 L⁻¹ de Kanamicina. As células bacterianas foram recolhidas por centrifugação a 300 rpm durante 10 min. Depois as células foram resuspendidas em 50 mL 1x PBS e a densidade óptica da suspensão foi ajustada de D.O.₆₀₀ 0,6.

As mudas de plântulas germinadas dos genótipos híbrido Mulato II e *B. decumbens* cv. Basilisk, foram lavadas com 1 x PBS e colocadas na suspensão bacteriana durante 1 h. Após a inoculação as mudas foram plantadas em um sistema hidropônico em tubo estéril contendo solução MS para plantas com sais em meia força (mg/L) (Murashige e Skoog, 1962), preparados com ágar da marca Sigma diluído numa proporção de 15 g L⁻¹. As plantas foram cultivadas em condições controladas em sala de crescimento com temperatura de 24 ± 1°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 56 mmol.m⁻².s⁻¹, onde permaneceram por 10 dias. Plântulas não inoculadas foram incubadas em tubos contendo a solução MS para controle.

Após 10 dias de incubação, amostras de tecido das plântulas de *Brachiaria* (raiz, caule e folha) inoculadas com a estirpe Sp 245 marcada e controle foram preparadas em lâminas e analisadas por microscopia confocal de varredura a laser no microscópio Axio Observer Z.1 na Embrapa Agrobiologia. Foram geradas imagens em microscópio de fluorescência com aumento de 400x utilizando um fotomicroscópio ZEN 2012 SPI (Black edition). As amostras foram visualizadas nos comprimentos de onda de 488 nm para as fluorescência verde-autofluorescência da clorofila.

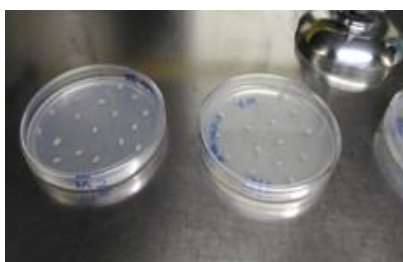


Figura 4. Visão geral do ensaio para visualização da estirpe Sp 45 de *Azospirillum brasilense* por meio de marcação molecular com a proteína verde fluorescente (GFP) em plantas de *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito da Inoculação da Estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* em Quatorze Genótipos de *Brachiaria*

4.1.1. *Brachiaria brizantha*

A produção de massa seca da parte aérea para as cultivares de *B. brizantha* variou para cada espécie ao longo de quatro cortes (Tabela 3). A cultivar Marandú apresentou maior acúmulo de biomassa dentre os genótipos testados, e no primeiro corte, aos 60 dias após o plantio (dap), houve um incremento de 32,8% na produção quando inoculado com a estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*. Aos 240 dias após o plantio, quando houve o quarto corte, a cultivar Piatã apresentou diferença estatística entre os tratamentos, contudo não houve resposta positiva à inoculação, com incremento de 29,3 % para o tratamento controle. Nos demais cortes os genótipos não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos, que pode ser explicado devido a elevada variabilidade dos dados, comprovado pelos coeficientes de variação entre 22,9% e 33,8%.

Os teores de N na parte aérea das cinco cultivares de *B. brizantha* ao longo de quatro ciclos de desenvolvimento (Tabela 3), não diferiram estatisticamente entre os tratamentos controle sem inoculação e inoculação de Sp 245 para as cultivares durante os cortes, com exceção da cultivar B140 onde o tratamento controle, aos 120 dias após o plantio, apresentou maior teor de N nas folhas quando comparado ao tratamento inoculado. Observou-se que no primeiro corte a concentração de N na parte aérea foi consideravelmente superior que os teores nos demais. Esse incremento pode ter ocorrido em decorrência da maior disponibilidade de nitrogênio no primeiro crescimento devido à mineralização da matéria orgânica após o revolvimento e correção do solo e da própria reserva inicial. Visto que não foi incorporado adubo nitrogenado ao solo durante o experimento, justifica-se este decréscimo ao longo do tempo.

Para o acúmulo de N na parte aérea das cultivares de *B. brizantha*, houve diferença estatística entre os tratamentos controle e inoculado, para as cultivares B140 e Marandú. O capim B140 apresentou resposta negativa à inoculação com incremento de 32,4% e 28,7 % para o tratamento controle, no primeiro e segundo cortes respectivamente. O capim Marandú apresentou interação positiva à inoculação com incremento de 38% para o acúmulo total de N aos 60 dias após o plantio.

Segundo Costa (1995), a melhor idade de corte do capim Marandú, visando conciliar a melhor produção e melhores teores de PB situa-se entre 56 e 70 dias de crescimento vegetativo, ratificando os resultados apresentados neste estudo, onde os maiores valores de matéria seca da parte aérea foi observado aos 60 dias de cultivo do capim Marandú.

Os resultados apresentados também corroboram com aqueles encontrados por Oliveira et al. (2007), onde os efeitos da inoculação das sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandú com *Azospirillum* sp. somente foi detectado no primeiro corte após a semeadura e nos outros cortes não se verificou nenhuma diferença em produtividade.

Resultados semelhantes foram constatados por Hungria et al. (2016), em área de Cerrado, onde os resultados apontaram efeito significativo da inoculação com *Azospirillum brasiliense* em *B. brizantha* no primeiro e segundo ano, além disso, quando aliou-se fertilização nitrogenada e inoculação, os incrementos em massa de matéria seca foram superiores a 24%. No presente trabalho não foi testado o tratamento nitrogenado, todavia, observou-se que a inoculação da estirpe Sp 245 favoreceu o incremento de biomassa no capim Marandú aos 60 dap.

Tabela 3. Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), Teor de N (%) e Acúmulo de N (mg.vaso⁻¹) de cinco cultivares de *B. brizantha* spp. ao longo de quatro cortes sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*.

Genótipos	MSPA (g.vaso ⁻¹)		Teor de N (%)		N acumulado (mg.vaso ⁻¹)	
	Controle	Sp245	Controle	Sp245	Controle	Sp245
60 dias após o plantio						
B140	17,4	13,4	1,9	1,6	332,8 a	224,8 b
Piatã	26,6	29,2	0,9	0,8	237,5	227,7
Xaraés	23,4	21,8	0,9	1,0	217,3	228,4
Paiáguas	25,7	21,1	1,0	0,7	242,9	154,4
Marandú	21,5 b	32,0 a	0,9	0,9	186,8 b	292,6 a
C.V. (%)	33,8		27,1		39,9	
120 dias após o plantio						
B140	15,8	13,4	0,8 a	0,6 b	118,8 a	84,7 b
Piatã	15,1	12,0	0,6	0,6	86,5	73,6
Xaraés	19,0	15,6	0,5	0,6	102,4	88,1
Paiáguas	14,2	13,2	0,5	0,6	76,7	73,4
Marandú	17,0	17,7	0,6	0,6	106,7	109,0
C.V. (%)	22,9		21,5		23,6	
180 dias após o plantio						
B140	14,0	20,1	0,7	0,6	97,7	117,3
Piatã	19,2	16,8	0,7	0,7	124,6	108,3
Xaraés	21,4	17,9	0,7	0,7	138,7	121,9
Paiáguas	18,8	16,4	0,6	0,6	110,9	99,1
Marandú	18,0	17,7	0,7	0,6	120,9	110,1
C.V. (%)	31,2		20,5		33,2	
240 dias após o plantio						
B140	16,0	17,5	0,8	0,7	120,3	126,2
Piatã	19,1 a	13,5 b	0,7	0,8	119,3	103,1
Xaraés	18,4	15,6	0,7	0,7	127,1	108,9
Paiáguas	15,6	16,5	0,7	0,8	110,9	126,2
Marandú	16,2	15,4	0,8	0,8	133,6	113,7
C.V. (%)	27,9		15,0		26,5	

Média de 5 repetições. C.V.: Coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra a na linha não representam diferença estatística para os efeitos de inoculação pelo teste de Tukey à 5%.

Batista e Monteiro (2007) trabalhando com doses de nitrogênio de 1,0 a 33,0 mmol L⁻¹, observaram a influência da concentração desse mineral nas lâminas de folhas recém-expandidas do capim Marandú (*B. brizantha* cv. Marandú); com oscilação de 1,60 a 3,10 mg g⁻¹ na amostragem do primeiro corte e de 0,95 a 1,70 mg g⁻¹ no segundo corte das plantas. Durante o estabelecimento da planta, nos primeiros 30 a 40 dias, a demanda de nitrogênio no estabelecimento pode ser atendida pela mineralização da matéria orgânica, que é estimulada pelo preparo do solo (CANTARUTTI et al., 1999), o que poderia justificar a concentração de nitrogênio na primeira avaliação. Em se tratando de tecidos vegetais, é pertinente considerar que os teores de nitrogênio total tendem a diminuir progressivamente na medida em que a planta atinge estádios de desenvolvimento mais avançados (MENGEL; KIRKBY, 2001).

A produção de matéria seca da raiz, o acúmulo de biomassa da parte aérea ao fim dos 240 dias de cultivo e a massa seca total para cada cultivar, que equivale ao somatório da massa seca radicular e do acúmulo da biomassa da parte aérea, não foram influenciados de forma significativa pelos tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4. Produção de massa seca da raiz (MSR), acúmulo de massa seca da parte aérea e massa seca total (MST) de cinco cultivares de *B. brizantha* spp. após 240 dias de plantio sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*.

Genótipos	MSR (g.vaso ⁻¹)		Massa Seca (g.vaso ⁻¹)		MST (g.vaso ⁻¹)	
	Controle	Sp245	Controle	Sp245	Controle	Sp245
B140	29,6	32,9	63,2	64,4	92,8	97,2
Piatã	39,7	47,8	79,9	71,5	119,6	119,3
Xaraés	45,9	38,6	82,2	70,9	128,1	109,5
Paiaguás	26,5	27,4	74,3	67,1	100,7	94,6
Marandú	51,0	50,9	72,6	82,7	123,6	133,6
C.V (%)	41,7		16,3		20,1	

Média de 5 repetições. C.V.: Coeficiente de variação. MST: somatório da massa seca das raízes e do acúmulo de massa seca da parte aérea. Médias seguidas pela mesma letra a na linha não representam diferença estatística para os efeitos de inoculação pelo teste de Tukey à 5%.

De maneira geral não é possível afirmar que os incrementos observados, principalmente para a variável massa seca ao longo dos quatro cortes são influências do inoculante, uma vez que as diferenças entre os tratamentos não foram comprovadas estatisticamente, com exceção do capim Marandú aos 60 dap. Entretanto, pode-se inferir que a interação planta-bactéria é específica, promovendo efeitos diferenciados em cada cultivar ao longo do desenvolvimento vegetal. A variabilidade das respostas das cultivares aos tratamentos controle sem inoculação e inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*, dificulta a identificação dos possíveis fatores que estejam atuando no desenvolvimento e produtividade do capim, que permitam a melhor compreensão do estabelecimento das bactérias diazotróficas inoculadas e sua interação com a planta em estudo.

4.1.2. *Brachiaria decumbens*

A produção de biomassa da parte aérea da *B. decumbens* cv. Basilisk ao longo de quatro cortes está representada na Tabela 5. A maior produção de matéria seca da parte aérea ocorreu na terceira rebrota, aos 180 dap, sendo 18,5 g.vaso⁻¹ quando inoculado com *Azospirillum brasilense* e 16,9 g vaso⁻¹ no tratamento sem inoculação. Entretanto, para esta cultivar não houve influência significativa dos tratamentos para a produção de massa seca.

A concentração de N nas folhas variou ao longo dos quatro cortes, com valores mais elevados no primeiro corte e considerável decréscimo nos cortes subsequentes. Esse comportamento era esperado uma vez que não foi feita adubação nitrogenada durante a condução deste experimento. Não houve diferença significativa entre os tratamentos controle sem inoculação e inoculação de Sp 245 para esta variável, contudo observa-se maiores teores de N no tratamento inoculado no primeiro, segundo e quarto cortes. Resultados similares foram encontrados por Guimarães et al. (2011a), onde houve relatos de que os efeitos da inoculação sobre os níveis de N nas folhas, ocasionou aumento em torno de 10% em plantas de *Brachiaria decumbens* quando comparados à forrageira sem a presença do inoculante.

