

**UFRRJ  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**TESE**

**ESTUDO DA ATIVIDADE FUNCIONAL DE  
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E O POTENCIAL  
DE USO COMO BIOFERTILIZANTE EM  
GENÓTIPOS DE *Brachiaria***

**NATHÁLIA VIRGÍNIA DA SILVA RIBEIRO**

**2018**



**UFRRJ**

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**ESTUDO DA ATIVIDADE FUNCIONAL DE BACTÉRIAS  
DIAZOTRÓFICAS E O POTENCIAL DE USO COMO  
BIOFERTILIZANTE EM GENÓTIPOS DE *BRACHIARIA***

**NATHÁLIA VIRGÍNIA DA SILVA RIBEIRO**

*Sob a orientação do Pesquisador*  
**José Ivo Baldani**

*e co-orientação da Pesquisadora*  
**Márcia Soares Vidal**

**Tese submetida em 25 de setembro de 2018 como  
requisito para obtenção do grau de Doutora em  
Fitotecnia, no Programa de Pós-graduação em  
Fitotecnia**

Seropédica, RJ  
Setembro de 2018

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

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

R482e Ribeiro, Nathália Virgínia da Silva , 1988-  
Estudo da atividade funcional de bactérias  
diazotróficas e o potencial de uso como  
biofertilizante em genótipos de Brachiaria / Nathália  
Virgínia da Silva Ribeiro. - 2018.  
181 f.: il.

Orientador: José Ivo Baldani.  
Coorientadora: Márcia Soares Vidal.  
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em  
Fitotecnia, 2018.

1. pastagem. 2. fixação biológica de nitrogênio. 3.  
bactérias promotoras crescimento vegetal. 4.  
inoculação. 5. diversidade. I. Baldani, José Ivo, 1953  
, orient. II. Vidal, Márcia Soares, 1973-, coorient.  
III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós-graduação em Fitotecnia. IV. Título.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**NATHÁLIA VIRGÍNIA DA SILVA RIBEIRO**

**Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em  
Fitotecnia, no  
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia.**

**TESE APROVADA EM 25/09/2018**

---

**André Luiz Martinez de Oliveira, (PhD.) UEL**

---

**Marcia Reed Rodrigues Coelho, (PhD.) EMBRAPA**

---

**Segundo Sacramento Urquiaga Caballero, (PhD.) EMBRAPA**

---

**Sílvia Regina Goi, (PhD.) UFRRJ**

---

**José Ivo Baldani, (PhD.) EMBRAPA**

**(Orientador)**

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais José e Rose Mary, a minha irmã Thaís, ao meu querido sobrinho Zézinho e a toda minha família, amigos e professores pela confiança, parceira e incentivo ao longo não somente desse período, mas de toda minha trajetória acadêmica, social e humana que muito colaboraram para que este momento pudesse se concretizar; com carinho dedico este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça da vida e pelas incontáveis bênçãos durante todo este período.

Aos meus pais, José Rbeiro e Rose Mary, pelo carinho, confiança, suporte para vencer os desafios da vida de cabeça erguida, pelo incentivo para seguir esta jornada e também pelo amor incondicional.

A minha irmã Thaís pela compreensão de minhas ausências e simplesmente pelo fato de estar sempre perto de mim.

Ao meu amado sobrinho por tornar minha vida muito mais alegre.

A toda minha família pelas orações e boas energias enviadas, elas chegaram pode ter certeza.

Ao meu orientador, José Ivo Baldani, pelas inúmeras conversas que tivemos, pelas dúvidas esclarecidas, também pelos puxões de orelha, sugestões, correções, dicas, conhecimentos passados e principalmente pela amizade. Chefe, obrigada por tudo.

A minha co-orientadora, Márcia Soares Vidal, pelas dicas, ajuda, disponibilidade, sempre auxiliando de forma prestativa em todas as vezes que precisei.

Agradeço imensamente a todos os meus queridos amigos e colegas do Laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia. Companheiros dessa longa jornada, das horas tristes e felizes. Àqueles que sempre se dispuseram a ajudar, independente da atividade, do horário, dia da semana ou calor: Jéssica, Beth, Fran, Cleiton, Tati, Gabi Amanda, Thomas, Leo e Rafael.

Agradeço aos funcionários Roberto Carlos e Ernani, pelo apoio na execução dos meus experimentos de casa de vegetação.

Agradeço imensamente também aos funcionários Geraldo Baetea, Carol Nachi, Paty Githay, Fernada, Seu Claudinho, Marildo, Wilson e Lúcio por toda ajuda e amizade.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudo para realização dos meus estudos de Doutorado;

À Embrapa Agrobiologia, pela disponibilização da estrutura e apoio financeiro para a realização do trabalho;

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ao Curso de Pós-graduação em Fitotecnia e a seus professores.

## **BIOGRAFIA**

Nathália Virgínia da Silva Ribeiro, filha de José Ribeiro Filho e Rose Mary da Silva Ribeiro, nasceu em 22 de outubro de 1988 na cidade de Belford Roxo, RJ. Em 2003, cursou o ensino médio no Colégio EME em Nova Iguaçu, RJ. Graduiu-se em Licenciatura em Ciências Agrícolas e com habilitação em Ciências Naturais pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no ano de 2011. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da UFRRJ de janeiro de 2010 a agosto de 2011 sob orientação do Dr. Pedro Correa Damasceno Júnior. Em 2011 ingressou no Mestrado no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob orientação da Dr. Pedro Correa Damasceno Júnior. Em 2014 ingressou no Doutorado no Curso de Pós-Graduação em Fitotenia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob orientação da Dr. José Ivo Baldani.

## RESUMO GERAL

As pastagens brasileiras (260 milhões ha) são ocupadas principalmente com gramíneas do gênero *Brachiaria* em razão de sua elevada adaptabilidade e tolerância às condições de solos ácidos e de baixa fertilidade, aliada ao seu valor forrageiro. A maior evidência da importância das forrageiras é o fato de o Brasil possuir o maior rebanho bovino comercial, ser o maior produtor e exportador de carne e o quinto maior produtor de leite. Apesar disso, estima-se que de 50 a 70% das pastagens cultivadas no Brasil encontram-se em processo de degradação, sendo o nutriente nitrogênio o seu principal fator limitante. No entanto, aplicação de fertilizantes nitrogenados onera a produção, sendo assim, uma alternativa para o suprimento de nitrogênio, mesmo que parcial, seria a utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio. Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo analisar a diversidade de bactérias diazotróficas associadas e endofíticas em vinte genótipos de *Brachiaria* mantidos no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC) e analisar a capacidade funcional das estirpes isoladas em solubilizar fosfato inorgânico e óxido de zinco, produzir sideróforos e ácido-3-indolacético (AIA), e degradar celulose. Em adição, foi avaliado o efeito da inoculação de isolados com características funcionais contrastantes em doze genótipos de *Brachiaria* em experimento em caixas com solo em casa de vegetação. As bactérias foram isoladas de amostras de solo rizosférico e raízes com e sem desinfestação superficial de todos os vinte genótipos desta gramínea. Foram utilizados dois meios de cultura semi-sólidos e semi-seletivos: LGI (*Nitrospirillum amazonense*) e NFb (*Azospirillum spp.*). Os testes das capacidades funcionais foram realizados *in vitro* e foram utilizados como critério de seleção dos 32 isolados bacterianos utilizados no experimento de inoculação em casa-de-vegetação. Foram realizados três cortes durante o ciclo da planta e que foram avaliados os parâmetros de massa seca da parte aérea e da raiz, e o Ntotal acumulado na planta. Foram obtidos um total de 222 isolados, sendo a maioria isolados de solo rizosfera e raízes não desinfestadas. O tamanho da população de bactérias diazotróficas viáveis, colonizando os 20 genótipos em estudo, variou de  $10^2$  a  $10^8$  bactérias por grama de solo ou raiz, sendo a maior população observada nas raízes desinfestadas da *Brachiaria humidicula* H47. No entanto, a maior diversidade de espécies bacteriana foi proveniente do genótipo *B. decumbens* D24/27 e o maior número de isolados foi obtido do genótipo de *B. decumbens* X009. O sequenciamento do gene 16S rRNA das bactérias confirmou a presença dos gêneros *Azospirillum* e *Nitrospirillum*, além de revelar a presença de outros 15 gêneros bacterianos. Dos 222 isolados, 39,2% foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico e 9,5% de Zn, 32,4% apresentaram capacidade celulolítica, 84,2% produziram sideróforos e 18,5% de compostos indólicos em condições *in vitro* enquanto a presença do gene *nifH* foi observada em 85,14% dos isolados. A avaliação das características funcionais mostrou que 0,9% possuem todas as seis funções, 5,4% apresentaram cinco das características avaliadas, 42,8% possuem pelo menos três características, 41,9% apresentam duas características funcionais, 7,7% apresentaram somente uma capacidade funcional enquanto que 1,3% não apresentaram nenhuma das capacidades funcionais avaliadas. Os estudos de inoculação das estirpes nos genótipos cultivados em casa de vegetação mostraram que houve diferença significativa a 0,1% em relação ao controle absoluto na produção de biomassa e no acúmulo de N da planta para a maioria dos doze genótipos de *Brachiaria* testados, estes sendo de até 76,9% para a massa seca da planta e de até 54,3% para o acúmulo de N da planta. Os resultados indicam que a utilização de inoculantes com essas bactérias pode ser uma alternativa natural na redução do uso do fertilizante nitrogenado em busca de diminuição dos custos de produção em pastagens.

Além disso, é uma tecnologia limpa, o que contribui para a sustentabilidade das atividades agropecuárias no Brasil, sem comprometer o meio ambiente e conseqüentemente ajudará o país a atingir seus compromissos mundiais na redução de emissão de gases de efeito estufa e as mudanças climáticas globais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Pastagem, bactérias promotoras crescimento vegetal, gene 16S rRNA, inoculação, diversidade

## ABSTRACT

Pastures are of great importance for Brazilian cattle and dairy cattle, where about 260 million ha are occupied by native and cultivated pastures. The pastures are mainly occupied with grasses of the genus *Brachiaria*, due to their high adaptability and tolerance to the acidic soils and low fertility conditions, together with their protein forage value. The greatest evidence of the forage grasse importance is the fact that Brazil has the largest commercial cattle herd, is the largest producer and exporter of meat and the fifth largest milk producer. Despite its economic importance, it is estimated that from 50 to 70% of the pastures cultivated in Brazil are in the process of degradation, being nitrogen its main limitation cause. However, nitrogen fertilizer is applied to increase the production, thus, an alternative for the nitrogen supply, even partially, is the use of nitrogen fixing bacteria. In this sense, the present study aimed to analyze the diversity of associative and endophytic diazotrophic bacteria present in twenty *Brachiaria* genotypes kept in the Germplasm Active Bank (GAB) of the National Center for Research Gado de Corte (NCRGC) and to analyze the functional capacity of the isolated strains in solubilizing inorganic phosphate and zinc oxide, producing siderophores and acid-3-indoleacetic acid (AIA), and degrading cellulose. In addition, the inoculation effect of the isolates with contrasting functional characteristics was evaluated in twelve *Brachiaria* genotypes grown in soil boxes in a greenhouse. The bacteria were isolated from rhizospheric soil and roots with and without surface disinfection samples of all twenty genotypes. Two semi-solid and semi-selective culture media were used: LGI (*Nitrospirillum amazonense*) and NFb (*Azospirillum spp.*). The functional capacity tests were performed in vitro and were used as selection criteria for the 32 bacterial isolates used in the greenhouse inoculation experiment. Three cuts were made during the plant cycle and the parameters dry mass of shoot and root, and N total accumulated in the plant were evaluated. A total of 222 isolates were obtained, most of which were isolated from rhizosphere soil and non-disinfested roots. The population size of viable diazotrophic bacteria, colonizing the 20 genotypes, ranged from  $10^2$  to  $10^8$  bacteria per gram of fresh tissue, the largest population was observed in disinfested roots of *B. humidicula* H47. However, the greatest diversity of bacterial species came from the genotype *B. decumbens* D24 / 27 and the greatest number of isolates was obtained from the genotype of *B. decumbens* X009. Sequencing the 16S rRNA gene from the bacteria confirmed the presence of the genera *Azospirillum* and *Nitrospirillum*, and in addition to the presence of 15 other bacterial genera. Out of the 222 isolates, 39.2% were able to solubilize inorganic phosphate and 9.5% of Zn, 32.4% presented cellulolytic capacity, 84.2% produced siderophores and 18.5% indole compounds under in vitro conditions while the presence of the *nifH* gene was observed in 85.14% of the isolates. The evaluation of functional characteristics showed that 0.9% had all six functions, 5.4% had five of the characteristics evaluated, 42.8% had at least three characteristics, 41.9% presented two functional characteristics, 7.7% presented only a functional capacity while 1.3% did not present any of the functional capacities. The strain inoculation studies showed that there was a significant difference at 0.1% in relation to absolute control in the biomass production and N accumulation in the plant of the twelve *Brachiaria* genotypes, these being up to 76.9% for the dry mass and up to 54.3% for the N accumulation in the plant. The results suggest that the use of inoculants with these bacteria may be a natural alternative in reducing the use of nitrogen fertilizer in order to reduce the costs in pastures. In addition, inoculation is a clean technology, which contributes to the sustainability of agricultural activities in Brazil, without compromising the environment. It may also help

the country to achieve its global goals in reducing greenhouse gas emissions and global climate change.

**KEY WORDS:** Pasture, plant growth promoting bacteria, 16S rRNA gene, inoculation, diversity

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Quantificação da população de bactérias diazotróficas cultiváveis (número de células por grama de tecido fresco) colonizando vinte genótipos de *Brachiaria* usando os meios de cultivo semi-sólidos livres de nitrogênio (NFb e LGI). 42
- Tabela 2.** Número de espécies bacterianas isoladas dos vinte genótipos de *Brachiaria* e identificadas taxonomicamente como pertencentes a diferentes gêneros. .... 49
- Tabela 3.** Avaliação *in vitro* da capacidade de solubilizar fosfato inorgânico de bactérias diazotróficas obtidas de genótipos de *Brachiaria* ..... 54
- Tabela 4.** Avaliação *in vitro* da capacidade de solubilizar óxido de zinco de bactérias diazotróficas obtidas de genótipos de *Brachiaria* ..... 55
- Tabela 5.** Avaliação *in vitro* da capacidade de produção de sideróforos de bactérias diazotróficas obtidas de genótipos de *Brachiaria* ..... 58
- Tabela 6.** Avaliação *in vitro* da capacidade celulolítica de bactérias diazotróficas obtidas de genótipos de *Brachiaria*. ..... 61
- Tabela 7.** Avaliação *in vitro* da capacidade de produção de indoles de bactérias diazotróficas obtidas de genótipos de *Brachiaria*. ..... 64
- Tabela 8.** Capacidades funcionais das estirpes isoladas dos vinte genótipos de *Brachiaria* do Banco de Germoplasma da Embrapa Gado de Corte. .... 68

### CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Matriz de genótipos vs estirpes selecionadas para avaliação do efeito de inoculação do desenvolvimento das plantas em experimento conduzido em casa-de-vegetação ..... 92
- Tabela 2.** Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés cultivada em casa de vegetação. .... 95
- Tabela 3.** Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de *Brachiaria brizantha* cv. Paiaguás cultivada em casa de vegetação ..... 97
- Tabela 4.** Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de *Brachiaria brizantha* cv. Piatã cultivada em casa de vegetação ..... 98

<b>Tabela 5.</b> Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu cultivada em casa de vegetação.....	99
<b>Tabela 6.</b> Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. B140 cultivada em casa de vegetação.....	100
<b>Tabela 7.</b> Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de <i>Brachiaria spp</i> cv. Ipyporã cultivada em casa de vegetação .....	101
<b>Tabela 8.</b> Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de <i>Brachiaria spp</i> cv. Mulato II cultivada em casa de vegetação .....	103
<b>Tabela 9.</b> Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de <i>Brachiaria decumbens</i> cv Basilisk cultivada em casa de vegetação.....	104
<b>Tabela 10.</b> Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de <i>Brachiaria humidicula</i> cv. Tupi cultivada em casa de vegetação .....	105
<b>Tabela 11.</b> Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de <i>Brachiaria humidicula</i> cv. comum cultivada em casa de vegetação.....	107
<b>Tabela 12.</b> Efeito da inoculação com bactérias diazotrófica associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de <i>Brachiaria humidicula</i> cv. Llanero cultivada em casa de vegetação.....	108
<b>Tabela 13.</b> Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de <i>Brachiaria humidicula</i> cv. H47 cultivada em casa de vegetação.....	109
<b>Tabela 14.</b> Rendimento de massa fresca, massa seca e N na massa seca de parte aérea, de <i>Brachiaria decumben</i> cv. Basilisk e <i>Brachiaria brizantha</i> . cv. Marandu inoculadas com bactérias diazotróficas via aspersão foliar - casa de vegetação .....	110
<b>Tabela 15.</b> Características funcionais das estirpes diazotróficas isoladas que apresentaram a melhor interação com os genótipos na produção de massa seca total da planta e N total acumulado na planta em experimento conduzido em casa de vegetação e, o percentual de incremento em relação ao tratamento controle absoluto. ....	116

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1.** Exemplos dos 20 genótipos de *Brachiaria* coletados na Embrapa Gado de Corte e transplantados para vasos contendo areia e vermiculita estéril (1:1) para o isolamento das bactérias diazotróficas. .... 32
- Figura 2.** Etapas do processo de isolamento de bactéria diazotrófica a partir de tecidos das plantas de braquiária..... 34
- Figura 3.** Exemplos de frascos de maior diluição com crescimento positivo (película superficial) em meio semi-sólido LGI..... 35
- Figura 4.** Placa de Petri com meio sólido NFb, apresentando colônias características da espécie *Azospirillum brasilense*..... 35
- Figura 5.** Árvore filogenética baseada em sequências do gene 16S rRNA (~1.450bp), incluindo as estirpes tipos de bactérias depositadas no banco de dados NCBI. A filogenia foi baseada no agrupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e modelo Kimura utilizando o programa MEGA6.1. Números localizados nos ramos indicam a porcentagem de 1.000 subamostragens (bootstrap). A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. A sequência do gene 16S rRNA de *Frankia alni* foi utilizada para o enraizamento da árvore ..... 44
- Figura 6.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% da amplificação do gene *nifH* de bactérias isoladas de *Brachiaria* ..... 45
- Figura 7.** Árvore filogenética baseada em sequências do gene *nifH* (~360bp), incluindo as estirpes de bactérias depositadas no banco de dados NCBI. A filogenia foi baseada no agrupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e modelo Kimura utilizando o programa MEGA6.1. Números localizados nos ramos indicam a porcentagem de 1.000 subamostragens (bootstrap). A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. A sequência do gene *nifH* de *Frankia alni* foi utilizada para o enraizamento da árvore..... 47
- Figura 8.** Quantidade de isolados bacterianos de sete espécies de bactérias diazotróficas (*Nitrospirillum amazonense*, *Azospirillum spp.*, *A. melinis*, *A. lipoferum*, *A. formosense*, *A. oryzae* e *A. brasilense*) por capacidade funcional avaliada (produção de sideróforos, solubilização de fosfato e zinco inorgânico, capacidade celulolítica e produção de indol)..... 52
- Figura 9.** Exemplo de formação de halo de solubilização de zinco (A) e solubilização de Pi (B) pelas estirpes NRB081 e NRB082 de *Brachiaria* ..... 53

- Figura 10.** Quantidade de representantes bacterianos isolados de espécie de *Brachiaria* com capacidade de solubilização de fosfato inorgânico (A) e de solubilização de óxido de zinco (B)..... 56
- Figura 11.** Produção de sideróforos para isolados de *Brachiaria* em meio NFb sólido, sem azul de bromotimol e com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,1% de CAS. A mudança de cor azul/amarelo pode ser observada após 72 horas de incubação a 30° C. (A) isolado sem capacidade de produção; (B) isolado com capacidade baixa de produção; (C) isolado com capacidade média; e (D) isolado com capacidade alta de produção de sideróforos *in vitro*. ..... 57
- Figura 12.** Produção de sideróforos para isolados de *Brachiaria* em meio LGI sólido, sem azul de bromotimol e com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,1% de CAS. A mudança de cor azul/rosa pode ser observada após 72 horas de incubação a 30° C. (A) isolado sem capacidade de produção; (B) isolado com capacidade baixa de produção; (C) isolado com capacidade média; e (D) isolado com capacidade alta de produção de sideróforos *in vitro*. ..... 57
- Figura 13.** Quantidade de representantes bacterianos isolados de sete espécies de *Brachiria* com capacidade de produção de sideróforos..... 59
- Figura 14.** Determinação da atividade celulolítica dos isolados obtidos de genótipos de *Brachiaria*. As bactérias foram inoculadas em placas de meio CMC, contendo 0,2% de carboximetilcelulose (A) isolado sem capacidade de degradação; (B) isolado com capacidade baixa de produção; (C) isolado com capacidade média; e (D) isolado com capacidade alta de degradação de celulose *in vitro* ..... 60
- Figura 15.** Quantidade de representantes bacterianos isolados de espécies de *Brachiaria* com capacidade de degração de celulose ..... 62
- Figura 16.** Capacidade de produção de indoles de isolados de genótipos de *Brachiaria* em microplaca 96 poços com 150 µL do sobrenadante da cultura crescida em NFb modificado e 100 µL do reagente de Salkowski. A cor rosa apresenta a produção de AIA ..... 63
- Figura 17.** Quantidade de representantes bacterianos isolados espécies de *Brachiria* com capacidade de produção de AIA ..... 66

## CAPÍTULO II

- Figura 1.** Vista geral do experimento de genótipos de *Brachiaria* inoculadas com bactérias diazotróficas e cultivadas em casa de vegetação (60 dias após o plantio)..... 90

## SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO .....	1
2 - HIPÓTESE.....	2
3 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
4 - REVISÃO DE LITERATURA .....	3
4.1 - O gênero <i>Brachiaria</i> .....	3
4.2 - Importância econômica da <i>Brachiaria</i> .....	3
4.3 - Importância do nitrogênio nas pastagens .....	4
4.4 – Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas forrageiras.....	5
4.5 - Bactérias diazotróficas associativas .....	6
4.6 - Avaliação da capacidade funcional das estirpes .....	9
4.6.1-Capacidade de fixar nitrogênio atmosférico.....	10
4.6.2 - Solubilização de fosfato inorgânico .....	10
4.6.3 - Solubilização de óxido de zinco.....	11
4.6.4 - Produção de sideróforos .....	12
4.6.5 - Capacidade celulolítica .....	13
4.6.6 - Produção de ácido indolacético (AIA).....	13
5 - REFERÊNCIAS .....	15
DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS DE GENÓTIPOS DE <i>BRACHIARIA</i> .....	27
RESUMO .....	28
ABSTRACT .....	29
1 - INTRODUÇÃO .....	30