Para a variável acúmulo de nitrogênio na parte aérea da forrageira *B. decumbens* cv. não foi detectada diferença entre os tratamentos controle sem inoculação e inoculado com Sp 245. Entretanto, aos 60, 120 e 240 dap, houve um acréscimo de 10,9%, 14,9% e 1,5%, respectivamente, no acúmulo de N nos tratamentos inoculados.

Tabela 5. Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), Teor de N (%) e Acúmulo de N (mg.vaso⁻¹) de *B. decumbens* cv. Basilisk ao longo de quatro cortes sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*.

Genótipos	MSPA (g.vaso ⁻¹)		Teor de N (%)		N acumulado (mg.vaso ⁻¹)	
	Controle	Sp245	Controle	Sp245	Controle	Sp245
60 dias após o plantio						
Basilisk	17,6	16,8	0,9	1,1	157,7	177,1
C.V. (%)	33,8		27,1		39,9	
120 dias após o plantio						
Basilisk	17,3	14,5	0,6	0,7	95,9	95,9
C.V. (%)	22,9		21,5		23,6	
180 dias após o plantio						
Basilisk	16,9	18,5	0,6	0,6	97,3	114,3
C.V. (%)	31,2		20,5		33,2	
240 dias após o plantio						
Basilisk	16,7	14,3	0,7	0,8	110,0	111,7
C.V. (%)	27,9		15,0		26,5	

Média de 5 repetições. C.V.: Coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra a na linha não representam diferença estatística para os efeitos de inoculação pelo teste de Tukey à 5%.

A produção de matéria seca da raiz, o acúmulo de biomassa da parte aérea ao fim dos 240 dias de cultivo e a massa seca total para cada cultivar, não diferiram estatisticamente entre os tratamentos (Tabela 6). Todavia, observa-se que a produção de matéria seca da raiz quando inoculada obteve produção 9% superior ao tratamento não inoculado. Segundo Guimarães et al. (2011a e 2011b), o uso de *Azospirillum* demonstra um aumento de 10% sobre os valores de número de folhas em pastagem de *Brachiaria decumbens* quando em comparação à ausência do inoculante. Neste caso, os autores verificam que as plantas inoculadas não apresentaram desempenho superior para as variáveis número de folhas e teores de N foliar quando comparados aos tratamentos onde somente receberam fertilizante nitrogenado na dose 200 mg N dm⁻³. Neste experimento não foi utilizado um controle com adição de N fertilizante para comparar se este nutriente estava limitando o crescimento.

Tabela 6. Produção de massa seca da raiz (MSR), acúmulo de massa seca da parte aérea e massa seca total (MST) de *B. decumbens* cv. Basilisk após 240 dias de plantio sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*.

Genótipos	MSR (g.vaso ⁻¹)		Massa Seca (g.vaso ⁻¹)		MST (g.vaso ⁻¹)	
	Controle	Sp245	Controle	Sp245	Controle	Sp245
Basilisk	27,1	29,8	68,4	64,0	95,5	93,7
C.V. (%)	41,7		16,3		20,1	

Média de 5 repetições. C.V.: Coeficiente de variação. MST: somatório da massa seca das raízes e do acúmulo de massa seca da parte aérea. Médias seguidas pela mesma letra a na linha não representam diferença estatística para os efeitos de inoculação pelo teste de Tukey à 5%.

4.1.3. *Brachiaria ruziziensis*

A produção de biomassa da parte aérea e teor de N de *B. ruziziensis* ao longo de quatro cortes não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos controle sem inoculação e inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* (Tabela 7). Observou-se que aos 60 dap ocorreu a maior produção de matéria seca da parte aérea, com 23,8 g.vaso⁻¹ quando inoculado com *Azospirillum brasilense* e 21,5 g.vaso⁻¹ no tratamento sem inoculação, e a maior concentração de N, quando comparado as demais coletas

Visto que não foi realizada adubação nitrogenada neste experimento, justifica-se este decréscimo ao longo do tempo. A concentração mais elevada de N no primeiro corte pode ter ocorrido pela maior disponibilidade inicial de nitrogênio, principalmente devido à mineralização da matéria orgânica após o revolvimento do solo e da própria reserva da semente.

A variável acúmulo de nitrogênio na parte aérea de *B. ruziziensis* também não apresentou diferença entre os tratamentos nos quatro cortes realizados, o que pode ser explicado pela elevada variabilidade dos dados evidenciado pelos coeficientes de variação.

No entanto observou-se que a inoculação favoreceu o acúmulo de N e a produção de massa seca da parte aérea aos 60 e 180 dias podendo-se inferir que nesses períodos houve melhor interação planta-bactéria. Pelo fato das gramíneas apresentarem sistema radicular fasciculado, a mesma tem vantagem para extrair água e nutrientes do solo. Por isso, mesmo que apenas parte do nitrogênio possa ser fornecida pela associação com bactérias fixadoras, a economia em adubos nitrogenados pode ser considerada igual àquela verificada com as leguminosas que podem ser autossuficientes em nitrogênio (DÖBEREINER, 1992).

Tabela 7. Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), Teor de N (%) e Acúmulo de N (mg.vaso⁻¹) de *B. ruziziensis* ao longo de quatro cortes sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*.

Genótipos	MSPA (g.vaso ⁻¹)		Teor de N (%)		N acumulado (mg.vaso ⁻¹)	
	Controle	Sp245	Controle	Sp245	Controle	Sp245
60 dias após o plantio						
Ruziziensis	21,5	23,8	0,9	0,9	199,9	208,0
C.V. (%)	33,8		27,1		39,9	
120 dias após o plantio						
Ruziziensis	15,4	14,8	0,6	0,6	92,8	86,6
C.V. (%)	22,9		21,5		23,6	
180 dias após o plantio						
Ruziziensis	16,3	18,9	0,7	0,6	106,3	114,2
C.V. (%)	31,2		20,5		33,2	
240 dias após o plantio						
Ruziziensis	16,8	16,1	0,7	0,7	122,4	110,6
C.V. (%)	27,9		15,0		26,5	

Média de 5 repetições. C.V.: Coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra a na linha não representam diferença estatística para os efeitos de inoculação pelo teste de Tukey à 5%.

A produção de matéria seca da raiz e o acúmulo de biomassa não apresentaram diferença entre os tratamentos (Tabela 8). A inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum spp.* em gramíneas tem promovido incrementos significativos no desenvolvimento radicular

das plantas, resultando em melhor aproveitamento e utilização de nutrientes e água e, conseqüentemente, em melhor desenvolvimento das plantas (DARTORA et al., 2012).

Hungria et al. (2016) verificaram, em área de Cerrado, efeito significativo da inoculação com *Azospirillum brasiliense* em *B. ruziziensis* no primeiro e segundo cortes em dois anos de cultivo, além disso, quando aliou-se fertilização nitrogenada e inoculação de bactérias diazotróficas, os incrementos em massa de matéria seca foram superiores a 23%. Todavia no presente estudo, não foram encontrados resultados significativos quando testado a inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasiliense* em capim ruziziensis no quis diz respeito a produção de biomassa e ao desenvolvimento radicular. É importante ressaltar que o tipo de solo, o genótipo e as condições de cultivo podem afetar o desempenho esperado com o uso de bactérias diazotróficas, uma vez que existem trabalhos que houve aumento do rendimento e produtividade, mas também existem outros com resultados pouco satisfatórios (CAMPOS et al. 2000).

Tabela 8. Produção de massa seca da raiz (MSR), acúmulo de massa seca da parte aérea e massa seca total (MST) de *B. ruziziensis* após 240 dias de plantio sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasiliense*.

Genótipos	MSR (g.vaso ⁻¹)		Massa Seca (g.vaso ⁻¹)		MST (g.vaso ⁻¹)	
	Controle	Sp245	Controle	Sp245	Controle	Sp245
Ruziziensis	32,7	25,5	70,0	73,6	102,7	99,1
C.V. (%)	41,7		16,3		20,1	

Média de 5 repetições. C.V.: Coeficiente de variação. MST: somatório da massa seca das raízes e do acúmulo de massa seca da parte aérea. Médias seguidas pela mesma letra a na linha não representam diferença estatística para os efeitos de inoculação pelo teste de Tukey à 5%.

4.1.4. *Brachiaria humidicola*

A produção de biomassa da parte aérea para as quatro cultivares de *B. humidicola* ao longo de quatro cortes apresentaram diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 9). No entanto, observou-se que aos 60 dap todas as cultivares, com exceção da H47, obtiveram incremento positivo quando inoculadas. Esse comportamento sugere que a inoculação possa estar afetando o desenvolvimento dessas cultivares.

A concentração de N na parte aérea variou para cada cultivar e de maneira geral não houve diferença significativa entre os tratamentos, com exceção do capim Llanero que aos 60 e 180 dap apresentou incremento de 40% e 25 %, respectivamente, quando inoculado e o capim Tupi que aos 180 dap obteve resposta negativa a inoculação, com maior concentração de N no tratamento controle.

A variável acúmulo de N na parte aérea, que representa a relação do teor de N e a massa seca produzida por vaso, no geral não apresentou diferença entre os tratamentos nos cortes feitos. Todavia a cultivar Llanero, no primeiro corte aos 60 dap, obteve acúmulo de N nas folhas expressivamente superior (50%), quando submetida à inoculação da estirpe Sp 245 diferindo estatisticamente do tratamento sem inoculação.

Os resultados de produção de massa seca da raiz, acúmulo de massa seca da parte aérea e massa seca total (Tabela 9), não apresentaram diferença entre os tratamentos, sugerindo que a inoculação na estirpe Sp 245 não afetou o desenvolvimento radicular e a produtividade das cultivares de *B. humidicola* testadas. Entretanto, é importante ressaltar que as estratégias de sobrevivência das plantas em déficit de nitrogênio variam de acordo com a espécie e com o metabolismo da planta.

Tabela 9. Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), Teor de N (%) e Acúmulo de N (mg.vaso⁻¹) de quatro cultivares de *B. humidicola* spp. ao longo de quatro cortes sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*.

Genótipos	MSPA (g.vaso ⁻¹)		Teor de N (%)		N acumulado (mg.vaso ⁻¹)	
	Controle	Sp245	Controle	Sp245	Controle	Sp245
60 dias após o plantio						
Comum	16,0	20,1	1,3	1,0	188,4	189,6
Llanero	14,5	21,9	1,0 b	1,4 a	146,9 b	305,4 a
H47	16,1	14,9	0,8	0,8	135,5	119,5
Tupi	9,3	12,3	1,2	1,0	115,3	127,3
C.V. (%)	33,8		27,1		39,9	
120 dias após o plantio						
Comum	16,1	15,9	0,7	0,6	106,9	89,4
Llanero	16,6	17,4	0,5	0,5	84,3	91,7
H47	17,2	14,6	0,6	0,6	97,7	87,9
Tupi	13,1	17,0	0,6	0,6	75,4	100,9
C.V. (%)	22,9		21,5		23,6	
180 dias após o plantio						
Comum	20,1	18,6	0,8	0,7	155,3	117,1
Llanero	20,2	17,8	0,6 b	0,8 a	111,4	138,0
H47	18,0	18,8	0,6	0,6	104,7	119,9
Tupi	15,8	18,0	0,8 a	0,6 b	128,7	108,7
C.V. (%)	31,2		20,5		33,2	
240 dias após o plantio						
Comum	16,6	15,0	0,7	0,7	116,6	107,3
Llanero	17,9	14,1	0,7	0,8	116,2	108,7
H47	12,6	16,0	0,7	0,7	89,8	111,8
Tupi	15,9	14,3	0,7	0,8	108,5	105,4
C.V. (%)	27,9		15,0		26,5	

Média de 5 repetições. C.V.: Coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra a na linha não representam diferença estatística para os efeitos de inoculação pelo teste de Tukey à 5%.

Tabela 10. Produção de massa seca da raiz (MSR), acúmulo de massa seca da parte aérea e massa seca total (MST) de quatro cultivares de *B. humidicola* spp. após 240 dias de plantio sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*.

Genótipos	MSR (g.vaso ⁻¹)		Massa Seca (g.vaso ⁻¹)		MST (g.vaso ⁻¹)	
	Controle	Sp245	Controle	Sp245	Controle	Sp245
Comum	29,4	32,5	68,8	69,5	98,2	102,0
Llanero	103,3	97,6	69,2	71,2	172,5	168,8
H47	64,7	58,5	63,9	64,4	128,7	122,9
Tupi	43,3	36,6	54,1	61,6	97,4	98,2
C.V. (%)	41,7		16,3		20,1	

Média de 5 repetições. C.V.: Coeficiente de variação. MST: somatório da massa seca das raízes e do acúmulo de massa seca da parte aérea. Médias seguidas pela mesma letra a na linha não representam diferença estatística para os efeitos de inoculação pelo teste de Tukey à 5%.