2.1 - Origem dos genótipos utilizados .....	32
2.2 - Isolamento de bactérias diazotróficas .....	32
2.3 - Caracterização taxonômica dos isolados .....	35
2.3.1- Amplificação do gene 16S rRNA .....	36
2.3.2-Amplificação do gene nifH .....	36
2.3.3- Sequenciamento .....	36
2.4 - Avaliação da capacidade funcional das estirpes .....	37
2.4.1 - Fixação biológica de nitrogênio- avaliação qualitativa.....	37
2.4.1 - Solubilização de fosfato inorgânico .....	38
2.4.2 Solubilização de óxido de zinco .....	38
2.4.3 - Produção de sideróforos .....	38
2.4.4 - Atividade celulolítica .....	39
2.4.5 - Capacidade de produção de compostos indólicos .....	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
3.1. Contagem do NMP e Isolamento das bactérias diazotróficas em meios semi-sólidos NFb e LGI .....	41
3.2. Caracterização molecular e Análise da diversidade dos Isolados .....	43
3.3.Avaliação da capacidade funcional das estirpes.....	52
3.3.1. Solubilização de Fosfato inorgânico e Zinco .....	53
3.3.2.Produção de sideróforos .....	57
3.3.3.Determinação da atividade celulolítica.....	60
3.3.4.Produção de Ácido Indol Acético (AIA).....	63
4. CONCLUSÃO.....	73

5. REFERÊNCIAS .....	74
RESPOSTA DE GENÓTIPOS DE <i>BRACHIARIA</i> À INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS COM ATIVIDADES FUNCIONAIS CONTRASTANTES .....	84
RESUMO .....	85
ABSTRACT .....	86
1 – INTRODUÇÃO.....	87
2 - MATEIAL E MÉTODOS .....	90
2.1 - Seleção de associações eficientes entre estirpes com diferentes atividades funcionais e genótipos de <i>Brachiaria</i> em casa de vegetação (Experimento I).....	90
2.1.1 - Localização do experimento.....	90
2.1.2. Descrição do solo utilizado e adubação.....	90
2.1.3 - Delineamento experimental .....	90
2.1.4 – Análise estatística .....	91
2.1.5 - Material biológico utilizado – preparo do inoculante .....	91
2.1.6. Variáveis de crescimento analisadas .....	93
2.2 - Seleção de associações eficientes entre estirpes com diferentes atividades funcionais e genótipos de <i>Brachiaria</i> em casa de vegetação (Experimento II – Inoculação por aspersão foliar).....	93
2.2.1 - Localização do experimento.....	93
2.2.2 - Descrição do solo utilizado e adubação .....	94
2.2.3. Delineamento experimental.....	94
2.2.4 – Análise estatística .....	94
2.2.5 - Material biológico utilizado – preparo do inoculante .....	94

2.2.6 - Variáveis de crescimento analisadas .....	94
3 - RESULTADOS .....	95
<b>3.1. Seleção de associações eficientes entre estirpes com atividades funcionais contrastantes e genótipos de Brachiaria em experimento conduzido em casa de vegetação (Experimento I – inoculação de sementes).....</b>	<b>95</b>
<b>3.2. Experimento em casa de vegetação II – Inoculação por aspersão foliar</b>	<b>110</b>
4 - DISCUSSÃO.....	111
5 - CONCLUSÃO .....	119
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	120

## ANEXOS

<b>Anexo A.</b> Solução salina para diluição seriada .....	127
<b>Anexo B.</b> Meio NFB .....	128
<b>Anexo C.</b> Meio LGI .....	129
<b>Anexo D.</b> Meio Batata.....	130
<b>Anexo E.</b> Análise de similaridade de isolados de <i>Brachiaria</i> baseado no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.....	131
<b>Anexo F</b> Cluster de <i>Azospirillum lipoferum</i> detalhado da <b>Figura 5</b> . Árvore filogenética baseada em sequências do gene 16S rRNA (~1.450bp). A filogenia foi baseada no agrupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e modelo Kimura utilizando o programa MEGA6.1. Números localizados nos ramos indicam a porcentagem de 1.000 subamostragens (bootstrap). A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. A sequência do gene 16S rRNA de <i>Frankia alni</i> foi utilizada para o enraizamento da árvore .....	140
<b>Anexo G.</b> Cluster de <i>Azospirillum brasilense</i> detalhado da <b>Figura 5</b> . Árvore filogenética baseada em sequências do gene 16S rRNA (~1.450bp). A filogenia foi baseada no agrupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e modelo Kimura utilizando o programa MEGA6.1. Números localizados nos ramos indicam a porcentagem de 1.000 subamostragens (bootstrap). A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. A sequência do gene 16S rRNA de <i>Frankia alni</i> foi utilizada para o enraizamento da árvore. ....	141
<b>Anexo H.</b> Cluster de <i>Azospirillum formosense</i> detalhado da <b>Figura 5</b> . Árvore filogenética baseada em sequências do gene 16S rRNA (~1.450bp). A filogenia foi baseada no agrupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e modelo Kimura utilizando o programa MEGA6.1. Números localizados nos ramos indicam a porcentagem de 1.000 subamostragens (bootstrap). A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. A sequência do gene 16S rRNA de <i>Frankia alni</i> foi utilizada para o enraizamento da árvore. ....	142
<b>Anexo I.</b> Cluster de <i>Azospirillum melinis</i> detalhado da <b>Figura 5</b> . Árvore filogenética baseada em sequências do gene 16S rRNA (~1.450bp). A filogenia foi baseada no agrupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e modelo Kimura utilizando o programa MEGA6.1. Números localizados nos ramos indicam a porcentagem de 1.000 subamostragens (bootstrap). A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. A sequência do gene 16S rRNA de <i>Frankia alni</i> foi utilizada para o enraizamento da árvore. ....	143

<b>Anexo J.</b> Cluster de <i>Nitrospirillum amazonense</i> detalhado da <b>Figura 5</b> . Árvore filogenética baseada em sequências do gene 16S rRNA (~1.450bp). A filogenia foi baseada no agrupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e modelo Kimura utilizando o programa MEGA6.1. Números localizados nos ramos indicam a porcentagem de 1.000 subamostragens (bootstrap). A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. A sequência do gene 16S rRNA de <i>Frankia alni</i> foi utilizada para o enraizamento da árvore. ....	144
<b>Anexo K.</b> Análise de similaridade de isolados de <i>Brachiaria</i> , selecionados para experimento de casa de vegetação, baseado no sequenciamento parcial do gene <i>nifH</i> .....	145
<b>Anexo L.</b> Identificação de gene <i>nifH</i> em isolados de <i>Brachiaria</i> .....	146
<b>Anexo M.</b> Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Xaraés inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação .....	147
<b>Anexo N.</b> Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Paiaguás inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação .....	148
<b>Anexo O.</b> Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Piatã inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação .....	149
<b>Anexo P.</b> Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação .....	150
<b>Anexo Q.</b> Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. B140 inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação .....	151
<b>Anexo R.</b> Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de <i>Brachiaria spp.</i> cv. Ipyporã inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação .....	152
<b>Anexo S.</b> Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de <i>Brachiaria spp.</i> cv. Mulato II inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação .....	153
<b>Anexo T.</b> Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de <i>Brachiaria decumbens</i> cv. Basilisk inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação .....	154

- Anexo U.** Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de *Brachiaria humidicula* cv. Tupi inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação. .... 155
- Anexo V.** Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de *Brachiaria humidicula* cv. comum inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação. .... 156
- Anexo W.** Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de *Brachiaria humidicula* cv. Llanero inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação. .... 157
- Anexo X.** Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de *Brachiaria humidicula* cv. H47 inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação. .... 158

## 1 - INTRODUÇÃO

No Brasil, as gramíneas constituem a base da alimentação da bovinocultura de corte e de leite (ANDRADE, 1994; LIMA E DEMINICES, 2008). As pastagens além de serem uma importante fonte alimentar para o gado, são consideradas uma alternativa prática e econômica para o desenvolvimento de uma pecuária sustentável. O país apresenta condições edafo-climáticas adequadas para produção de carne e leite com qualidade em sistemas com baixo custo de produção; a grande extensão de área cultivada pelo gênero *Brachiaria*, evidencia a flexibilidade de adaptação, uso e manejo desta gramínea à diversidade de condições de solos e climas.

As pastagens nativas e cultivadas no Brasil ocupam atualmente uma área ao redor de 260 milhões ha, abrigando aproximadamente 221 milhões de cabeças bovinas (ABIEC, 2018; USDA, 2018), embora os dados do IBGE (2018) relatam que o rebanho bovino brasileiro é de 170 milhões de cabeças, além de outras espécies de animais tais como caprinos, equinos, muares, asininos e bubalinos, sendo 76 milhões somente na região dos Cerrados, bioma no qual o gênero *Brachiaria* constitui mais de 85% das gramíneas forrageiras cultivadas, dos quais 25% são ocupados por *B. decumbens*, 50% *B. brizantha*, 9% *B. humidicola* e 1% *B. ruziziensis*, *B. dictyoneura* e outras (MACEDO, 2005).

No entanto, a maioria das pastagens encontram-se em algum estágio de degradação (OLIVEIRA *et al.*, 2003; YDOYAGA *et al.*, 2006; DIAS FILHO *et al.*, 2008; DIAS-FILHO, 2011), sendo considerado a limitação de nitrogênio um dos principais fatores responsáveis pelo processo (OLIVEIRA *et al.*, 1997), pois tem sido demonstrado que a solução de apenas este problema pode elevar consideravelmente a produção destas áreas (BODDEY *et al.*, 2003).

Em revisão publicada por Baldani e Baldani (2005) sobre o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) em plantas forrageiras não leguminosas, os autores indicam que a FBN é uma fonte renovável e contínua. Deste modo a FBN em pastagens pode ter um papel importante, onde a prática de inoculação das gramíneas com bactérias diazotróficas associativas específicas, poderá substituir, ainda que parcial, a fonte química de nitrogênio em sistemas intensivos, a exemplo dos rotacionados.

Logo, pesquisas voltadas a determinar a contribuição da FBN para sustentabilidade desse sistema são de suma importância, uma vez que se trata de uma característica adequada ao uso mínimo de insumo nitrogênio. Ainda sob o ponto de vista ambiental, a sustentabilidade do sistema de pastagem representará um melhor uso da terra com a consequente preservação dos ecossistemas ainda intactos.

Devido ao contexto apresentado, o presente estudo tem como objetivo geral selecionar interações benéficas entre bactérias diazotróficas e genótipos de *Brachiaria* visando a inserção do processo de FBN nos programas de melhoramento de pastagens.

## **2 - HIPÓTESE**

A inoculação de pastagens de *Brachiaria* com bactérias diazotróficas associativas isoladas de genótipos de *Brachiaria* pode contribuir para a promoção de crescimento - das plantas, reduzindo o uso de fertilizantes nitrogenados e proporcionando assim a adoção desta tecnologia no meio agrícola.

## **3 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Isolar representantes de bactérias diazotróficas dos gêneros *Azospirillum* e *Nitrospirillum* associadas à rizosfera e às raízes de 20 genótipos de *Brachiaria* por métodos tradicionais de cultivo em meios semi-seletivos NFb e LGI semi-sólido;
- Identificar estirpes promissoras que possam contribuir com quantidades significativas de N via FBN e auxiliar na promoção de crescimento vegetal por meio de outros mecanismos funcionais como a produção de fitoreguladores e sideróforos, solubilização de fosfato e óxido de zinco, e capacidade celulolítica; e
- Determinar a capacidade das bactérias diazotróficas em promover o crescimento de genótipos de *Brachiaria* spp., cultivados em condições de casa de vegetação, por meio das análises de parâmetros de crescimento.

## 4 - REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 - O gênero *Brachiaria*

Braquiária é um gênero botânico pertencente à família Poaceae, subfamília Panicoidea, tribo Paniceae, descrito primeiramente por Trinius (1834) (PALMER, 1987) como uma subdivisão de *Panicum*, posteriormente elevado à categoria de gênero por Grisebach (1853) (CLEGG E ZURAWSKI, 1992). O gênero reúne cerca de 100 espécies, distribuídas amplamente em regiões tropicais, especialmente na África, seu maior centro de diversidade (MONTEIRO *et al.*, 1974; VALLE E MILLES, 1994; RENVOIZE *et al.*, 1996).

No Brasil, existem cinco espécies nativas (*B. adspersa*, *B. fasciculata*, *B. mollis*, *B. reptans*, *B. venezuelae*), porém não são utilizadas em pastagens por não possuir potencial forrageiro (PIZARRO *et al.*, 1996). De acordo com Silva e colaboradores (2010), as espécies mais utilizadas são *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*, devido ao elevado valor forrageiro, adaptabilidade e tolerância a solos ácidos e de baixa fertilidade (FRANCO E ROSA, 2003)

As pastagens, devido ao seu baixo custo de produção em relação aos concentrados, representam a forma mais prática e econômica de alimentação de bovinos e constituem a base de sustentação da pecuária brasileira (CUNHA *et al.*, 2007). Desta forma, o cultivo de plantas forrageiras, assume papel relevante para a cadeia produtiva de carne e leite e entre as espécies forrageiras, os capins do gênero *Brachiaria* são conhecidos sob o prisma da forragicultura desde 1950.

Historicamente a introdução da *Brachiaria* como forrageira no Brasil se deu a partir da década de 50, com a *B. decumbens* BRA-000191, registrado e lançado em 1952, pelo Instituto de Pesquisa Agropecuária do Norte (IPEAN), em Belém, PA. No entanto, não foi utilizada devido à baixa produção de sementes (SERRÃO E SIMÃO NETO, 1971). Somente no início da década de 60, um segundo genótipo da espécie foi introduzido no Brasil, pelo Internacional Research Institute (IRI). A australiana *B. decumbens* cv. Basilisk, originário da semente CPI 1694 proveniente do Departamento de Agricultura de Uganda em 1930, foi introduzida no interior de São Paulo pelo antigo IPEAN (atual EMBRAPA) (KARIA *et al.*, 2006), registrada como cultivar BRA-0011058. Este cultivar apresentava características agrônômicas que atendiam às necessidades dos produtores da época, tornando-se a primeira forrageira plantada em larga escala no país (FISHER E KERRIDGE, 1996; PIZARRO *et al.*, 1996). Na mesma época, foram introduzidas as australianas *B. ruziziensis* e *B. humidicola*. Posteriormente, em 1984, a espécie *B. brizantha* cv. Marandu foi lançada no mercado, apresentando tolerância à cigarrinha-das-pastagens, diferentemente da *B. decumbens*. Devido a esta característica a *B. brizantha* passou a ser a forrageira mais plantada no Brasil (KARIA *et al.*, 2006).

### 4.2 - Importância econômica da *Brachiaria*

As pastagens constituem um dos principais sistemas produtivos do mundo, ocupando cerca de 70% das áreas agricultáveis (DUBEUX JR *et al.*, 2011), e são de considerável importância em regiões de clima temperado e tropical (BRAGA, 2010). No Brasil, aproximadamente 260 milhões de hectares, sob diferentes situações de clima e solo, são cobertos por pastagens nativas e cultivadas (IBGE, 2014), principalmente com gramíneas do gênero *Brachiaria*.

A introdução de braquiária no Brasil provocou uma verdadeira revolução na produtividade das pastagens e na atividade pecuária, por viabilizar a pecuária em solos

ácidos e de baixa fertilidade, predominantes nos cerrados (COSTA *et al.*, 2006), e por criar novos pólos de desenvolvimento. Por isso, o grande interesse dos pecuaristas pelas espécies de *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola* e *B. ruziziense*, se prende ao fato de essas serem plantas com alta produção de massa verde, apresentarem poucos problemas de doenças e mostrarem bom crescimento durante a maior parte do ano, inclusive no período seco. Além disso, a importância do gênero é aumentada pela adaptabilidade que essas espécies apresentam a vários tipos de solos (SOUZA FILHO E DUTRA, 1991) e, principalmente, pela resistência à cigarrinha-das-pastagens (VALLE *et al.*, 2000).

Para salientar a importância dos pastos para a economia brasileira, deve ser observado que o Brasil possui o maior rebanho de bovinos comercial do mundo (221 milhões de cabeças) com os Estados Unidos (92,7 milhões de cabeças) e a China (83,6 milhões de cabeças) ocupando a segunda e terceira posição, respectivamente, sendo a região Centro Oeste a maior produtora com 34,4% deste efetivo (ABIEC, 2018; USDA, 2018). No entanto, segundo os dados do IBGE (2018) o tamanho efetivo do rebanho bovino brasileiro é de 170 milhões de cabeças. No mercado interno a bovinocultura de corte representa a maior fatia do agronegócio brasileiro, gerando faturamento de R\$433 bilhões em 2017 e foi responsável pela criação de 353.725 vagas de trabalho com carteira assinada, de acordo com os dados do Cadastro Geral do Empregados e Desempregados (CAGED) (ABIEC, 2018). Já no mercado internacional, hoje o Brasil é o maior exportador mundial de produtos bovinos (carne in natura, industrializada, miúdos, tripas e salgados) tendo exportado em 2017 cerca de 2,0 milhões de toneladas de produtos gerando ao País um rendimento bruto de US\$6,2 bilhões (ABIEC, 2018).

Nos últimos anos, o cultivo de *Brachiaria* tornou-se um dos principais componentes das pastagens semeadas com maior área plantada e, portanto, a mais importante neste segmento do agronegócio brasileiro. Estima-se que a área plantada no país com as quatro principais espécies de braquiária (*B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruziziensis* e *B. humidicola*) representa 85% da área coberta com forragens cultivadas (BARCELLOS *et al.*, 2001). Em 2006 mais de 60 milhões de hectares foram cultivados com um único clone de *B. brizantha* (variedade Marandu ou Brizantão) (BARBOSA *et al.*, 2006), no entanto, atualmente as variedades mais utilizadas são as Marandu, Xaraés e Piatã (EMBRAPA GADO DE CORTE, 2014).

Diante do contexto, pode-se atribuir o crescente papel que o gênero *Brachiaria* vem assumindo em todas as regiões pecuárias, por serem forrageiras de alta produção de matéria seca, onde as principais espécies se adaptam a vários tipos de solo, não apresentando problemas limitantes de doenças e seu crescimento bem distribuído durante a maior parte do ano (HUTTON, 1977).

### **4.3 - Importância do nitrogênio nas pastagens**

O nitrogênio é o principal nutriente para manutenção da produtividade das gramíneas forrageiras, sendo essencial na formação das proteínas, ácidos nucléicos, clorofila, ATP, NADH, NAPH e outros compostos que participam ativamente na síntese dos compostos orgânicos constituintes da estrutura vegetal (HARPER, 1994; MOREIRA E SIQUIRA, 2006; SOUZA E FERNANDES, 2006). O nitrogênio é portanto, responsável por características ligadas ao porte da planta, tais como o tamanho das folhas, tamanho do colmo, formação e desenvolvimento dos perfilhos (WERNER, 1986). A produtividade de gramíneas forrageiras depende da contínua emissão de folhas e perfilhos, processo importante para a restauração da área foliar após pastejo ou corte e

que garante a perenidade à forrageira (GOMIDE E GOMIDE, 2000), sem alterar a qualidade da mesma.

Os sintomas de deficiência de N são caracterizados pelo amarelecimento das folhas mais velhas, reduzindo a taxa fotossintética, proporcionando o crescimento reduzido das plantas. A deficiência deste nutriente tem sido apontada como a principal causa para a redução da produtividade e degradação das pastagens (OLIVEIRA *et al.*, 1997). Isto ocorre em pastagens que não receberam adubação nitrogenada ou que receberam o N em baixos níveis. O N fornecido adequadamente em condições favoráveis para o crescimento das plantas, proporciona aumento na produção de matéria seca e do teor de proteína, a partir da produção de carboidratos (HAVLIN *et al.*, 2005).

O N pode ser incorporado ao solo através de compostos orgânicos e/ou inorgânicos, fixação biológica (simbiótica ou não) e fixação por descargas elétricas. A mais importante fonte de N é a atmosfera (HUERGO, 2006). O nitrogênio molecular (N<sub>2</sub>), constitui 4/5 da atmosfera terrestre, no entanto, é metabolicamente indisponível a mais de 99% dos organismos vivos (GALLOWAY *et al.*, 2003) devido a estabilidade de sua ligação tripla (MADIGAM *et al.*, 2004). Cerca de 65% do total de N fixado na Terra é devida a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (NEWTON, 2002; AZEVEDO, 2010), o que a faz ser considerada o segundo processo biológico mais importante, perdendo somente para a fotossíntese (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006).

Ao pensar na conservação dos recursos não-renováveis, na preservação do meio ambiente e no ônus econômico decorrentes da compra de fertilizantes nitrogenados sintéticos pelos agricultores, considerando que a quantidade de N aplicado na agricultura varia de 40 a 200 Kg de N ha<sup>-1</sup> (BRAVIN E OLIVEIRA, 2014) e que o Brasil importa atualmente 70-80% do N utilizado na agricultura (ANDA, 2015) várias pesquisas estão sendo direcionadas ao estudo do processo da FBN (CONCEIÇÃO *et al.*, 2009; SILVA *et al.* 2010; DE MORAIS *et al.*, 2012). Devido ao grande benefício gerado por esta prática, muitos estudos têm buscado bactérias que realizam o processo de fixação de N em associação com gramíneas.

Considerando a urgência e a importância do desenvolvimento de insumos que venham a substituir ou diminuir a utilização de energias não-renováveis, a inoculação com bactérias diazotróficas pode ser uma alternativa biotecnológica na busca pela sustentabilidade dos sistemas agrícolas, uma vez que, pode promover incrementos na produção das plantações com menor dependência de fertilizantes químicos nitrogenados (BODDEY *et al.*, 1997), uma vez que estes microrganismos podem atuar na disponibilidade de N para a planta (BALDANI *et al.*, 1997).

#### **4.4 – Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas forrageiras**

A via de entrada de N por meio da FBN no sistema de pastagem é realizada por várias espécies bacterianas que podem se associar a diversas plantas em diferentes graus de especificidade levando à classificação como bactérias de vida livre e associativas que podem ainda ser classificadas como endofíticas facultativas ou endofíticas obrigatórias (BALDANI *et al.*, 1997). Esses procariontes possuem um complexo enzimático chamado de nitrogenase, que é capaz de romper a tripla ligação do N<sub>2</sub> atmosférico e provocar a sua redução até amônia (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>).

A maioria dos estudos envolvendo o isolamento e a identificação de bactérias fixadoras de N com forrageiras iniciado na década de 60 a 80 (NEYRA E DOBEREINER, 1977). Experimentos conduzidos pelo método de incorporação do <sup>15</sup>N gás, confirmaram que algumas gramíneas tropicais se beneficiam de nitrogênio fixado biologicamente (DE-POLLI, 1975; RUSCHEL, 1975; DE-POLLI *et al.*, 1977). De-Polli *et al.* (1977) por meio

dessa técnica observou a ocorrência de FBN em *B. decumbens*. Boddey e Victoria (1986) ao trabalharem com as espécies *Brachiaria humidicola* e *B. decumbens*, através da técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ , obtiveram valores de 30 a 45 Kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de N, respectivamente, advindo da FBN, enquanto Reis *et al.* (2001) usando a mesma técnica encontraram que a contribuição da fixação biológica de N em plantas de *B. decumbens* e *B. humidicola* foram de 15,0 e 12,7% e 19,4 e 9,7%, respectivamente nos períodos, seco e das águas, no município de Seropédica-RJ.