4.1.5. Híbridos de *Brachiaria* spp.

A produção de matéria seca da parte aérea, o teor de N e o acúmulo de N para as cultivares de híbridos de braquiária estão representados na tabela 11. A cultivar Mulato II, no primeiro e terceiro cortes, diferiu estatisticamente entre os tratamentos, com resposta positiva à inoculação apresentando incremento de 37,5% e 37,8%, respectivamente. No segundo corte, aos 120 dap, a cultivar H331 também apresentou diferença entre os tratamentos, com incremento de 29% para a produção de biomassa quando inoculado com a estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*. Nos demais cortes as cultivares não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos, que pode ser explicado devido a elevada variabilidade dos dados, comprovado pelos altos coeficientes de variação.

Tabela 11. Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), Teor de N (%) e Acúmulo de N (mg.vaso⁻¹) de três Híbridos de *Brachiaria* spp. ao longo de quatro cortes sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*.

Genótipos	MSPA (g.vaso ⁻¹)		Teor de N (%)		N acumulado (mg.vaso ⁻¹)	
	Controle	Sp245	Controle	Sp245	Controle	Sp245
60 dias após o plantio						
H331	20,3	20,5	1,1	1,3	236,9	275,0
Mulato I	22,5	16,0	1,2	1,3	278,2	205,9
Mulato II	16,1 b	25,8 a	1,0	1,1	169,3 b	279,9 a
C.V. (%)	33,8		27,1		39,9	
120 dias após o plantio						
H331	11,8 b	16,7 a	0,6	0,7	66,9 b	101,6 a
Mulato I	12,3	16,2	0,6	0,6	78,8	93,9
Mulato II	16,3	12,5	0,6	0,6	92,1	68,9
C.V. (%)	22,9		21,5		23,6	
180 dias após o plantio						
H331	16,4	17,2	0,6	0,6	101,0	102,5
Mulato I	16,3	18,0	0,6	0,6	99,0	111,3
Mulato II	14,4 b	23,0 a	0,7	0,6	104,1	135,8
C.V. (%)	31,2		20,5		33,2	
240 dias após o plantio						
H331	12,8	16,5	0,8	0,7	104,4	113,8
Mulato I	16,0	14,1	0,8	0,7	120,8	99,4
Mulato II	14,3	15,3	0,8	0,7	113,9	102,7
C.V. (%)	27,9		15,0		26,5	

Média de 5 repetições. C.V.: Coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra a na linha não representam diferença estatística para os efeitos de inoculação pelo teste de Tukey à 5%.

A concentração de N na parte aérea das variedades de híbridos de *Brachiaria* não diferiu entre os tratamentos controle e inoculado (Tabela 11). Contudo, o acúmulo de N apresentou incremento positivo à inoculação para as cultivares mulato II e H331 no primeiro e segundo corte, respectivamente.

Dentre os híbridos testados, o Mulato I foi o único que não obteve incremento para inoculação em nenhuma das variáveis analisadas. Na literatura existe um consenso geral de que o genótipo da planta é um fator chave para obtenção dos benefícios propiciados por

bactérias diazotróficas endofíticas (REIS et al., 2000). Miranda et al. (1990), utilizando 24 genótipos de *Panicum maximum*, demonstraram que as plantas diferiam quanto à capacidade de obter nitrogênio pela fixação biológica, provavelmente, devido a diferenças dos genótipos na capacidade de associação com bactérias diazotróficas. Bhattarai e Hess (1998), também observaram que diferentes genótipos de trigo diferiram quanto ao aumento de produtividade propiciado por isolados de bactérias do gênero *Azospirillum* e que os maiores benefícios foram obtidos com genótipo e bactéria oriundos da mesma localidade.

A produção de biomassa radicular variou entre 33,8 g.vaso⁻¹ e 60,2 g.vaso⁻¹. Embora todas as cultivares testadas terem obtido resposta positiva à inoculação, apenas o Mulatto II diferiu significativamente entre os tratamentos, com incremento de 37,8% para o tratamento inoculado (Tabela 12).

A biomassa acumulada ao longo dos quatro cortes apresentou diferença significativa apenas para o Mulatto II, com resposta positiva ao tratamento inoculado e a massa seca total não respondeu de maneira diferenciada entre os tratamentos.

O principal efeito do *Azospirillum brasilense* está, principalmente, na promoção do crescimento radicular das plantas, pela produção de substâncias promotoras de crescimento e Segundo Brasil et al. (2005) plantas de capim braquiária quando inoculadas com esta bactéria, apresentaram produção de massa seca, principalmente do sistema radicular, superior aos tratamentos sem inoculação durante as coletas de 60 e 90 dias.

Tabela 12. Produção de massa seca da raiz (MSR), acúmulo de massa seca da parte aérea e massa seca total (MST) de três Híbridos de *Brachiaria* spp. após 240 dias de plantio sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*.

Genótipos	MSR (g.vaso ⁻¹)		Massa Seca (g.vaso ⁻¹)		MST (g.vaso ⁻¹)	
	Controle	Sp245	Controle	Sp245	Controle	Sp245
H331	42,9	52,1	61,2	70,8	104,1	122,9
Mulatto I	33,8	38,2	67,1	64,2	100,9	102,4
Mulatto II	37,4 b	60,2 a	61,0 b	76,7 a	98,4	114,7
C.V. (%)	41,7		16,3		20,1	

Média de 5 repetições. C.V.: Coeficiente de variação. MST: somatório da massa seca das raízes e do acúmulo de massa seca da parte aérea. Médias seguidas pela mesma letra a na linha não representam diferença estatística para os efeitos de inoculação pelo teste de Tukey à 5%.

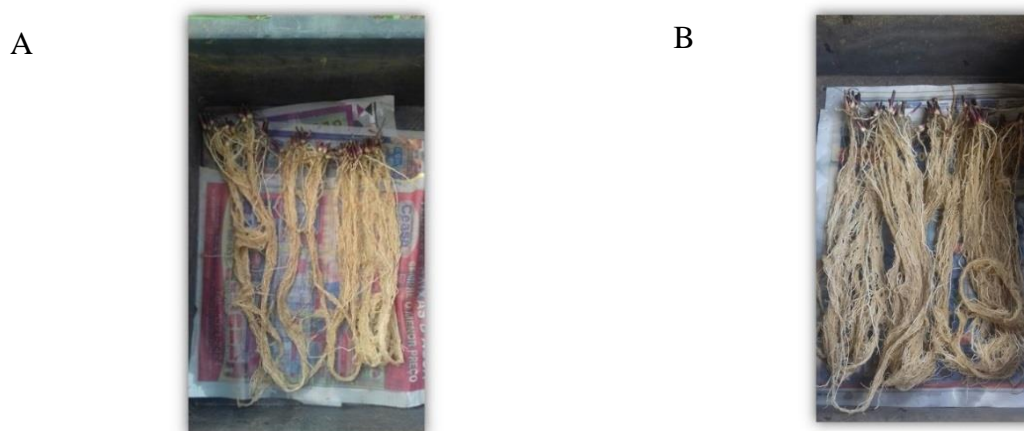


Figura 5. Produção de raízes da cultivar Mulatto II após 240 de semeadura. A parte A da figura representa o tratamento controle sem inoculação e a parte B representa o tratamento com a inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*.

4.2. Efeito da Inoculação de *Azospirillum brasilense* em Sete Genótipos Seleccionados de *Brachiaria*

Um segundo experimento foi conduzido neste trabalho a fim de avaliar os efeitos da inoculação de *Azospirillum brasilense*, estirpe Sp 245, em sete genótipos de braquiária seleccionados dentre os quatorze utilizados no experimento anterior. A finalidade deste experimento foi conhecer os benefícios da inoculação após 30 dias de cultivo e ratificar os resultados adquiridos previamente.

4.2.1. Produção de matéria seca da parte aérea

Para a variável produção de massa seca da parte aérea, foi possível observar que os genótipos *B. decumbens* cv. Basilisk e o híbrido Mulato II obtiveram maior biomassa dentre os genótipos testados. Em seguida as cultivares *B. humidicola* cv. Llanero e *B. brizantha* cv. Paiaguás, apresentaram produção mediana e os capins Marandú, B140 e Ruzizensis valores mais baixos para esta variável (Tabela 12).

As médias gerais da produção de massa seca da parte aérea apresentou diferença significativa e o tratamento com inoculação de *Azospirillum brasilense* obteve desempenho 18,8% superior quando comparado à ausência de inoculação (Tabela 12).

Ao analisarmos os tratamentos dentro de cada genótipo observamos que os capins B140, Ruzizensis e Mulato II obtiveram diferença significativa com incremento de, respectivamente, 50%, 40% e 19% quando inoculados. Apesar de não haver diferença, as cultivares Paiaguás, Marandú e Llanero também demonstraram incremento positivo para o tratamento com inoculação. Em contrapartida a cultivar Basilisk não respondeu positivamente à inoculação.

O capim Marandú (*B. brizantha* cv. Marandú), neste estudo, não apresentou desenvolvimento satisfatório pois, na época do experimento, as sementes desta cultivar apresentaram dificuldade de germinação e presença de fungos nos primeiros dias o que pode ter afetado a interação com a estirpe inoculada e interferido diretamente nos resultados obtidos. Sendo assim são necessários mais estudos para definição do melhor método de esterilização das sementes e a realização de novos testes de inoculação.

A espécie *Azospirillum brasilense* se destaca por apresentar maior variedade de estudos, uma vez que está bactéria apresenta resultados satisfatórios quando associados a plantas da família Poaceae, estudos mostram que o uso desta bactéria associada a pequenas doses de nitrogênio tem demonstrado alta eficácia tanto em relação a aspectos morfológicos quanto em produtividade, com resultados semelhantes a tratamentos com altas doses deste nutriente (VOGEL et al., 2013). Kuss (2006), relata que o uso desta bactéria auxilia em um aumento na produção de 12% a 14% quando comparado à ausência da inoculação desta espécie de bactéria.

Para a produção de biomassa radicular o genótipo Mulato II apresentou maior massa dentre as cultivares em estudo. Em seguida o capim Basilisk, Llanero, Paiaguás demonstraram biomassa mediana e o capim Marandú e Ruzizensis valores mais baixos (Tabela 12).

Não foi detectada diferença significativa entre os tratamentos para produção de massa seca de raiz, o que pode ser explicado devido a elevada variabilidade dos dados evidenciado pelo coeficiente de variação (31,4%). Todavia, todas as cultivares testadas apresentaram incremento positivo quando inoculadas. Para a média geral houve diferença significativa, onde o tratamento com inoculação de *Azospirillum brasilense* promoveu aumento de 20% quando comparado à ausência da bactéria, demonstrando que a inoculação se destaca como uma alternativa promissora para utilização em pastagens. Okon e Vanderleyden (1997) acentuam que o desempenho com a *Azospirillum brasilense* além de promover a fixação do

nitrogênio atmosférico, aumenta a superfície de absorção das raízes da planta e, conseqüentemente, o aumento do volume de nitrogênio do solo explorado.

Para a variável teor de N na parte aérea, os genótipos Llanero e Mulato II diferiram de forma significativa entre os tratamentos apresentando resposta negativa à inoculação. O capim ruziziensis apresentou incremento positivo quando inoculado diferindo estatisticamente entre o controle sem inoculação e a inoculação da estirpe Sp 245 (Tabela 13). A média geral diferiu entre os tratamentos com e sem inoculação com incremento positivo para o tratamento controle sem inoculação.

Os resultados descritos neste trabalho corroboram com Oliveira et al. (2007), que ao avaliarem a produção de forragem e qualidade se *B. brizantha* cv. Marandú com *Azospirillum brasilense* e fertilizada com nitrogênio não encontraram efeito da inoculação sobre o teor de N na parte aérea.

Os valores do acúmulo de N na parte aérea das cultivares testadas estão apresentados na Tabela 13. Apenas as cultivares B140 e ruziziensis apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, com incremento de 45% e 65%, respectivamente, quando inoculadas com *Azospirillum brasilense*. A média geral para esta variável apresentou diferença entre os tratamentos com acúmulo de N 12% superior quando inoculado.