Miranda *et al.* (1990) demonstraram que entre 16% e 39% de todo o N acumulado em diferentes ecótipos de *Panicum maximum* foi proveniente do processo de fixação biológica quando avaliado através da técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ . Reis *et al.* (2001) também mostraram que entre 25 e 40% de N da planta (105 e 165 kg N ha<sup>-1</sup>) de nove cultivares de *Pennisetum purpureum* eram derivados da FBN, em uma amostragem no período seco em Seropédica-RJ. Já no trabalho realizado por Quesada (2001) na época das águas, os autores observaram uma contribuição da FBN em *P. purpureum* de até 48%. Souto e Silva (1989) em oito avaliações sob condições de campo encontraram que, entre 13 capins selecionados para Baixada Fluminense, a espécie *B. humidicola* apresentou a maior contribuição da FBN. Alves *et al.* (2000) mostraram também o ingresso total de N em pastagem de *B. humidicola*, via FBN, de 84 e 56 kg N ha<sup>-1</sup>, em taxas de lotação de 2 e 4 animais/ha, respectivamente.

Segundo Moreira *et al.*, (2010), a FBN tem mantido níveis razoáveis de produtividade em algumas áreas de pastagens sem a aplicação de adubos nitrogenados. Já Silva e colaboradores (2010), ao avaliarem a FBN em pastagem com diferentes intensidades de corte na Zona da Mata de Pernambuco, constataram contribuição da FBN, estimada com a técnica da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  em torno de 10 a 42% em pastagens formadas de *Brachiaria humidicola*, *B. decumbens* e *Pennisetum purpureum*.

Embora os estudos realizados por Boddey e Victoria (1986) e Braz *et al.* (2004), demonstraram que as contribuições da FBN não ultrapassam a 40% do N acumulado pelas plantas, Reis Junior *et al.* (2002) sugerem que é possível que, para sistemas de manejo mais extensivos em que as perdas são menos expressivas, a quantidade de N fixado seja suficiente para proporcionar um balanço positivo de N para o sistema solo-planta, e com isto, permitir uma maior longevidade da pastagem.

Nesse contexto, a interação de bactérias diazotróficas com diversas culturas tem sido tema de pesquisas no mundo todo, devido ao potencial biotecnológico evidenciado no aumento da produtividade das culturas, possibilidade de redução dos custos de produção ao diminuir o uso de adubos nitrogenados e, conseqüentemente, melhor conservação dos recursos ambientais.

#### **4.5 - Bactérias diazotróficas associativas**

De acordo com a definição sugerida por Baldani *et al.* (1997), os microrganismos diazotróficos associativos podem ser divididos em dois grupos, sendo eles os endofíticos facultativos (colonizam tanto rizosfera como interior de raízes) e os endofíticos obrigatórios, os quais colonizam o interior de raízes. No entanto, Reinhold-Hurek e Hurek (1998) para enfatizar a diferença ecológica entre os endófitos associados a gramíneas e outros microrganismos invasivos para os quais o solo é um habitat alternativo comum, propuseram o termo "endófitos oportunistas" para o último. Posteriormente, Hardoim *et al.* (2008) propuseram o termo endofítico transitório para referir as bactérias endofíticas que entram na planta por acidente na ausência de forças seletivas e se mantêm no tecido interno da planta. As primeiras espécies de bactérias diazotróficas associativas foram

isoladas de raízes e partes aéreas de espécies de importância agrícola como as gramíneas (DÖBEREINER E DAY, 1976).

Dentre as bactérias diazotróficas mais estudadas destacam-se aquelas pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Nitrospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. As mesmas já foram isolados de diversas plantas com destaque para plantas de milho (DÖBEREINER E DAY, 1976; PERIN *et al.*, 2006; ROESCH *et al.*, 2007; REIS JUNIOR *et al.*, 2008); cana-de-açúcar (DÖBEREINER E DAY, 1976; DÖBEREINER *et al.*, 1993; REIS JUNIOR *et al.*, 2000; REIS JUNIOR *et al.*, 2004); poáceas forrageiras (braquiária, capim carona e capim mimoso) no Pantanal Sul Matogrossense (BRASIL *et al.*, 2005); sorgo forrageiro (BERGAMASCHI *et al.*, 2007); gramíneas forrageiras no semiárido brasileiro (SANTOS *et al.*, 2013); gramíneas C4 mais abundantes das pastagens naturais da América do Sul (*Axonopus affinis*, *Paspalum notatum*, *Andropogon lateralis* e *Aristida laevis*) (MARQUES *et al.*, 2017); gramíneas forrageiras nativas na planície de inundação do Pantanal brasileiro (*Mesosetum chaseae*, *Axonopus purpusii* e *Hymenachne amplexicaulis*) (SOUZA *et al.*, 2017), entre outras gramíneas. Dentro deste grupo, também estão as bactérias do gênero *Gluconacetobacter* (YAMADA *et al.*, 1997), que colonizam partes internas das raízes e partes aéreas de milho e cana-de-açúcar (BALDANI *et al.*, 1997).

Bactérias do gênero *Azospirillum* são consideradas endofíticas facultativas (BALDANI *et al.*, 1997), pois, além de colonizarem os hospedeiros podem sobreviver no solo (DÖBEREINER, 1992). Os microrganismos diazotróficos do gênero *Azospirillum* podem desempenhar importante papel na reabilitação e sustentabilidade dos ecossistemas uma vez que incorporam N por meio da fixação biológica em quantidade que pode variar de 25 a 50 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> e ainda produzem e liberam substâncias reguladoras de crescimento vegetal, como auxinas, giberilinas e citocininas, as quais contribuem para melhorar a nutrição mineral e utilização de água pelas plantas (BAZZICALUPO E OKON, 2000; KUSS *et al.*, 2007).

Atualmente há 19 espécies descritas para o gênero *Azospirillum*, sendo elas, *A. brasilense* (corríg. TARRAND *et al.*, 1978) *A. canadense* (MEHNAZ *et al.*, 2007), *A. doebereineriae* (ECKERT *et al.*, 2001), *A. formosense* (LIN *et al.*, 2012), *A. halopraeferens* (REINHOLD *et al.*, 1987), *A. irakense* (KHAMMAS *et al.*, 1989), *A. largimobile* (corríg. (SKERMAN *et al.*, 1983) BEN DEKHIL *et al.*, 1997), *A. lipoferum* (TARRAND *et al.*, 1978), *A. melinis* (PENG *et al.*, 2006), *A. oryzae* (XIE E YOKOTA, 2005), *A. picis* (Lin *et al.*, 2009), *A. rugosum* (YOUNG *et al.*, 2008), *A. thiophilum* (LAVRINENKO *et al.*, 2010), *A. zea* (MEHNAZ *et al.*, 2007), e todas elas de ocorrência em regiões tropicais. A *A. amazonense* (MAGALHÃES *et al.*, 1983), teve o nome da sua espécie alterada para *Nitrospirillum amazonense* (LIN *et al.*, 2014). Nestas duas décadas de pesquisa, um volume considerável de informações foi acumulado sobre as associações dessas bactérias com diversas espécies de gramíneas (LPSN, 2017).

A espécie *Nitrospirillum amazonense* possui uma ampla distribuição ecológica, já tendo sido isolada de *Brachiaria* spp. (MAGALHÃES *et al.*, 1983; LANGE E MOREIRA, 2002; REIS JUNIOR *et al.*, 2004, BRASIL *et al.*, 2005), *Paspalum* e *Panicum* (LANGE E MOREIRA, 2002), além de outras gramíneas como milho (MAGALHÃES *et al.*, 1983; BALDANI, 1984; LANGE E MOREIRA, 2002; REIS JUNIOR *et al.*, 2008), cana-de-açúcar (BALDANI *et al.*, 1999, REIS JUNIOR *et al.*, 2000), arroz (MAGALHÃES *et al.*, 1983; CARDOSO *et al.*, 2010), trigo (LANGE E MOREIRA, 2002), sorgo (MAGALHÃES *et al.*, 1983; BALDANI, 1984). Lange e Moreira (2002) em seus estudos observaram a presença de *N. amazonense* em diversas culturas, como por exemplo de tomate, orquídea, bambu e café.

Dentre as espécies de *Azospirillum* citadas, as mais estudadas são a *A. lipoferum* e a *A. brasilense*. Ambas as espécies são encontradas frequentemente colonizando a maioria das plantas de regiões tropicais e temperadas de interesse agrônomo como milho, sorgo, arroz e trigo (BALDANI *et al.*, 1984; BALDANI *et al.*, 1997), e de gramíneas forrageiras como *Panicum maximum*, *Brachiaria mutica*, *Pennisetum purpureum* (DÖBEREINER E PEDROSA, 1987). *A. lipoferum* também foi isolada de raízes de cevada na região sul do Brasil (DIDONET E DIDONET, 1998), predominante em raízes e folhas da forrageira *Miscanthus sinensis* cultivada na Alemanha (KIRCHHOF *et al.*, 1997) e representou 85% dos isolados de *Azospirillum* obtidos de solo cultivados com arroz nas Filipinas (LADHA *et al.*, 1987).

No Brasil, espécies de *Azospirillum* nativas ocorrem em abundância nos solos agrícolas, limitando a introdução de estirpes selecionadas. Porém, com o uso de estirpes selecionadas e marcadas com resistência a antimicrobianos, foi possível observar o efeito da inoculação do *A. brasilense* em plantas de sorgo, trigo (BALDANI *et al.*, 1986a) e milho, sendo o efeito benéfico da inoculação de algumas estirpes (Sp245) relacionado principalmente com o melhor aproveitamento dos nitratos do solo (BODDEY *et al.*, 1986).

Segundo Hungria (2011), inoculantes compostos por duas variantes da espécie de *Azospirillum brasilense* são comercializados para inoculação em trigo e milho, obtendo um aumento na produtividade de grãos de 31% em trigo e 26% em milho. Oliveira *et al.* (2007). Em estudos realizados com capim marandu inoculados com estirpes de *A. brasilense* foram observados que o tratamento sem aplicação de nitrogênio mineral e com inoculação produziu 25,1 kg ha<sup>-1</sup> de forragem sendo essa produção foi maior quando comparado à testemunha sem aplicação de N fertilizante e sem inoculação (22,6 kg ha<sup>-1</sup> de forragem).

A partir das últimas décadas outras bactérias passaram a ser estudadas quanto à associação com gramíneas, com destaque para *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Burkholderia tropica*, as quais possuem um modo de colonização diferente de *Azospirillum*, pois são consideradas endofíticas obrigatórias (BALDANI E BALDANI, 2005).

A primeira espécie endófito a ser identificada foi a *H. seropedicae* com estirpes isoladas de arroz, milho e sorgo (BALDANI *et al.*, 1986b), mas também já foi isolada de gramíneas forrageiras (DÖBEREINER *et al.*, 1993), assim como de banana e abacaxi (WEBER *et al.*, 1999) e palmeiras (FERREIRA *et al.*, 1995). Posteriormente, outras espécies fixadoras de nitrogênio do gênero foram incluídas como o *H. rubrisubalbicans* (BALDANI *et al.*, 1996 b) e *H. frisingense* (KIRCHHOF *et al.*, 2001). Existem relatos da associação de *H. rubrisubalbicans* em cana-de-açúcar, sorgo e gramíneas do gênero *Miscanthus* (OLIVARES *et al.*, 1997; JAMES E OLIVARES, 1998; KIRCHHOF *et al.*, 1997).

A presença deste gênero também já foi observada em variedades de cana (REIS JUNIOR *et al.*, 2000), variedades de milho (REIS JUNIOR *et al.*, 2008), cultivares de sorgo forrageiro (BERGAMASCHI *et al.*, 2007), e gramíneas forrageiras do Pantanal Matogrossense (BRASIL *et al.*, 2005). Os representantes do gênero *Herbaspirillum* são considerados bactérias endofíticas e apresentam baixa sobrevivência no solo (BALDANI *et al.*, 1996a). *Herbaspirillum spp.* são capazes de colonizar nichos específicos no interior dos tecidos vegetais, podendo transferir de forma mais eficientemente para planta os compostos nitrogenados produzidos e ainda não sofrerem limitações de substâncias ricas em carbono (OLIVARES *et al.*, 1997).

O gênero *Burkholderia* possui 117 espécies descritas com grande diversidade funcional (LPSN, 2018), atualmente este gênero foi dividido em três, estes sendo *Burkholderia*, *Paraburkholderia* (SAWANA *et al.*, 2014) e *Caballeronia* (DOBRITSA E SAMADPOUR, 2016). O primeiro gênero foi destinado para agrupar as bactérias patogênicas, já o segundo gênero foi para agrupar as espécies ambientais e o terceiro gênero agrupa tanto as bactérias patogênicas como as ambientais. A capacidade deste gênero em realizar a FBN foi observada inicialmente para *B. vietnamiensis* (TRÂN VAN *et al.*, 1996), sendo mais tarde estendida às demais espécies, como *B. kururiensis* (ESTRADA-DE LOS SANTOS *et al.*, 2001), *B. unamae* (CABALLERO-MELLADO *et al.*, 2004), *B. tropica* (REIS *et al.*, 2004; WEBER *et al.*, 2000) e *B. silvatlantica* (PERIN *et al.*, 2006). Geralmente, essas bactérias são encontradas em maior número nas raízes, decrescendo progressivamente do caule às folhas (CANUTO *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2005). Estirpes de *Paraburkholderia tropica* já foram isoladas de cultivares de sorgo forrageiro (BERGAMASCHI *et al.*, 2007) e de solos de pastagem da Amazônia (SILVA *et al.*, 2011).

Segundo Baldani *et al.* (1995) quando as bactérias foram inoculadas com *H. seropedicae* em plantas de arroz, elas foram responsáveis por 19 a 35% do N acumulado na planta derivado do processo da FBN. Estudos de inoculação em arroz com estirpes de *H. seropedicae* e *Burkholderia ssp.*, em casa de vegetação, mostraram aumentos de 17-19% e 11-20%, respectivamente, do N derivado do processo da FBN (BALDANI, 1996 a). Em condições de campo, dependendo da variedade de arroz, o incremento na produção pode chegar a 50% quando a inoculação é efetuada com estirpes selecionadas (GUIMARÃES *et al.*, 2003).

Sendo assim, o uso de bactérias diazotróficas como forma de fornecimento de N para a produção de gramíneas, pode ser uma das saídas para redução na aplicação de adubos nitrogenados nas pastagens.

#### **4.6 - Avaliação da capacidade funcional das estirpes**

As bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) são aquelas capazes de promover o desenvolvimento da planta de forma direta ou indireta (BULGARELLI *et al.*, 2013). Na promoção na forma direta, por exemplo, as bactérias sintetizam compostos ou facilitam a absorção de certos nutrientes do meio ambiente, fornecendo desta forma para a planta, o nitrogênio fixado, fósforo solubilizado (KUKLINSKY SOBRAL *et al.*, 2004), Fe pela produção de sideróforos (RAAIJMAKERS *et al.*, 1995) e fitormônios como auxina (GUTIERREZ-MANERO *et al.*, 2001). Na promoção indireta do crescimento, a bactéria diminui ou previne os efeitos deletérios de organismos patogênicos (GLICK E BASHAN, 1997), pela síntese de sideróforos (NEILANDJS E LEONG, 1986), antibióticos e aumento da resistência a estresses abióticos. Esses benefícios contribuem para uma maior disponibilização de nutrientes podendo acarretar uma maior absorção pela planta e, conseqüentemente, melhor manejo da sua nutrição.

As BPCV podem colonizar abundantemente a rizosfera, invadir o córtex e colonizar tecidos internos em diversas espécies vegetais (BALDANI *et al.*, 1997). Essas bactérias associadas aos vegetais são chamadas de endofíticas quando habitam o interior da planta hospedeira sem causar dano aparente (STURZ *et al.*, 1998). Segundo Dobereiner (1992) a colonização do interior dos tecidos das plantas pode conferir vantagens sob as bactérias que colonizam a rizosfera, podendo influenciar com mais eficiência no crescimento da planta, visto que no interior do vegetal a competição microbiana é menor, este nicho é menos sujeito a flutuações ambientais e a interface de troca de metabólitos é mais direta quando comparada com a rizosfera (PERIN *et al.*,

2003). É válido ressaltar também que entre as bactérias existe uma grande variabilidade inter e intraespecífica na capacidade de estabelecimento endofítico e que os genes envolvidos na capacidade de infecção bacteriana e colonização endofítica não são totalmente conhecidos. A maioria dos estudos de adesão, infecção e colonização são realizados em gramíneas utilizando estirpes do gênero *Azospirillum*, sendo que diferentes estirpes da espécie *A. brasilense* apresentam ou não a capacidade de estabelecimento endofítico conforme o genótipo vegetal (BALDANI *et al.*, 1997). Com base nos benefícios das BPCV, os estudos utilizando misturas de inoculantes apresentam-se muito promissores (BERG, 2009). Benefícios promovidos pela interação planta x BPCV incluem aumentos na taxa de germinação de sementes, produtividade, a absorção de nutrientes, teor de proteína, tolerância a estresses, massa de parte aérea e raízes, controle biológico e atraso na senescência (BASHAN *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2009).

#### 4.6.1-Capacidade de fixar nitrogênio atmosférico

Estos conduzidos em cana-de-açúcar mostram que as melhores respostas a inoculação com as bactérias (*G. diazotrophicus* estirpe BR11281, *N. amazonense* estirpe BR11115, *H. rubrisubalbicans* estirpes BR11335 e BR11504 e *Burkholderia sp.* estirpe BR11366) foram observadas em solo de baixa fertilidade (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Segundo os autores, essas bactérias contribuem mais para o aumento no conteúdo de nitrogênio quando estão em condições restritivas em plantas de cana-de-açúcar. Essas bactérias são incapazes de suprir totalmente a demanda de N das plantas somente pela FBN, porém, podem influenciar significativamente a nutrição nitrogenada das culturas as quais estão associadas, aumentando a capacidade de assimilação de N, indiretamente, com o aumento do sistema radicular, ou diretamente, estimulando o sistema de transporte de N nas plantas (MANTELIN E TOURAINÉ, 2004). Estudos em cana-de-açúcar mostraram aumentos na massa fresca de colmos, na massa de matéria seca de raiz (OLIVEIRA *et al.*, 2002) e até aumento na produtividade dessa cultura (OLIVEIRA *et al.*, 2006) em plantas inoculadas com bactérias diazotróficas endofíticas. A maior produção de matéria seca em plantas inoculadas com bactérias indica um possível estímulo da fotossíntese.

#### 4.6.2 - Solubilização de fosfato inorgânico

No solo, o fósforo é sujeito a inúmeros processos biogeoquímicos que alteram sua disponibilidade. Entre esses processos, destaca-se a dissolução de fosfatos, que os torna disponíveis para as plantas (WHITELAW, 2000). Diversos microrganismos do solo, incluindo bactérias e fungos, possuem capacidade para solubilizar fosfatos por meio de diferentes mecanismos, como produção de fosfatases para solubilizar o P-orgânico no solo, e pela produção de ácidos orgânicos como o glucônico, 2-cetoglucônico, láctico, isovalérico, isobutírico, acético, glicólico, oxálico, malônico e succínico para solubilização do P-inorgânico no solo (BANIK E DEY, 1982; RODRÍGUEZ E FRAGA, 1999; SILVA FILHO E VIDOR, 2000).

As bactérias solubilizadoras de fósforo atuam sobre o fosfato inorgânico por meio da produção de ácidos orgânicos, como o glucônico, oxálico, succínico (MARRA *et al.*, 2012) e inorgânicos e/ou redução do pH, obtendo-se então o fosfato disponível para as plantas (NAUTIYAL, 1999; VASQUEZ *et al.*, 2000; VASSILEV E VASSILEVA, 2003).

A inoculação de microrganismos solubilizadores de fosfatos ou o manejo de suas populações têm sido sugeridos como forma de substituir ou diminuir o uso de fertilizantes fosfáticos solúveis, mediante um melhor aproveitamento dos fosfatos naturais existentes

ou adicionados ao solo e dos formados pela aplicação de fontes solúveis (KIM *et al.*, 1998). Para serem utilizados num programa de inoculação controlada, os microrganismos devem apresentar, entre outras características, grande capacidade e alto potencial de solubilização de fosfatos, ou seja: devem solubilizar vários tipos de fosfatos, como  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{Al}(\text{H}_2\text{PO}_4)_3$ , e  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , e a solubilização deve ser de alta intensidade (MARRA *et al.*, 2012).

Rodríguez e Fraga (1999) comprovaram a capacidade de algumas estirpes de espécies do gênero *Azospirillum* em solubilizar fosfato inorgânico. Souchie *et al.* (2007) relatam que o entendimento da capacidade e da eficiência de microrganismos em solubilizar fosfatos, pode levar à seleção de isolados com alto potencial de uso para a inoculação em plantas. O fósforo exerce papel importante no metabolismo das plantas, participando da fotossíntese, respiração, armazenamento e transferência de energia, transferência de genes e na reprodução (STAUFFER E SULEWSKI, 2004), que é o segundo nutriente limitante do crescimento em plantas, depois do nitrogênio (GYANESHWAR *et al.*, 2002), e em solos tropicais a sua oferta é muito baixa. Diversos microrganismos associativos podem atuar de forma direta na promoção do crescimento vegetal, como *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, por meios de mecanismos como a solubilização de fosfato (RODRÍGUEZ *et al.*, 2000; VERMA *et al.*, 2001; PEDRINHO *et al.*, 2010; VIDEIRA *et al.*, 2012; ESTRADA *et al.*, 2013).

#### 4.6.3 - Solubilização de óxido de zinco

O zinco desempenha importantes funções nas plantas, especialmente como ativador enzimático, sendo requerido para a síntese do triptofano, um precursor da biossíntese do ácido indol acético (AIA) (MENGEL E KIRKBY, 1987), além de atuar em várias respostas fisiológicas. O desequilíbrio nutricional, principalmente deste micronutriente, tem sido um dos fatores na diminuição da produção de sementes. Suas funções básicas na planta estão relacionadas ao metabolismo de carboidratos, proteínas (KITAGISHI *et al.*, 1987; OBATA E UMEBAYASHI, 1988) e fosfatos, contribuem na estrutura das membranas celulares, além da formação da estrutura RNA e ribossomos (BORKET, 1989), no metabolismo dos fenóis, no aumento do tamanho e multiplicação celular e na fertilidade dos grãos de pólen (MALAVOLTA *et al.*, 1991).