Tabela 13. Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), teor de N (%) e acúmulo de N (mg.vaso⁻¹) de sete genótipos de *Brachiaria* spp. após 30 dias de plantio sob efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*.

Genótipos	MSPA (g.vaso ⁻¹)		MSR (g.vaso ⁻¹)		Teor N (%)		N acumulado (mg.vaso ⁻¹)	
	Control e	Sp24 5	Control e	Sp24 5	Control e	Sp24 5	Controle	Sp245
B140	4,1 b	8,2 a	3,2	3,9	3,9	3,5	154,6 b	281,9 a
Basilisk	15,8	15,1	10,5	12,5	2,4	2,1	383,5	312,3
Llanero	12,2	14,3	5,7	8,7	2,9 a	2,2 b	349,3	309,1
Marandú	3,9	5,2	2,8	4,3	4,1	3,7	160,3	187,9
Mulatto II	13,6 b	16,8 a	15,0	16,1	2,7 a	2,2 b	366,7	381,5
Paiáguas	11,4	13,1	6,2	6,6	2,8	2,4	314,7	316,0
Ruziziensis	5,4 b	9,1 a	3,1	6,2	1,9 b	3,3 a	102,5 b	295,4 a
Média	9,5 b	11,7 a	6,6 b	8,3 a	3,0 a	2,8 b	261,7 b	297,7 a
Geral								
C.V. (%)	19,95		31,4		11,4		19,3	

Média de 5 repetições. C.V.: Coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra a na linha não representam diferença estatística para os efeitos de inoculação pelo teste de Tukey à 5%

Apesar dos dados, de maneira geral, não apresentarem diferença significativa, é possível observar que a inoculação da estirpe Sp245 de *Azospirillum brasilense* contribuiu para um melhor desenvolvimento das cultivares testadas, com destaque para as cultivares B140, Mulato II e Ruziziensis que obtiveram resultados promissores no que tange à inoculação desta estirpe. Embora os resultados de inoculação de *Azospirillum brasilense* sejam promissores, ainda há a necessidade de novas pesquisas que demonstrem sua viabilidade.

4.3. Contribuição da Fixação Biológica de N₂ em Sete Genótipos de *Brachiaria* Avaliados Através da Técnica de Abundância Natural de ¹⁵N (δ¹⁵N)

Em relação a avaliação dos dados da abundância natural de ¹⁵N (δ¹⁵N) para a quantificação da contribuição da FBN obtidos aos 60 dias após o plantio (Tabela 14), o capim *B. brizantha* cv. Marandú destacou-se dentre os demais genótipos testados. Nessa cultivar a associação com *Azospirillum brasilense* foi responsável 29% do N-total acumulado pelas plantas. É importante destacar também que, com exceção da *B. decumbens* cv. Basilisk, todos os genótipos apresentaram um valor de FBN em torno de 15%. Já aos 180 dias após o plantio pode-se observar que os valores variaram de 2,8% a 32,7% (Tabela 14), sendo que neste corte o capim *B. decumbens* cv. Basilisk e o híbrido H331 destacaram-se com valor de FBN de 32%.

Houve uma diferença para a contribuição da FBN entre os dois cortes e os valores δ¹⁵N foi menor aos 180 dap. Visto que não foi adicionado adubo nitrogenado ao solo durante o experimento essa diferença justifica-se uma vez que a FBN pode ser estimulada em áreas degradadas e em solos ou substratos pobres. Boddey e Döbereiner (1988) relatam que a ocorrência de alta disponibilidade de N no solo ocasiona baixa contribuição ou desempenho da FBN em poáceas. A FBN é um processo regulado pela necessidade do ambiente e das espécies fixadoras, pois, a enzima nitrogenase, responsável pela redução do N² é inativada, quando submetida a presença de amônio (RUDNIK et al., 1997). Em áreas não perturbadas, com vegetação clímax, esse processo biológico é pouco estimulado, pois a ciclagem eficiente garante a manutenção do metabolismo e da taxa de crescimento. Já em áreas degradadas em solos e substratos pobres ou desprovidos de matéria orgânica como os de áreas mineradas, a FBN pode ser estimulada (MOREIRA et al., 2010).

Tabela 14. Contribuição do percentual da fixação biológica de nitrogênio (%FBN) estimada pela técnica de abundância natural de ¹⁵N (δ¹⁵N), em sete cultivares de *Brachiaria* em duas épocas de corte, 60 e 180 dias após o plantio.

Genótipos	δ15 (60dap)		FBN (%)	δ15 (180dap)		FBN (%)
	Controle	Sp 245	-	Controle	Sp 245	-
B140	9,4 b	7,7 a*	18,2	7,0	5,8	16,8
Basilisk	8,1	8,0	1,3	5,8	3,9	32,7
H331	8,6	7,3	15,3	6,2	4,2	32,5
Paiaguás	9,0	6,4 a*	14,8	5,1	5,0	2,8
Mulato II	7,7	6,5	16,4	5,6	4,5	18,2
Marandú	8,0	7,2	29,1	5,1	4,4	13,6
Ruziensiis	9,0 b	6,4 a*	20,2	4,8	3,7	23,6
Média Geral	8,5	7,1*	16,5	5,6	4,5*	20,0
C.V (%)	12,8			25,2		

Médias seguidas por * representa diferença estatística para os efeitos de inoculação pelo teste de Scott-Knott à 5%. Média de três repetições. CV (%) dos 60 e 180 dap, respectivamente, 12,8 e 25,2.

Vogel et al, (2010) mostraram que a inoculação de *Azospirillum brasilense* em pastagens forneceu um incremento de aproximadamente 40 Kg N ha⁻¹ ano⁻¹ advindos da contribuição de FBN em estudos realizados com as espécies *Pennisetum americanum* e *Panicum maximum*. Franche et al., (2009) observa que a FBN contribui de 7 a 10 Kg ha⁻¹ mês⁻¹

¹ durante a época de verão, o que varia conforme o genótipo, sendo que 39% do N necessário poderia ser obtido via fixação biológica.

Experimentos conduzidos pelo método de incorporação do ¹⁵N confirmaram que várias gramíneas tropicais se beneficiam de nitrogênio fixado biologicamente (DE-POLLI, 1975; RUSCHEL, 1975; DE-POLLI et al., 1977). Estimativas da FBN em gramíneas como *Brachiaria decumbens* e *B. humidicola*, as quais são muito utilizadas para a revegetação de áreas degradadas, indicam valores de 30 a 45 Kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N, respectivamente advindo da FBN (BODDEY e VICTORIA, 1986). Isto exemplifica a contribuição da associação gramínea-diazotróficos, na incorporação de N no solo e reforça a importância da FBN na recuperação de áreas degradadas.

Pereira et al. (1981) já haviam demonstrado que diferentes espécies de *Brachiaria* parecem receber contribuições via FBN de forma diferenciada. Esses autores estudaram quatro espécies de braquiária e suas análises de redução de acetileno (atividade da nitrogenase) mostraram diferenças entre essas espécies, *B. ruziziensis* apresentando maior atividade da nitrogenase quando comparada à *B. brizantha*, *B. radicans* e *B. mutica*. Nos estudos feitos por Boddey e Victoria (1986), em que foi utilizado o método de diluição isotópica de ¹⁵N, os autores demonstraram que as espécies *B. decumbens* e *B. humidicola* receberam uma quantidade de N via FBN significativamente superior àquela apresentada por *B. radicans* e *B. ruziziensis*.

Quesada (2001), utilizando a técnica de abundância natural de ¹⁵N ($\delta^{15}\text{N}$), em experimentos de campo, apresentou resultados em que a FBN, associada a *Pennisetum purpureum*, foi capaz de contribuir com até 57% do N acumulado pela planta, demonstrando ser possível alcançar grandes produções sem a aplicação de fertilizante nitrogenado.

A eficiência das bactérias associativas não pode ser comparada a das simbioses rizóbio-leguminosas. Isto se deve ao fato que mesmo as bactérias associativas estando localizadas no interior das plantas, não há evidências de relação tão complexa e organizada quanto à presente nas simbioses de bactérias nodulíferas com leguminosas que é resultante de um processo muito mais evoluído que minimiza perdas do nitrogênio fixado por interferência de fatores químicos, físicos e biológicos que interagem na complexidade, heterogeneidade e dinâmica do sistema edáfico. Contudo, a contribuição de N fixado para gramíneas estão em torno de 25 a 50 Kg N/ha/ano o que equivale ao suprimento médio de cerca de 17% das demandas das culturas. Considerando a importância que as espécies produtoras de grãos, como trigo, arroz e milho, e o alto potencial fotossintético das gramíneas C4 nos trópicos, esta taxa de FBN, mesmo baixa representa uma grande economia nos custos de produção o que justifica estudos visando seu manejo (MOREIRA et al., 2010). Para as braquiárias, embora os estudos tenham mostrado que as contribuições da FBN não ultrapassaram 30% a 40% do N acumulado pelas plantas, é possível que, para sistemas de manejo mais extensivos, em que as vias de perdas são menos significativas, a quantidade de N fixado seja suficiente para proporcionar um balanço nulo ou até mesmo positivo de N para o sistema solo-planta. Permitindo maior longevidade da pastagem com uma boa produtividade em um sistema mais sustentável (REIS JÚNIOR et al., 2002).

4.4. Caracterização Morfológica do Sistema Radicular de Três Genótipos de *Brachiaria* sob os Efeitos da Inoculação da Estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*

Os resultados do efeito da inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* sob as características morfológicas do sistema radicular da *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II estão descritos na Tabela 15 e representados nas Figuras 6 a 13. Foram analisadas as variáveis: comprimento radicular (Cp); bifurcações (Bf); pontas (Pt); volume de raiz (Vol); razão entre o comprimento e o volume radicular (Cp/Vol);

área projetada (Ap); área de superfície ou superfície de contato (As) e diâmetro médio das raízes (Dm).

Houve diferença entre a média geral dos tratamentos para todas as características analisadas, com exceção das pontas e do diâmetro médio. As raízes apresentaram desempenho melhor quando inoculadas com a estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* em comparação ao tratamento controle sem inoculação.

A *B. decumbens* cv. Basilisk se destacou dentre os demais genótipos testados apresentando maior desenvolvimento das raízes para todas as variáveis analisadas, com exceção do diâmetro médio que foi menor que o das outras cultivares. O híbrido Mulato II apresentou crescimento mediano em relação aos genótipos testados e a *B. brizantha* cv. Marandú obteve valores menores, com exceção do diâmetro médio das raízes onde os valores foram maiores que o do capim Basilisk. As sementes do capim Marandú apresentaram dificuldade de germinação além da presença de fungos que podem ter interferido no estabelecimento da planta e na interação com a bactéria inoculada (Tabela 15).

Tabela 15. Efeitos da inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* sob o desenvolvimento inicial das raízes de três genótipos de *Brachiaria*.

Genótipo	Inoculação	Cp (cm)	Bf (und)	Pontas (und)	Vol (cm ³)	Cp/Vol (cm/m ³)	Ap (cm ²)	As (cm ²)	Dm (mm)
Basilisk	Não	1037 b	3717 b	2604 b	0,5 b	1037 b	25 b	79 b	0,2
	Sim	1675 a	8676 a	3532 b	0,8 a	1675 a	42 a	133 a	0,2
Marandú	Não	374	1191b	1093	0,2	374	11	34	0,3
	Sim	494	1655 b	1455	0,3	494	13	43	0,3
Mulato II	Não	592	2131 b	2002	0,4 b	592	18	56	0,3
	Sim	826	3373 b	1748	0,6 a	826	25	80	0,3
CV (%)		23,31	31,16	37,06	22,87	23,31	23,31	23,13	6,26

Cp = comprimento radicular; Cr = cruzamentos; Bf = bifurcações; Pt = pontas; Vol = volume radicular; Cp/Vol = razão entre o comprimento e volume radiculares; Ap = área projetada; As = área de superfície; Dm = diâmetro médio das raízes. Incremento (%) = diferença, em porcentagem, entre a médias do tratamento inoculado com *Azospirillum brasilense* e sem inoculação. Médias seguidas por letras diferentes na coluna representam diferença estatística para os efeitos de inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* pelo teste de Tukey à 5%.

As características radiculares variaram para cada genótipo. No comprimento das raízes (Cp), número de bifurcações (Bf), razão entre comprimento e volume radicular (Cp/Vol), área projetada (Ap) e área de superfície (As) apenas o capim Basilisk diferiu estatisticamente entre os tratamentos. Contudo, as três cultivares no tratamento com inoculação, apresentaram desempenho superior com incremento positivo quando comparado ao tratamento controle sem inoculação.