Os solos tropicais, em geral, apresentam baixa disponibilidade de zinco (Zn), seja pela pobreza do material de origem ou pelo cultivo intensivo, sem a devida reposição desse micronutriente (LOPES, 1984). Assim, a carência de Zn é reconhecida como problema nutricional mundial para a produção agrícola, principalmente para o cultivo de cereais, que são exigentes neste nutriente, reduzindo as colheitas e a qualidade nutricional dos grãos. O zinco é transformado, principalmente, em carbonato de zinco em solos muito calcários, reage com ferro e óxido de manganês, e pode ser convertido em fosfato de zinco em solos adubados com fósforo (BARUAH E BARTHAKUR, 1999). Assim, se um isolado tem a capacidade de solubilizar formas insolúveis de zinco em uma forma solúvel, poderá contribuir significativamente para a produtividade da cultura.

Neste sentido, a solubilização de zinco por microrganismos é benéfica e economicamente importante; todavia, poucos são os dados disponíveis na literatura para a solubilização de zinco por bactérias associadas a plantas (DI SIMINE *et al.*, 1998; FASIM *et al.*, 2002; SARAVANAN *et al.*, 2007a, INTORNE *et al.*, 2009; GOTETI *et al.*, 2013; KAMRAN *et al.*, 2017)

Assim como ocorre com o fósforo, as formas de zinco inorgânico são solubilizadas por ácidos orgânicos, ligantes quelados e sistemas de oxirredução na superfície celular e membranas. Em algumas condições, entretanto, o acúmulo de ácido

glucônico resulta na acidificação do meio, o qual contribui para a solubilização de nutrientes (GOLDSTEIN *et al.*, 1993; BABU-KHAN *et al.*, 1995). Saravanan e colaboradores (2007a e 2007b) relataram que em *G. diazotrophicus* o ácido 5-cetoglucônico está presente durante o processo de solubilização de ZnO, apesar de existir a produção de outros ácidos em quantidade muito reduzida. Estudos acerca das vias de mobilização de zinco, utilizando um banco de mutantes de *G. diazotrophicus* PAL5, revelaram que genes envolvidos na síntese do ácido 5-cetoglucônico são essenciais para o processo de solubilização destes elementos (INTORNE *et al.*, 2009).

#### 4.6.4 - Produção de sideróforos

O ferro é um nutriente essencial para as plantas, mas relativamente insolúvel na solução solo. As plantas preferem para absorção formas de ferro reduzidas, como íon  $Fe^{2+}$ , mas íons  $Fe^{3+}$  são mais comuns no solo (MIETHKE E MARAHIEL, 2007). Os sideróforos são moléculas secretadas por microrganismos que sequestram ferro de baixo peso molecular e o disponibilizam para as plantas em forma de complexo sideróforo- $Fe^{3+}$  (WANG *et al.*, 1993; MIETHKE E MARAHIEL, 2007). Os sideróforos são sintetizados em resposta à baixa disponibilidade de  $Fe^{3+}$  em solução e atuam como promotores de crescimento vegetal, uma vez que disponibilizam o ferro absorvido para o crescimento vegetal, além de imobilizar o ferro que estaria disponível para o crescimento de patógenos (VESSEY, 2003).

Embora os sideróforos tenham como papel principal a captação de ferro, eles são capazes de quelar outros íons metálicos, como manganês, níquel, zinco e alumínio, porém, com menor afinidade quando comparados ao íon férrico (NEILANDS, 1995; DILWORTH *et al.*, 1998; ROY E CHAKRABARTTY, 2000). Como benefício aos vegetais, a capacidade de captar complexos  $Fe^{3+}$ -sideróforo por determinados microrganismos pode impedir a proliferação de patógenos ao redor das raízes, devido ao sequestro de ferro do ambiente rizosférico.

Uma vez que os sideróforos não são produzidos por todas as bactérias, tal característica pode ser um critério de seleção de estirpes em solos com baixa disponibilidade de ferro (CARSON *et al.*, 1992). Exemplos de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCV) com esta atividade incluem *P. putida* e *P. aeruginosa*, que inibem o crescimento dos patógenos de tomate *Fusarium oxysporum* e *Pythium*, respectivamente (VANDENDERGH E GONZALEZ, 1984; BUYSSENS *et al.*, 1995).

Estudos sobre a comunidade endofítica de diferentes plantas de interesse econômico demonstram que os gêneros *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum* além de participar da FBN, podem ainda produzir sideróforos e desta maneira fornecer cátions de ferro presentes no solo para planta. Luvizotto (2008) demonstrou que os melhores produtores de sideróforos pertencentes ao gênero *Burkholderia* foram os isolados da rizosfera, capacidade esta que pode estar relacionada com a maior competitividade nestes ambientes rizosféricos. Logeshwaran *et al.* (2009) realizaram o primeiro estudo de identificação de sideróforos produzido por o isolado de *G. diazotrophicus*, e os resultados revelaram a capacidade dessas bactérias de produzirem sideróforos do tipo salicilato, catecol e hidroxamato.

Chaiharn *et al.* (2009) com o objetivo de selecionarem bactérias produtoras de sideróforos com potencial para o biocontrole de doenças fúngicas em arroz, conseguiram 134 isolados bacterianos de *Bacillus sp.* e *Pseudomonas sp.*, dos quais apenas 23,1% destes isolados produziram sideróforos, e dentre eles, possuíam atividade antagônica significativa a patógenos fúngicos.

Estudos mostram que todos os compostos quelantes identificados pertencentes à função sideróforos, possuem estruturas distintas; entretanto, a natureza dos grupos funcionais que coordenam a solubilização de  $Fe^{3+}$  são bastante parecidas (BOUKHALFA E CRUMBLISS, 2002; KREWULAK E VOGEL, 2007). Em geral, os sideróforos contêm pelo menos um ácido hidroxâmico (hidroxamatos), um catecol (catecolatos) e/ou um ácido  $\alpha$ -hidroxicarboxílico ( $\alpha$ -hidroxicarboxilatos) como sítios ligantes. Para determinação dos tipos de sideróforos produzidos pelas bactérias, são empregados dois métodos, o método de CSÁKY (1948) que permite a identificação de sideróforos do tipo hidroxamato e o método de Arnow (1937) que permite a identificação de sideróforos do tipo catecolato.

#### 4.6.5 - Capacidade celulolítica

As bactérias endofíticas podem penetrar nos tecidos vegetais através de aberturas naturais e feridas, como também penetrar ativamente nestes tecidos através da produção de algumas enzimas, como as celulasas e outras enzimas hidrolíticas, visto que paredes de células vegetais são constituídas principalmente de celulose e pectina (na lamela média) (VERMA *et al.*, 2001). As bactérias que produzem esse tipo de enzima podem beneficiar seu hospedeiro inibindo patógenos fúngicos, por meio da degradação das células da parede celular com a ação de enzimas tais como  $\beta$ -1,4 glucanases, levando a lise da parede celular e conseqüentemente a morte deste patógeno (DOBBELAERE *et al.*, 2003). Além da bactéria obter vantagens nutricionais; pois a celulose é uma importante fonte de energia e nutrientes para os organismos capazes de degradá-la (PASCHOLATIE LEITE, 1995), aumentam também seus meios de penetração na planta, tal fato já foi observado por Steenhoudt e Vanderleyden (2000) nos gêneros *Azospirillum* e *Azoarcus*.

#### 4.6.6 - Produção de ácido indolacético (AIA)

O ácido indol-3-acético (AIA) é um fitormônio que está envolvido na divisão, extensão, diferenciação celular; estímulo à germinação das sementes; aumento da velocidade de desenvolvimento do xilema e das raízes; controle dos processos de crescimento vegetativo; início da formação das raízes laterais e adventícias; mediação das respostas à luz, gravidade e florescimento; influência na fotossíntese; formação de pigmentos; biossíntese de vários metabólitos, e a resistência a condições de estresse (GLICK, 2012). Adicionalmente, promove o crescimento das raízes e a proliferação dos pelos radiculares, aumentando assim a absorção de água e sais minerais do solo, e, portanto, obtém-se melhor crescimento das plantas.

O AIA bacteriano também promove a descamação de células da raiz e como resultado aumenta a rizodeposição promovendo maior disponibilidade de nutrientes para as bactérias da rizosfera (GLICK, 2012). Além disso, pode promover o crescimento das plantas de forma indireta, influenciando na atividade da enzima ACC desaminase (1-aminociclopropano-1-carboxilato), que é um precursor do etileno (PATTEN E GLICK, 2002). De acordo com Li e Glick (2001), bactérias mutantes promotoras de crescimento vegetal, que não possuem a capacidade de produzir ACC desaminase, também não apresentam a habilidade de estimular o alongamento das raízes. Tal fato pode ser devido ao AIA produzido pelas bactérias poder aumentar a transcrição e atividade da ACC sintase, que catalisa a produção de ACC nas plantas (LI E GLICK, 2001).

A produção de ácido indolacético é comumente observado em bactérias diazotróficas e promotoras de crescimento como *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum*, *Nitrospirillum amazonense*, *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp., *Enterobacter* sp., *Burkholderia* sp, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*,

*Bacillus* sp. entre outras (VESSEY, 2003; PEDRAZA, *et al.*, 2004; VIDEIRA *et al.*, 2012; JI *et al.*, 2014).

Thuler e colaboradores (2003) trabalhando com isolados de *Azospirillum* spp. no interior de raízes de mandioca, em meio “*in vitro*”, verificaram a excreção de hormônios como AIA e etileno, além de reguladores de crescimento, como poliaminas, e produção de aminoácidos. Na literatura, há três vias metabólicas para a produção de AIA pelo *Azospirillum*: duas dependentes de triptofano, denominadas indole-3-acetamida (IAM) e indole-3-piruvato (IpyA), e a terceira via independente de presença de triptofano (DOBBELAERE *et al.*, 1999; LAMBRECHT *et al.*, 2000).

O AIA é o mais importante fitormônio produzido por *Azospirillum*, conforme descrito por Dobbelaere *et al.* (2003). As alterações radiculares detectadas em plantas inoculadas com *Azospirillum* e *Nitrospirillum* mostraram um aumento no número e comprimento de pêlos nas raízes, número de raízes laterais, diâmetro e comprimento de raízes laterais e adventícias, e área de superfície de raiz devido a maior produção de AIA (BASHAN *et al.*, 2004). A produção desse fitormônio é considerada como o principal mecanismo responsável para o aumento do sistema radicular, podem explicar a melhor absorção de minerais pela planta (MEHNAZ, 2015).

Apesar da grande produção de AIA em culturas bacterianas *in vitro*, não se conhece ainda como ocorre o processo no interior das plantas ou na região rizosférica (STEENHOUDT E VANDERLEYDEN, 2000). Muitas estirpes de *Azospirillum* e *Nitrospirillum* são encontradas em raízes de gramíneas forrageiras como *Brachiaria* spp. (REIS JUNIOR *et al.*, 2004; BRASIL *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2013), *Paspalum* e *Panicum* (LANGE E MOREIRA, 2002), *Pennisetum* (VIDEIRA *et al.*, 2012), sendo o crescimento verificado nestas culturas pode ser devido à produção e excreção de auxinas por esses dois gêneros bacterianos (LODEWYCKX *et al.*, 2002).