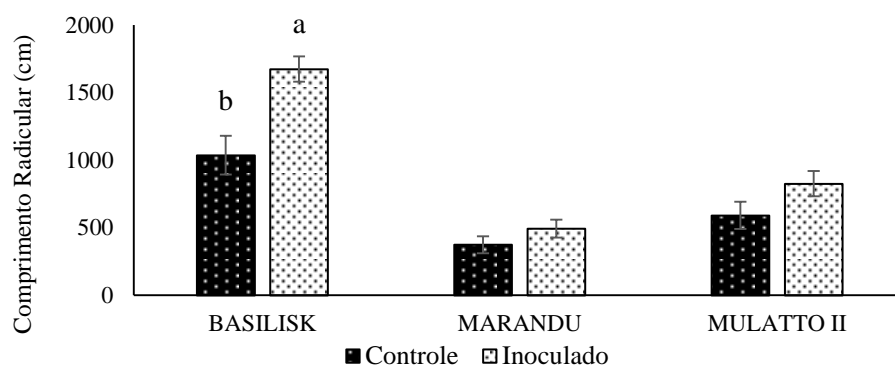


Figura 6. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* no comprimento radicular da *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II após 15 dias de plantio. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes representam diferença estatística para os efeitos de inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* pelo teste de Tukey à 5%.

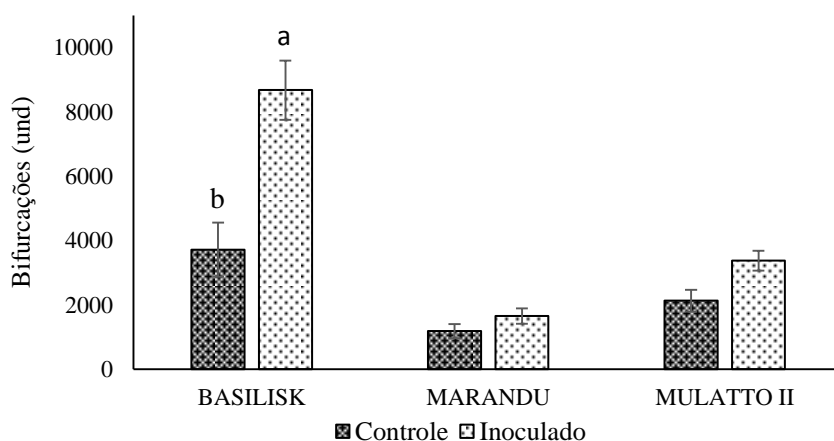


Figura 7. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* no número de bifurcações radiculares da *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II após 15 dias de plantio. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes representam diferença estatística para os efeitos de inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* pelo teste de Tukey à 5%.

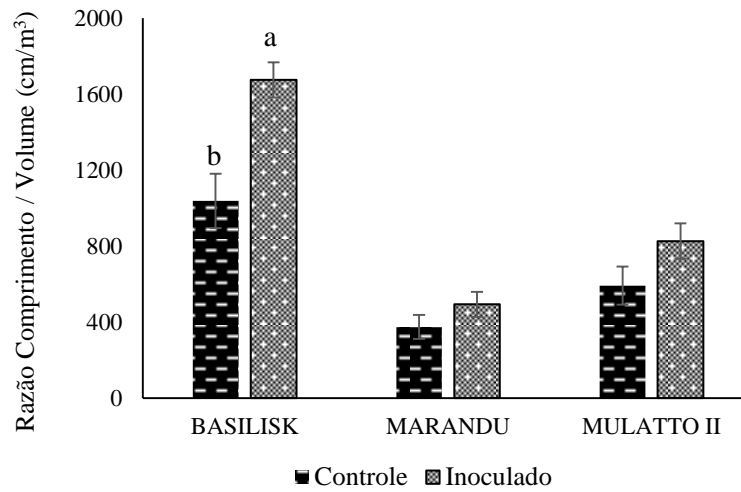


Figura 8. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* na razão entre comprimento e volume radicular da *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II após 15 dias de plantio. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes representam diferença estatística para os efeitos de inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* pelo teste de Tukey à 5%.

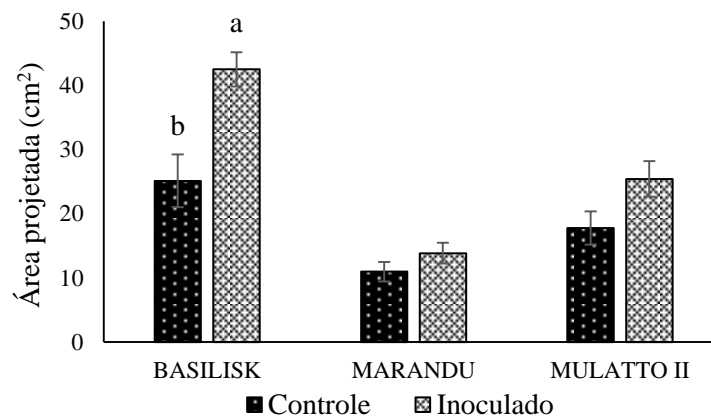


Figura 9. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* na área radicular projetada da *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II após 15 dias de plantio. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes representam diferença estatística para os efeitos de inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* pelo teste de Tukey à 5%.

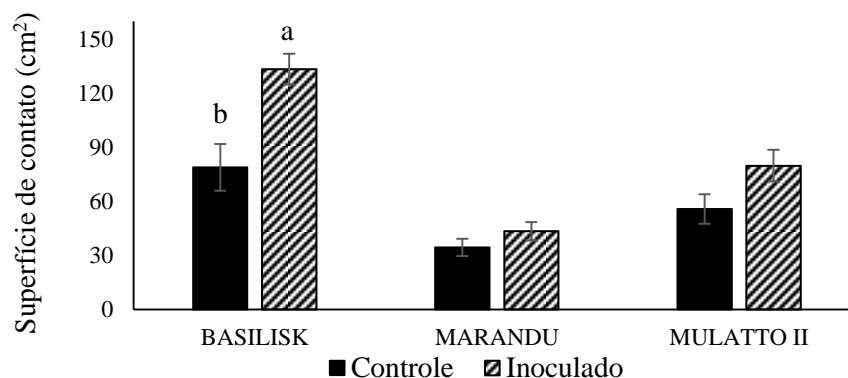


Figura 10. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* na área de superfície ou superfície de contato radicular da *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II após 15 dias de plantio. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes representam diferença estatística para os efeitos de inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* pelo teste de Tukey à 5%.

Para a variável número de pontas o híbrido Mulato II foi o único que não obteve incremento positivo quando inoculado (-14,5%). Já o capim Basilisk e Marandú apresentaram incremento de 26,3% e 24,9%, respectivamente, para a inoculação (Figura 11). O diâmetro médio das raízes variou de 0,24mm a 0,31mm e apesar de não haver diferença, todos os genótipos testados obtiveram incremento positivo para inoculação da estirpe Sp 245 (Figura 12).

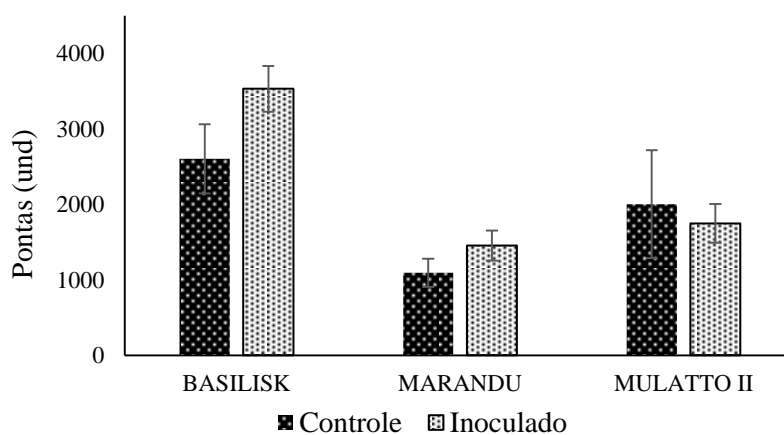


Figura 11. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* estirpe Sp 245 no número de pontas radiculares da *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II após 15 dias de plantio.

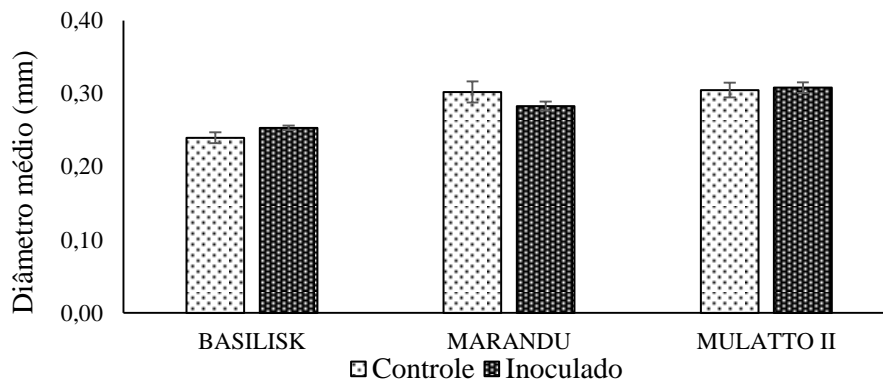


Figura 12. Efeito da inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* no diâmetro médio das raízes de *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II após 15 dias de plantio.

Okon e Vanderleyden (1997) salientam que, além da fixação biológica de nitrogênio, essas bactérias auxiliam no aumento da superfície de absorção das raízes da planta e, conseqüentemente, no aumento do volume de substrato de solo explorado. Tal constatação é justificada pelo fato de a inoculação modificar a morfologia do sistema radicular, aumentando não apenas o número de radículas, mas também o diâmetro das raízes laterais e adventícias.

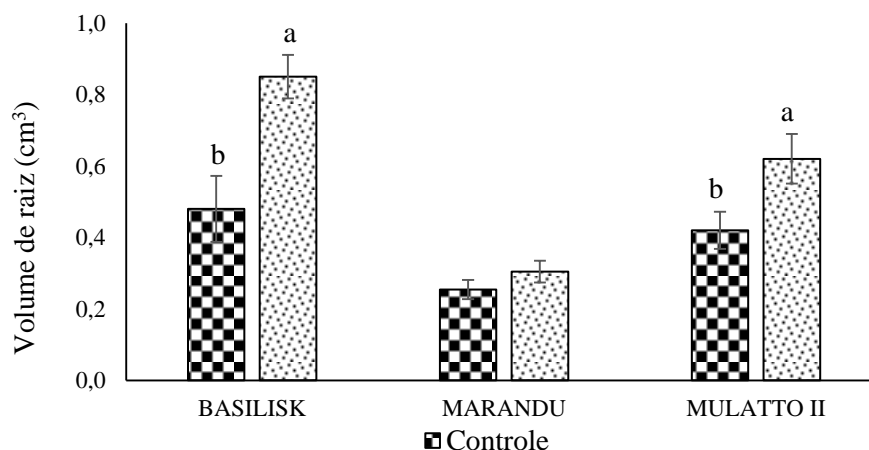


Figura 13. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* volume radicular da *B. decumben* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e o híbrido Mulato II após 15 dias de plantio. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes representam diferença estatística para os efeitos de inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* pelo teste de Tukey à 5%.

O volume das raízes no tratamento com a inoculação de *Azospirillum brasilense* foi maior nos três genótipos apresentando incremento de 43,4 %, 16,5% e 31,8% para Basilisk, Marandú e Mulato II, respectivamente. Nesta variável apenas o capim Marandú não diferiu estatisticamente entre os tratamentos (Figura 13). Segundo Brasil et al. (2005) plantas de capim braquiária quando inoculadas com esta bactéria, apresentaram produção de massa seca, principalmente do sistema radicular, superior aos tratamentos sem inoculação durante as coletas de 60 e 90 dias. Magalhães et al. (2011b) relata benefícios similares em pastagens *Brachiaria brizantha*, onde esta apresentou maior produção de massa seca raiz se comparada a plantas com a ausência da bactéria.

Existe concordância na literatura de que as vantagens da associação de plantas com *Azospirillum* são mais relacionados à promoção do desenvolvimento vegetal, principalmente do sistema radicular, do que à fixação biológica de nitrogênio, embora haja inúmeros relatos que apontam para a viabilidade desse processo de fixação de N. Segundo Reis Júnior et al. (2008), os usos dessas bactérias auxiliam na produção de hormônios que estimulam o crescimento vegetal, dentre eles auxina, citocinina e giberilina. A elevada produção de auxinas, que é o hormônio responsável por modificações morfológicas nas raízes como, comprimento, ramificações e aumento de pelos radiculares, contribuem para um melhor desenvolvimento radicular e conseqüentemente implicam em uma série de fatores, dentre eles o aumento na absorção de água e sais minerais e a tolerância a estresses climáticos, o que resulta em plantas saudáveis (DOBBELAERE et al., 1999; MIYAUCHI et al., 2008).

Os resultados encontrados neste estudo corroboram com Zaad et al. (1994) e Itzigsohn et al. (2000) que em seus trabalhos mostraram que a inoculação de *Azospirillum* em pastagens tem potencial para se tornar uma técnica aplicável a esses sistemas em condições de déficit hídrico, ou baixa fertilidade ou ambas, graças ao efeito hormonal que promove a expansão do sistema radicular e a FBN.

A Figura 14 apresenta as imagens do sistema radicular dos três genótipos testados obtidas através do software Winrhizo. As imagens A, B e C são raízes de *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e do híbrido Mulato II, respectivamente, sem inoculação de *Azospirillum brasilense*. As raízes de *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e do híbrido Mulato II com a inoculação de *Azospirillum brasilense* estão apresentadas nas imagens D, E e F, respectivamente. É possível observar maior volume de raízes no tratamento com inoculação da bactéria diazotróficas.

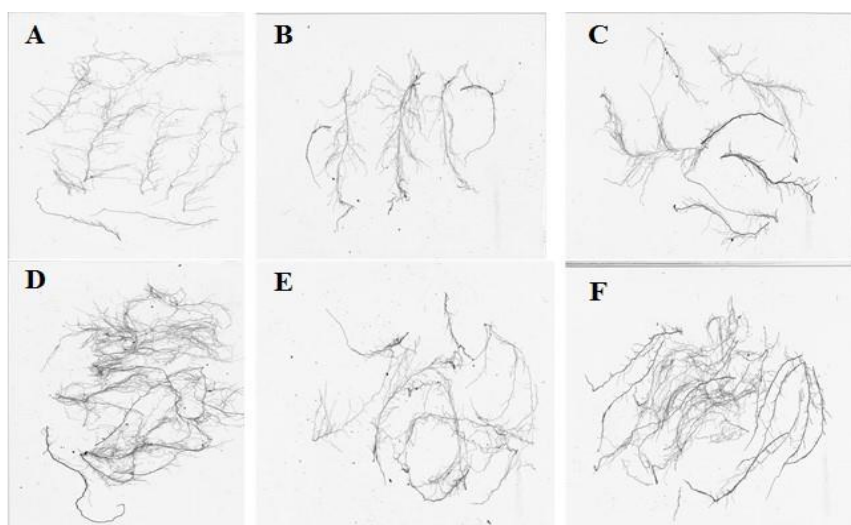


Figura 14. Imagens das raízes de *Brachiaria* após 15 dias de plantio obtidas através do software WinRhizo. A, B e C representam raízes de *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e do híbrido Mulato II sem inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*, respectivamente. D, E e F representam raízes de *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandú e do híbrido Mulato II com a inoculação da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*, respectivamente.

4.5. Interação Entre a Estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* e a *B. decumbens* cv. Basilisk e o Híbrido Mulato II de *Brachiaria* Analisada com o Uso de Gene Repórter GFP

Foi utilizada a bactéria marcada com a proteína fluorescente para observar a colonização da estirpe Sp 245 de *A. brasilense* na raiz de *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk e do híbrido Mulato II. O gene repórter GFP foi usado para visualizar bactérias aderidas às raízes das plantas. Na Figura 15 é possível observar um aglomerado de células da estirpe Sp 245 de *A. brasilense* aderido nas raízes de braquiária.

Uma vez dentro da planta, as bactérias diazotróficas endofíticas estão localizadas principalmente nos espaços intercelulares (Figura 15), entre as células do córtex das raízes, na região de alongamento, entretanto algumas bactérias também podem colonizar as plantas intracelularmente, estando presentes nas células do córtex e com menor frequência nos vasos condutores do xilema. Em plantas de cana-de-açúcar, Dong et al. (1994) observaram que a colonização por *Gluconacetobacter diazotrophicus* ocorre nos espaços intercelulares, ricos em sucrose e com pH ácido, sugerindo que a localização da bactéria na planta está relacionada ao seu requerimento nutricional.

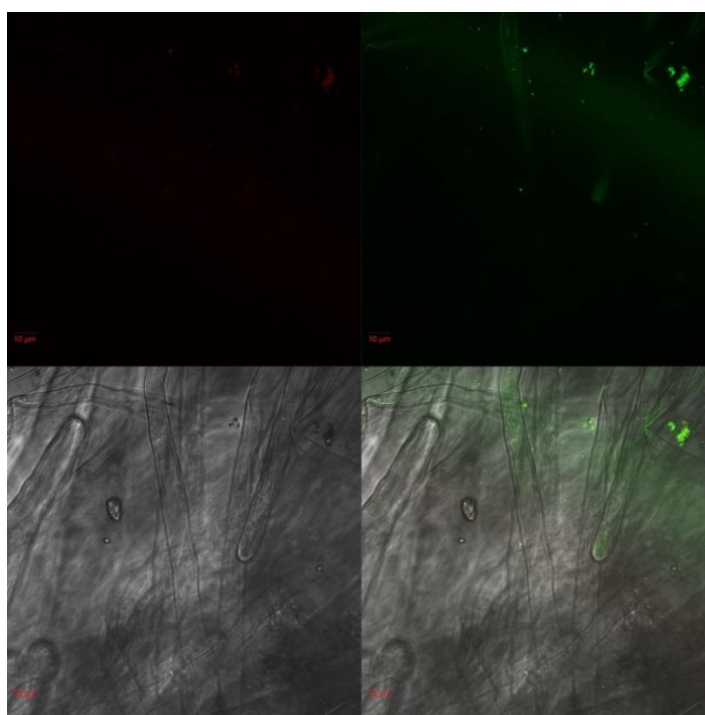


Figura 15. Imagens de microscopia visualizadas em microscópio de fluorescência com aumento de 400x utilizando um fotomicroscópio ZEN 2012 SPI (Black edition). Hibridização fluorescente in situ de raízes de braquiária após 10 dias de inoculação com a estirpe Sp 245 de *A. brasilense*. A amostra foi visualizada nos comprimentos de onda de 488 nm para a fluorescência verde-autofluorescência da clorofila. A figura mostra a raiz da cultivar Mulato II.

Para as raízes de *Brachiaria* na região entre o colo do caule e a zona de ramificação das raízes foi possível visualizar maior número de aglomerados de células da estirpe Sp 245 marcada com gfp. Esses resultados divergem dos que foram encontrados por Assmus et al. (1995), onde em análises pela técnica de FISH de *A. brasilense* colonizando raízes de trigo cultivado em solo revelaram que esta espécie forma microcolônias ou agregados, mostrando preferência por pelos radiculares e região de alongação da raiz.

Os resultados mostraram que a técnica GFP é valiosa para monitorar *A. brasilense* durante a colonização de *Brachiaria*, sendo possível observar a distribuição espacial das

bactérias diretamente na raiz e confirmar o estabelecimento das bactérias inoculadas nas sementes.

5. CONCLUSÕES

O híbrido Mulatto II se destacou dentre as cultivares testadas, apresentando maior acúmulo de massa seca e maior desenvolvimento radicular quando inoculado com a estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense*.

As cultivares Basilisk, Marandú e Mulatto II obtiveram melhora nas características morfológicas do sistema radicular quando inoculadas com *Azospirillum brasilense*.

A contribuição da FBN variou para cada genótipo e em função da época de corte. A inoculação da estirpe Sp 245 foi capaz de contribuir com até 16% aos 60 dias de semeadura e 20% aos 180 dias, do N acumulado pela planta através da FBN;

O uso da estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* marcada com a proteína verde fluorescente (GFP) permitiu confirmar o estabelecimento desta estirpe nos espaços intercelulares das raízes do híbrido Mulatto II e da *B. decumbens* cv. Basilisk, após dez dias de inoculação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification an in situ detection of individual cells without cultivation. **Microbial Reviews**, v. 59, n.1, p.143-169, 1995.
- AMANN, R.; LUDWIG, W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology FEMS. **Microbiology Reviews**, v. 24, p. 555–565, 2001.
- ARGEL, M.; PEDRO, J.; MILES, J. W.; GARCÍA, G.; DAVID, J.; CUADRADO CAPELLA, H.; LASCANO, C. E. **Cultivar mulato II (Brachiaria híbrido CIAT 36087): Gramínea de alta qualidade e produção forrageira, resistentes as cigarrinhas e adaptada a solos tropicais ácidos**. CIAT, 2007.
- ASSMUS, B.; HUTZLER, P.; KIRCHHOF, G.; AMANN, R.; LAWRENCE, J. R. and HARTMANN, A. (1995), *In situ* localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. **Appl. Environ Microb**, v, 61, p.1013-1019, 1995.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, R.S.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legumes plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v .29, p.922-928, 1997.
- BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 12, n. 4, p. 433-439, 1980.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomoas rubusubalbicas*. **Symbiosis**, v.13, p.65-73, 1992.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M.J.A.M.; DÖBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **Anais da Academia Brasileira de Ciência** v.56, p.365, 1992.
- 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.
- BARASSI, C.A.; SUELDO, R.J.; CREUS, C.M.; CARROZZI, L.E.; CASANOVAS, W.M.; PEREYRA, M.A. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizer el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología. p. 49-59, 2008.
- BATISTA, K.; MONTEIRO, F.A. Nitrogen and sulphur in marandu grass: relationship between supply and concentration in leaf tissues. Nitrogênio e enxofre no capim-marandu: relação entre suprimento e concentração nos tecidos foliares. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 1, p. 44-51, 2007.

BATISTA, K.; MONTEIRO, F.A. Respostas morfológicas e produtivas do capim-marandu adubado com doses combinadas de nitrogênio e enxofre. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1281-1288, 2006.

BAZZICALUPO, M.; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G.; NEWTON, W. E., (Org.). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 409-410, 2000.

BASHAN, Y.; BUSTILLOS, J.J.; LEYVA, L.A. HERNANDEZ, J. P.; BACILIO, M. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. **Biology and Fertility of Soils**, v.42, p.279-285, 2006

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p. 103- 121, 1997.

BAUHUS, J; MESSIER, C. Evaluation of fine root length and diameter measurements obtained using RHIZO image analysis. **Agronomy Journal**, v. 91, n. 1, p. 142-147, 1999.

BHATTARAI, T.; HESS, D. Growth and yield responses of a Nepalese spring wheat cultivar to the inoculation with Nepalese *Azospirillum* spp. at various levels of N fertilization. **Biol. Fertil. Soils**, v. 26, n. 1, p. 72-77, 1997.

BELING, R.R. (Ed.) **Anuário brasileiro da pecuária**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, p. 128, 2013.

BODDEY, R. M.; BODDEY, L. H.; URQUIAGA, S. **A técnica de redução de acetileno na medição da fixação biológica de nitrogênio**. Editora Universidade Rural; EMBRAPA-CNPBS, 1990.

BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P.; MACEDO, M. O.; OLIVEIRA, O. C.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Potential of carbon Atlantic forest region Brazil. In: LAL, R.; CERRI, C.C.; BERNOUX, M.; ETCHEVERS, J.; CERRI, E. (Org.). **Carbon sequestration in soil of Latin American**. The Haworth Press. Binghamton: New York, p. 305-347, 2006.

BODDEY, R.M.; ALVES, B.J.R.; OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S. A degradação das pastagens e o ciclo do nitrogênio. In: Anais do Workshop Nitrogênio na sustentabilidade de sistemas intensivos de produção agropecuária, Embrapa Agropecuária Oeste, **Documentos 26 EmbrapaAgrobiologia**, Documentos, p. 128, 110-124, 2000.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. M. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, p. 139-149, 2003.

BODDEY, R. M.; RAO, I. M.; THOMAS, R. J. **Nutrient cycling and environmental impact of *Brachiaria* pasture**. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do [Ed.]. ***Brachiaria: biology, agronomy and improvement***. Cali: CIAT; Brasília, DF: EMBRAPA-CNPBG, p. 72-86, 1996.

BODDEY, R.M.; VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ¹⁵N labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**. v. 90, p.265-292, 1986.

BODDEY, R.M.; KNOWLES, R. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. **Critical reviews in plant sciences**, v. 6, n. 3, p. 209-266, 1987.

BODDEY, R.M.; DOBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. **Plant and soil**, v. 108, n. 1, p. 53-65, 1988.

BOGDAN, A.V. **Tropical pasture and fodder plants**. New York, Longman, 475p, 1977.

BOUMA, TJEERD J.; NIELSEN, KAI L.; KOUTSTAAL, B. A. S. Sample preparation and scanning protocol for computerised analysis of root length and diameter. **Plant and soil**, v. 218, n. 1, p. 185-196, 2000.

BONFIM-DA-SILVA, E.M. **Nitrogênio e enxofre na recuperação de capim-braquiária em degradação em neossolo quartzarênico com expressiva matéria orgânica**. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 123 f, 2005.

BRASIL, M. da S.; BALDANI, V. L. D.; MANHÃES SOUTO, S. Efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas forrageiras do Pantanal. **Pasturas Tropicais**, v. 27, n. 3, p. 22-33, 2005.

CANTARUTTI, R. B.; ALVARES V. V.H.; RIBEIRO, A. C.; GUIMARAES, P.T.G.; ALVAREZ, V.H. (Ed.). **Amostragem do solo. In: Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5º Aproximação**. Viçosa: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais. p. 13-20, 1999.

CAMPOS, B. H. C.; THEISEN, S.; GNATTA, V. Avaliação de inoculação graminante na cultura do milho. **Ciência Rural**, Santa Maria - RS, v. 30, n. 4 p. 713-715, 2000.

CATTELAN, A. J.; HARTEL, P. G.; FUHRMANN, J. J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Science Society of America Journal**, v. 63, n. 6, p. 1670-1680, 1999.

CATTELAN, A. J. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. **EMBRAPA/Soja**. Londrina, p. 36, 1999.

COSTA, N. L. Curva de crescimento e composição química da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em Rondônia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. **Anais**. Brasília, DF: SBZ, p. 38-40, 1995.

COSTA, R. L. D.; MARINI, A.; TANAKA, D.; BERNDT, A.; ANDRADE, F. M. E. Um caso de intoxicação de bovinos por *enterolobium contortisiliquum* (Timboril) no Brasil. **Archivos de Zootecnia**, v. 58, n. 222, jun., 2009.

COSTA, K. A. P.; OLIVEIRA, I. P.; FAQUIN, V.; NEVES, B. P.; RODRIGUES, C.; SAMPAIO, F. M. T. Intervalo de corte na produção de massa seca e composição químico-bromatológica da *Brachiaria brizantha* cv. MG-5. **Ciência Agrotécnica**, v. 31, n. 4, p. 1197-1202, 2007.

COSTA, N. de L.; MAGALHÃES, J. A.; TOWNSEND, C. R. **Desempenho agrônomo de genótipos de *Brachiaria humidicola* em diferentes idades de corte.** In: ZOOTECA, 2003, Anais. Uberaba: ABZ/FAZU/ABCZ, p. 324-327, 2003.

COSTA, C.; DWYER, L.M.; HAMEL, C.; MUAMBA, D.; WANG, X.L.; NANTAIS, L.; SMITH, D.L. Root contrast enhancement for measurement with optical scanner-based image analysis. **Can J Bot**, v. 79, p. 23-29, 2002

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; GONÇALVES, E. D. V.; SANDERI, G. S.; PAULETTI, D. R. OFFMANNI, L. C. Resposta do Milho à Inoculação Combinada com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* associada à Adubação Nitrogenada. **XXIX Congresso Nacional do Milho e do Sorgo**. Águas de Lindóia, 2012

DEL GALLO, M.; FENDRIK, I.; OKON, Y. The rhizosphere and *Azospirillum*. **Azospirillum/Plant Associations**, v. 1, p. 57-75, 1994.

DE – POLLI, H.; FRANCO, A.A.; ALMEIDA, D.L. Consorciação do capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) com cinco leguminosas forrageiras tropicais. **Boletim Técnico nº 104**, Instituto de Pesquisa Agropecuária do Centro-Sul, p. 174-182, 1973.

DE-POLLI, H. **Ocorrência de fixação de $^{15}\text{N}_2$ nas gramíneas tropicais *Digitaria decumbens* e *Paspalum notatum*.** (Dissertação Mestrado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil, 95f, 1975.

DE-POLLI, H., MATSUI, E., DÖBEREINER, J., SALATI, E. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by $^{15}\text{N}_2$ incorporation. **Soil biology and Biochemistry**, v. 9, n. 2, p. 119-123, 1977.

DIAS-FILHO, M. B. Degradação de pastagens: processos, causas e estratégias de recuperação. 4. ed. **Revisão atual e ampliada**. Belém: Ed. do Autor, p. 216, 2011.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; BROEK, A. V.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and soil**, v. 212, n. 2, p. 153-162, 1999.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DÖBEREINER, J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In: BALLOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SHLEIFER, K., (Org.). **The Prokaryotes**, 2.ed. New York, Springer-Verlag, p. 2236-2253, 1992.

DOBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: NEWTON W. E.; NYMAM, C. J. N. (Org.). **Proceedings of the Institute International Symposium on Nitrogen Fixation**. Washington: Pulman, Washington State University of Press. p. 518-538, 1976.

DOBEREINER, J.; DUQUE, F. F. Contribuição da pesquisa em FBN para o desenvolvimento do Brasil. **Revista de Economia Rural**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 447-460, 1980.

FAGUNDES, J. L.; FONSECA, D. M.; MORAIS, R. V.; MISTURA, C.; VITOR, C. M. T.; GOMIDE, J. A.; NASCIMENTO JUNIOR, D.; SANTOS, M. E. R.; LAMBERTUCCI, D. M. Avaliações das características estruturais do capim-braquiária em pastagens adubadas com nitrogênio nas quatro estações do ano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, p. 30-37, 2006.

FAGES, J. *Azospirillum* inoculants and field experiments, In: Okon, Y. (Ed.). ***Azospirillum Plant Associations***. USA: CRC Press, p. 88-105, 1994.

FALLIK, E.; OKON, Y. The response of maize (*Zea mays*) to *Azospirillum* inoculation in various types of soils in the field. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 5, p. 511-515, 1996.

FALEIRO, A. C. Análise da interação de *Azospirillum brasilense* FP2 com raízes de milho (*Zea mays*) por qPCR, microscopia eletrônica e proteômica (Tese-Doutorado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, p. 107, 2014.

FRANCHE, C.; LINDSTROM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and soil**, v. 321, n. 1-2, p. 35-59, 2009.

GUIMARÃES, S.L.; BONFIM-SILVA, E.M.; POLIZEL, A.C.; CAMPOS, T. S. Produção de capim marandu inoculado com *Azospirillum* spp. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.7, n.13, 2011a.

GUIMARÃES, S.L.; BONFIM-SILVA, E.M.; KROTH, B. E.; MOREIRA, J. C. F.; REZENDE, D. Crescimento e desenvolvimento inicial de *Brachiaria decumbens* inoculada com *Azospirillum* spp. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.7, n.13, 2011b.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L. D; JACOB-NETO, J. Influência do nitrogênio mineral e do pH da rizosfera sobre a população de bactérias diazotróficas em plantas de arroz. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.7, n.12; p. 4, 2011.

HARTMAN, A.; BALDANI, J. I. The genus *Azospirillum*. In: DWORKIN, M.; FLAKNOW, S.; ROSEMBERG, E.; SCHLEIFER, K-H.; STACKERBRANDT, E.; (Ed.). **The Prokaryotes**. 3. Ed. New York: Springer, v. 5; p. 115-140, 2006.

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. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. **Embrapa Soja – Documentos 325**, 2011.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAÚJO, R. S. Inoculation of *Brachiaria spp.* with the plant growthpromoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 221, p. 125–131, 2016.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Censo da Agropecuária 2006. IBGE, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

INIGUEZ, A.L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E.W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molec. Plant Microbiology**, v.17, p.1078-1085, 2004.

ITZIGSOHN, R.; BURDMAN, S.; OKON, Y.; ZAADY, E.; YONATAN, R.,; PEREVOLOTSKY, A. Plant-growth promotion in natural pastures by inoculation with *Azospirillum brasilense* under suboptimal growth conditions. **Arid Soil Research and Rehabilitation**, v. 14, n. 2, p. 151-158, 2000.

KLUTHCOUSKI, J.; COBUCCI, T.; AIDAR, H.; COSTA, J. D. S.; PORTELA, C. **Cultivo do feijoeiro em palhada de braquiária**. Embrapa Arroz e Feijão-Docmentos (INFOTECA-E), 2003.

KUSS, A. V. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado**. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, Brasil, 109 f., 2006.

KUSS, A. V., KUSS, V. V., LOVATO, T., & FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007.

LIN, S. Y.; SHEN, F. T.; YOUNG, L. S.; ZHU, Z. L.; CHEN, W. M.; YOUNG, C. C. *Azospirillum formosense* sp. nov. a diazotroph from agricultural soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1185-1190, 2012.

LIN, S. Y., HAMEED, A., SHEN, F. T., LIU, Y. C., HSU, Y. H., SHAHIMA, M., LAI, W. A., YOUNG, C. C. Description of *Nivespirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.105, n.6, p.1149-1162, 2014.

MACEDO, M.C.M; KICHEL, A.N; ZIMMER, A.H. Degradação e alternativas de recuperação e renovação de pastagens. **Embrapa Gado de Corte-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2000.

MACEDO, M. C. M. **Pastagens no ecossistema cerrados: evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentável**. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42, 2005, GOIÂNIA. ANAIS. Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia, p.56-84. 2005.

MAGALHÃES, F. M. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J.R.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum species*. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 55, n. 4, p. 417-430, 1983.

MAGALHÃES, F.M.M., DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **Revista de microbiologia**, v.15, p. 246-252, 1984.

MAGALHÃES, P.C.; ANDREOTTI, M.; VIEIRA, A.M., BERGAMASCHINE, A. F.; MANO DE MELLO, L. M.; CINTRA LIMA, R. Produtividade de grãos de milho e massa seca de braquiárias em consórcio no sistema de integração lavoura-pecuária. **Ciência Rural**, v.41, n.5, p. 875-882, 2011.

MARTHA Jr., G. B., VILELA, L. **Efeito poupa-terra de sistemas de integração lavoura-pecuária**. Comunicado Técnico. Embrapa Cerrados. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 164, 2009

MEGURO, N.E.; MAGALHÃES, A.C. Atividade da redutase de nitrato em cultivares de café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, n.12, p.1725-1731, 1982.

MELLONI, R.; ABRAHÃO, R.S.; MOREIRA, F.M.S.; NETO, A.E.F. Impacto de resíduo de siderurgia na microbiota do solo e no crescimento de eucalipto. **Revista Árvore**. p. 309-315, 2000.

MELLONI, R.; NÓBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, p. 85-93, 2004.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. **Principles of plant nutrition**. 5. ed. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, p. 849, 2001.

MILES, JOHN W.; VALLE, C.B.D. Manipulation of apomixis in *Brachiaria* breeding. In: Miles JW, Maass BL & Valle CB do (Eds.) ***Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement***, p. 147-163, 1996.

MILES, J.W. **Achievements and perspectives in the breeding of tropical grasses and legumes**. In: 19° International Grassland Congress, São Pedro. Proceedings. FEALQ - Fundação de Estudos Agrários Luiz de Querioz, p. 509-515, 2001.

MILES, J.W; VALLE, C.B.DO; RAO, I.M.; EUCLIDES, V.P.B. ***Brachiaria* grasses**. In: Sollenberger LE, Moser L & Burson B (Eds.). Warm-season (C4) grasses. Madison, ASA: CSSA: SSSA (American Society of Agronomy - Crop Science Society of America- **Soil Science Society of America**), p 745-783, 2004.

MISRA, H.S., RAJPUROHIT, Y.S. & KHAIRNAR, N.P. (2012). Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes. **Journal of biosciences**, v.37, n.2: 313-25, 2012.

MIYAUCHI, M. Y. H.; LIMA, D. S.; NOGUEIRA, M. A.; LOVATO, G. M.; MURATE, L. S.; CRUZ, M. F.; FERREIRA, J. M.; ZANGARO, W.; ANDRADE, G. Interactions between

diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungus in maize genotypes. **Scientia Agricola**, v.65, n.5, p.525-531, 2008.

MIRANDA, C.H.B.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Selection of ecotypes of *Panicum maximum* for associated biological nitrogen fixation using the ¹⁵N isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 22, n. 5, p. 657-663, 1990.

MORAIS, R.S.; QUESADA, D.M.; REIS, V.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Plant soil**. DOI 10.1007 / s11104-001-0944-2, 2011.

MOREIRA, F. M. D. S., DA SILVA, K., NÓBREGA, R. S. A.; DE CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74, 2010.

MOREIRA, F.M.S.; LANGE, A.; KLAUBERG-FILHO, O.; SIQUEIRA, J.O.; NÓBREGA, R.S.A.; LIMA, A.S. Associative diazotrophic bacteria in grass roots and soils from heavy metal contaminated sites. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, p. 135-146, 2008.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ª ed. UFLA, Lavras, Brasil, p, 729, 2006.

MORRIS, D. R.; ZUBERER, D.A.; WEAVER, R. W. Nitrogen fixation by intact grass-soil cores using ¹⁵N and acetylene reduction. **Soil Biol. Biochem**, v. 17, p. 87–91, 1985.

NÓBREGA R.S.A.; MOREIRA F.M.S.; SIQUEIRA J.O.; LIMA A.S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, p. 269-279, 2004.

OLIVEIRA, P.P.A.; DE OLIVEIRA, W. S.; BARIONI JUNIOR, W. Produção de forragem e qualidade de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com *Azospirillum brasilense* e fertilizada com nitrogênio. **Embrapa Pecuária Sudeste-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2007.

OKON, Y.; ITZIGSOHN, R.; BURDMAN, S. & HARPEL, M. **Advances in Agronomy and ecology of the Azospirillum/plant association**. In: TIKHONOVICH, eds. Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 635- 640, 1995

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **Features**, v. 63, p. 366-370, 1996

PANDEY, A.; SHARMA, E.; PALNI, L. M. S. Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming systems of the Sikkim Himalaya. **Soil Biol. Biochem.**, v. 30, p. 379-384, 1998.

PEREIRA, P. A. A.; DOBEREINER, J.; NEYRA, C. A. Nitrogen assimilation and dissimilation in five genotypes of *Brachiaria* spp. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 59, p. 1475-1479, 1981.

PIRES, W. **Manual de pastagens: formação, manejo e recuperação**. Viçosa: Aprenda fácil, p.

64-74, 2006.

QUADROS, P. D. D. **Inoculação de *Azospirillum spp.* em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul**, p. 74, 2009.

QUESADA D.M., **Parâmetros quantitativos e qualitativos da biomassa de genótipos de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) com potencial para uso energético, na forma de carvão vegetal**. Tese (Doutorado em Agronomia Ciência do Solo) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 65 f., 2005.

QUESADA D.M., **Seleção de genótipos de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) para a alta produção de biomassa e eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia Ciência do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 86 f., 2001.

RAMOS, H. J.; RONCATO-MACCARI, L. D.; SOUZA, E. M.; SOARES-RAMOS, J. R.; 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.

REIS J. F. B., REIS, V. M. Inoculante em cana é novidade. **Campo & Negócios**, Uberlândia, v. 76, p. 31-32, 2009.

REIS JUNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 32, n. 3, p. 1139-1146, 2008.

REIS JUNIOR, F. B.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S. Restriction of 16S-23S intergenic rDNA for diversity evaluation of *Azospirillum amazonense* isolated from different *Brachiaria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p. 431-438, 2006.

REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.5, p.985-994, 2000

REIS JUNIOR, F.B; TEIXEIRA, K.R.S.; REIS, V.M. Fixação bioológica de nitrogênio associada a pastagens de braquiaria e outras gramíneas forrageiras. **Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECA-E)**, 2002.

REIS, V. M. Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas. **Embrapa Agrobiologia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2007.

REIS, V. M.; REIS F. B. DOS; QUESADA, D. M.; OLIVEIRA, O. C. A.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation associated with pasture grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 9, p. 837-844, 2001.

ROESCH, L. F. W. **Ocorrência e Distribuição de bactérias Diazotróficas Associadas a Cultivares de Milho**. Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p.78, 2003.

RUDNICK, P.; MELETZUS, D.; GREEN, A.; HE, L.; KENNEDY, C. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.831-841, 1997.

RUSCHEL, A.P. **Fixação biológica de nitrogênio**. (Tese de Doutorado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil, 1975.

SAVIDAN, YVES HERVÉ; JANK, L.; PENTEADO, MI DE O. Introdução, avaliação e melhoramento de plantas forrageiras tropicais no Brasil: novas propostas de Modus operandi. **Embrapa Gado de Corte-Documents (INFOTECA-E)**, 1985

SEIFFERT, N.F. Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria*. Campo Grande: **EMBRAPA**, (Circular interna, 1), p. 83, 1984.

SEIFFERT, N.F. **Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria***. Reimpressão. Campo Grande, EMBRAPA-CNPQC, p.74, 1984.

SERRÃO, E.A.D.; SIMÃO NETO, M.; NASCIMENTO, C.N.B.do; VEIGA, J.B.; GUIMARÃES, M.C.de F. Engorda de novilhos nelorados em pastagem de *Canarana erecta* lisa, *Brachiaria* e congo. (**IPEAN. Comunicado Técnico, 27**). Belém, Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Norte, p. 1-20, 1972.

SHEARER, G; KOHL, D. H. N²-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. **Functional Plant Biology**, v. 13, n. 6, p. 699-756, 1986.

SILVA, G.R; SILVA, J.R; LOPES, M.; DE MELO, V.S. Efeitos de diferentes usos da terra sobre as características químicas de um latossolo amarelo do Estado do Pará. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 2, p. 151-158, 2006.

SILVA, K. **Densidade e caracterização de bactérias diazotróficas associativas oriundas de diferentes sistemas de uso da terra na região amazônica**. (Dissertação de Mestrado) - Universidade federal de Lavras, Lavras, Brasil, p. 78, 2006.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. Microbiota do solo e qualidade ambiental. In: SALA, V. M. R.; SILVEIRA, A. P.D.; CARDOSO, E. J. B. N. **Bactérias Diazotróficas Associadas a Plantas Não-Leguminosas**. Campinas: Instituto Agronômico, p. 97-115, 2007.

SIMÃO, N.M.; SERRÃO, E.A.S. Capim kicuio da Amazônia (*Brachiaria* sp). **B.Tec. IPEAN**, Belém, v. I-17, p. 58, 1974.

SOUTO, S. M. 1982. **Variação estacional da fixação de N₂ e desnitrificação em gramíneas forrageiras tropicais**. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 268 f., 1982.

STEENHOUDT, O; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 487-506, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Tradução de E.R. Santarém. 3ª. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 719, 2004.

TEDESCO, M. J.; VOLKWEISS, S. J., BOHNEN, H. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: (UFRGS. Boletim Técnico, 5). Departamento de Solos, p.188,1985.

TRENTINI, D.B. **Identificação dos alvos celulares das proteínas de transdução de sinal PII do diazotrófico de vida livre *Azospirillum amazonense***, Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 122 f., 2010.

VALLE, C.B.; PAGLIARINI, M. S. Biology, cytogenetics, and breeding of *Brachiaria*. **Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement**, p. 103-151, 2009.

VALLE, C.B. (Ed.). ***Brachiaria: biology, agronomy and improvement***. Cali: CIAT; Campo Grande: EMBRAPA/CNPGC, p.1-15. Cap.1, 1996.

VALLE, C.B. do; JANK, L. (Ed.). **Melhoramento de forrageiras tropicais**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, p. 293, 2008.

VALLE, C. B.; EUCLIDES, V. P. B.; MACEDO, M. C. M. **Características de plantas forrageiras do gênero *Brachiaria***. In: SIMPÓSIO SOBRE O MANEJO DA PASTAGEM, 17. Piracicaba, 2001. Anais. Piracicaba: FEALQ, p. 133-176, 2001.

VALLE, C. B.; JANK, L.; RESENDE, R.M.S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, v. 56, n. 4, p. 460-472, 2009.

VALLE, C. B.; EUCLIDES, V. P. B.; PEREIRA, J. M.; VALÉRIO, J. R.; PAGLIARINI, M. S.; MACEDO, M. C. M.; LEITE, G. G.; LOURENÇO, A. J.; FERNANDES, C. D.; DIAS FILHO, M.B.; LEMPP, B. SOUZA, M. A. **O capim-xaraés (*Brachiaria brizantha* cv. Xaraés) na diversificação das pastagens de braquiária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, p. 36, 2004.

VALLE, C. B.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S.; BONATO, A. N. V. **Lançamentos de cultivares forrageiras: o processo e seus resultados – cvs. Massai, Pojuca, Campo Grande, Xaraés**. In: NÚCLEO DE ESTUDOS EM FORRAGICULTURA. Lavras. Universidade Federal de Lavras, p. 179-225, 2003.

VALLE, C.B.; SAVIDAN, Y.H. **Genetics, cytogenetics, and reproductive biology of *Brachiaria***. In: Miles, J.W.; Maass, B.L. & Valle, C.B. *Brachiaria: biology, agronomy and improvement*. CIAT, Cali, Colombia. Capítulo 10, p.147-163, 1996.

VIDEIRA, S.S. **Taxonomia polifásica de bactérias diazotróficas do gênero *Sphingomonas* spp. e efeito da inoculação em plantas de arroz**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 126f., 2008.

VILELA, H. **Formação de pastagens**. Belo Horizonte, EMATER, p. 29, 1977

VILELA, L.; MACEDO, M. C. M.; MARTHA JUNIOR, G. B.; KLUTHCOUSKI, J. Degradação de pastagens e indicadores de sustentabilidade. In: KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F.; AIDAR, H. (Ed.). **Integração lavoura-pecuária**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p. 105-128, 2009.

VILELA, L.; SOARES, W.V.; SOUSA, D.M.G; MACEDO, M.C.M. **Calagem e adubação para pastagens**. In: Cerrado: Correção do solo e adubação. Editores: Djalma M.G. Souza e Edson Lobato. Planaltina, DF. Embrapa Cerrados, 2ª edição, p. 367-382, 2004.

VOGEL; G. F.; MARTINKOSKI, L.; MARTINS, P. J.; BICHEL, A. Desempenho agrônomico de *Azospirillum brasilense* na cultura do arroz: uma revisão. **Revista em Agonegócios e Meio Ambiente**, v.6, n.3, p. 567-578, 2013.

VOGEL, G.; MARTINKOSKI, L.; RUZICKI, M. Efeitos da utilização de *Azospirillum brasilense* em poáceas forrageiras: Importâncias e resultados. **Agropecuária científica no Semiárido**, Campina Grande, v. 10, n. 1, p. 01-06, 2014.

VOGEL, J. P.; GARVIN, D. F.; MOCKLER, T. C.; SCHMUTZ, J.; ROKHSAR, D.; BEVAN, M. W.; TICE, H. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. **Nature**, v. 463, n. 7282, p. 763-768, 2010.

YONEYAMA, T.; TERAKADO, J.; MASUDA, T. Natural abundance of ^{15}N in sweet potato, pumpkin, sorghum and castor bean: possible input of N^2 -derived nitrogen in sweet potato. **Biology and fertility of soils**, v. 26, n. 2, p. 152-154, 1997.

ZAADY, E.; OKON, Y.; PEREVOLOTSKY, A. Growth response of Mediterranean herbaceous swards to inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Journal of Range Managemet**, v. 47, n.1, pp. 12-15, 1994.

ZAMBRANO, E.R.; JIMÉNEZ, S.T.; TAPIA, H.A. Estudio de bacterias asociadas a orquídeas (Orchidaceae). **Lankesteriana**, n. 71-2, p. 332-325, 2007

ZORZATTO, C.; CHIARI, L.; VALLE, C.B.D.O.; LEGUIZAMON, G.O.C.; JANK, L.; RESENDE, R.M.S.; PAGLIARINI, M.S. **Search of RAPD molecularmarker linked to apomixis in *Brachiaria humidicola***. In: International Congress on Sexual Plant Reproduction, Brasília. Anais, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. (Documentos, 259), p. 212-213, 2008.