Pedraza *et al.* (2004) ao trabalharem com *G. diazotrophicus*, *G. azotocaptans*, *G. johannae*, *A. brasilense*, *A. lipoferum* e *P. stutzeri*, consideraram que as quantidades de AIA excretadas pelos isolados dependem da espécie ou até mesmo da estirpe que está em estudo, assim como das condições em que são cultivados os organismos, tais como: presença ou ausência do precursor do AIA no meio de cultura (triptofano), oxigenação, pH e fase de crescimento em que se encontram os isolados. Patten e Glick (2002) verificaram que *P. putida* aumentou de 35 % a 50% o crescimento primário das raízes de canola (*Brassica campestris*), devido à produção de AIA. Eles demonstraram diretamente que o fito-regulador bacteriano tem um papel importante na alongação da raiz, quando a bactéria produtora está associada à planta hospedeira.

## 5 - REFERÊNCIAS

- ABIEC 2018- Associação Brasileira da Indústria Exportadora de Carnes. Exportações de carne bovina do Brasil. Disponível em: <http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>. Acesso em: 27 jul. 2018.
- ANDRADE, R. P. Tecnologia de produção de sementes do gênero *Brachiaria*. **Simpósio sobre manejo da pastagem**, v. 11, p. 49-71, 1994.
- ARNOW, L.E. Colorimetric determination of the components of 3,4- dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. **Journal of Biological Chemistry**, v.118, p.531-537, 1937.
- AZEVEDO, P.T.M. **Minhocas, fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em mudas de Araucaria angustifolia**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- BABU-KHAN, S. et al. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. **Appl Environ Microbiol.**, v.61, p.972-978, 1995.
- BALDANI, J. I. **Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com as outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1984
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.
- BALDANI, J. I. et al. A fourth azospirillum species from cereal roots. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 56, p. 365, 1984
- BALDANI, J. I. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986b.
- BANDANI, J. I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.911-922, 1997.
- BALDANI, J. I. et al. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**, 1999.
- BALDANI, V. L. D. **Efeito de inoculação de *Herbaspirillum spp.* no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Marco, 1996.
- BALDANI, V. L. D. Establishment of inoculated *Azospirillum spp.* in the rhizosphere and roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, v. 90, n.1-3, p.35-46, 1986a.
- BALDANI, V. L. D. et al. Localization of *Herbaspirillum spp* and *Burkholderia sp.* in rice root system. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIOLOGICAL ECOLOGY**. 1995.
- BANIK, S. E DEY, B. K. Available phosphate content of an alluvial soil is influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing microorganisms. **Plant Soil**, v. 69, n. 3, p.353-64, 1982.
- BARBOSA, J. D. et al. Fotossensibilização hepatógena em equinos pela ingestão de *Brachiaria humidicola* (Gramineae) no Estado do Pará. **Pesq. Vet. Bras**, v.26, n.3, p. 147-153, 2006.
- BARCELLOS, A. de O. et al. Potencial e uso de leguminosas forrageiras dos gêneros *Stylosanthes*, *Arachis* e *Leucaena*. **Simpósio sobre Manejo da Pastagem**, v. 17, p. 297-357, 2000.
- BARUAH, T. C.; BARTHAKUR, H. P. In: A Textbook of Soil Analysis. *Vikas publishers*, New Delhi, India, p. 193-196, 1999.

- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 103-121, 1997
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Can J Microbiol**, v. 50, n. 8, p. 521-77, 2004.
- BAZZICALUPO, M.; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: PEDROSA, F. et al. (eds). Nitrogen Fixation: from molecules to crop productivity. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 409-413.
- BEN DEKHIL, S. et al. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *Largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **Syst. Appl. Microbiol.**, n.20, p.72-77, 1997.
- BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.84, p.11-18, 2009.
- BERGAMASCHI L. et al. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. **Ciência Rural**. v. 37, n. 3, p. 727-33, 2007.
- BODDEY, R. M.; VICTORIA, R. L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using <sup>15</sup>N – labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**, The Hague, v.90, p.265-292, 1986.
- BODDEY, R. M. et al. The contribution of biological nitrogen fixation for sustainable systems in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.29, p.787-799, 1997.
- BODDEY, R. M. et al. Brazilian agriculture: the transition to sustainability. **Journal of Crop Production**, v.9, p.593-621, 2003.
- BRAGA, G. J. Sequestro de carbono em pastagens cultivadas. *Pesquisa e tecnologia*, v. 7, 2010.
- BRASIL, M. da S. et al. Efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas forrageiras do Pantanal. **Pasturas Tropicais**, v. 27, n. 3, p. 22-33, 2005.
- BRAZ, S. P. et al. Degradação de pastagens, matéria orgânica do solo e a recuperação do potencial produtivo em sistemas de baixo input tecnológico na região dos cerrados. **Seropédica, Embrapa**, 2004.
- BORKET, C. M. Micronutrientes na planta. In: BÜLL, L. T.; ROSOLEM, C. A. (Ed.). Interpretação de análise química de solo e planta para fins de adubação. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 1989. p. 309-329.
- BOUKHALFA, H.; CRUMBLISS, A. L. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. **BioMetals**, v. 15, p. 325-339, 2002.
- BULGARELLI, D. et al Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.
- BUYSENS, S.; HOFTE M.; POPPE J. Biological control of pythium sp in soil and nutrient film technique systems by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. **Acta Horticulturae**, v. 382, n.27, p. 238-24, 1995.
- CABALLERO-MELLADO, J. et al. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1165-1172, 2004.
- CARDOSO, I. C. M. et al Ocorrência de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* em arroz irrigado no estado de Santa Catarina. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.9, n.2, p. 178-186, 2010.

CANUTO, E. L. et al. Resposta de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. **Agronomia**, v.37, p.67-72, 2003.

CARSON, K.C.; DILOWRTH, M.J.; GLENN, A.R. Siderophore production and iron transport in *Rhizobium leguminosarum* bv viande MNF710. **Journal of Plant Nutrition**, v. 15, n. 10, p.2203-2220, 1992.

CHAIHARN, M.; CHUNHALEUCHANON, S.; LUMYONG, S. Screening siderophore producing bacteria as potencial biological control agente for fungal rice pathogens in Thailand. **World J. microbiol. Biotecnol**, v.25, n.11, p.1919-1928, 2009.

CLEGG, M.; ZURAWSKI, G. Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny: present status and future prospects. In: **Molecular systematics of plants**. Springer, Boston, MA, 1992. p. 1-13.

CONCEIÇÃO, P. M. et al. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.1880-1883, 2009.

COSTA, KA de P.; DE OLIVEIRA, I. P.; FAQUIN, Valdemar. Adubação nitrogenada para pastagens do gênero *Brachiaria* em solos do Cerrado. **Embrapa Arroz e Feijão-Documentos (INFOTECA-E)**, 2006.

CSÁKY, T. Z. On the estimation of bound hydroxylamine in biological materials. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 2, p. 450-454, 1948.

CUNHA, F.F. et al Características morfogênicas e perfilhamento do *Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia irrigado. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 3, p. 628-635, 2007.

DE MORAIS, R. F. et al. Contribution of biological nitrogen fixation to Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Plant and Soil**, v.356, n. 1-2, p. 23-34, 2012.

DE-POLLI, H. Ocorrência de fixação de  $^{15}\text{N}_2$  nas gramíneas tropicais *Digitaria decumbens* e *Paspalum notatum*. Dissertação de Mestrado, ESALQ, 1975.

DE-POLLI, H. et al. 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**. Embrapa Amazônia Oriental, 2011.

DIAS-FILHO, M. B.; SERRÃO, EAS; FERREIRA, J. N. Processo de degradação e recuperação de áreas degradadas por atividades agropecuárias e florestais na Amazônia brasileira. **Agricultura tropical: quatro décadas de inovações institucionais e políticas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v. 2, p. 293-305, 2008.

DIDONET, A. D.; DIDONET, CCGM. Caracterização fisiológica, bioquímica e molecular de isolados de *Azospirillum spp.* obtidos de raízes de cevada. **Fertbio98. Interrelação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas: Consolidando um Paradigma**. Caxambu, v. 11, p. 187, 1998.

DILWORTH, M. J. et al. *Rhizobium leguminosarum* bv. Viciae produces a novel cyclin trihidroxamate siderophore, vicibactin. **Microbiology**, n.144, p.781-191, 1998.

DI SIMINE, C. D.; SAYER, J. A.; GADD, G. M. Solubilization of zinc phosphate by a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from a forest soil. **Biol. Fertil. Soils**, v. 28, p. 87-94, 1998.

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

DOBBELAERE, S. et al. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, v. 212, p. 155-164, 1999.

- DÖBEREINER, J. History and new perspective of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 1992.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: **Proceedings of the 1st international symposium on nitrogen fixation**. Washington State University Press Pullman, 1976. p. 518-538.
- DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Science Tech Publishers, 1987.
- DÖBEREINER, J. et al. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. In: **New horizons in nitrogen fixation**. Springer, Dordrecht, 1993. p. 671-676.
- DOBRITSA, A. P.; SAMADPOUR, M. Transfer of eleven species of the genus *Burkholderia* to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov. to accommodate twelve species of the genera *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** n. 66, p. 2836-2846, 2016.
- ECKERT, B. et al. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen -fixing bacterium associated with the C<sub>4</sub> -grass *Miscanthus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, n. 51, p.17-26, 2001.
- EMBRAPA GADO DE CORTE (2014) Artigo: Manejo de pastos de *Brachiaria brizantha*
- ESTRADA, G. A. et al. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and soil**, v. 369, n.1-2, p.115-129, 2013.
- ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2790-2798, 2001.
- FASIM, F. et al. Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from the air environment of a tannery. **FEMS Microbiology Letters**. v.213, p.1-6, 2002.
- FERREIRA, A. C. et al. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in oil palm trees. In: **International Symposium on Sustainable Agriculture for the tropics-The role of biological nitrogen fixation, 1995**. EMBRAPA, 1995.
- FIGUEIREDO, M. V. et al. Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. **Guaíba: Agrolivros**, 2008.
- FISHER, M. J.; KERRIDGE, P. C. (1996) The agronomy and physiology of *Brachiaria* species. In: MILES, J. W.; MASS, B. L. D.; VALLE, C. B. (Ed.) **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali-Colombia: CIAT; Campo Grande – Brasil: Embrapa, v.1, p.43-52.
- FRANCO, J. B. S.; ROSA, R. Metodologia de coleta de dados radiométricos em pastagens do gênero *Brachiaria* com diferentes estágios de degradação. **XI Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, p. 1-10, 2003.
- GALLOWAY, J. N. et al. The nitrogen cascade. **Bioscience**, Washington, v.53, n.4, p.341-356, 2003
- GLICK, B. R. **Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications**. **Scientifica**, v. 2012, 2012.
- GLICK B. R.; BASHAN Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, v.15, p. 353-378, 1997.

GOLDSTEIN, A. H.; ROGERS, R. D.; MEAD, G. Separating phosphate from ores via bioprocessing, **Biotechnology**, v. 11, p. 1250-1254, 1993.

GOMES, A. A. et al. Relação entre distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.11, p. 1105-1113, 2005.

GOMIDE, C. A. M.; GOMIDE, J. A. Morfogênese de cultivares de *Panicum maximum* Jacq. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.2, p.341-348, 2000.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas em arroz de sequeiro. **Revista Agronomia**, v.37, p.25-30, 2003.

GUTIERREZ-MANERO, F. J. et al. The plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiologia Plantarum**, v. 111, p. 206-211, 2001.

GYANESHWAR, P. et al Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, p. 83-93, 2002.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 10, p. 463-471, 2008.

HARPER, J. E. Nitrogen metabolism. In: BOOTE, K. J.; BENNETT, J.M.; SINCLAIR, T.R. (Eds.) Physiology and determination of crop yield. Madison: American Society of Agronomy: Crop Science Society of America: Soil Science Society of America, 1984. P.285-302.

HAVLIN, J. L. et al. **Soil fertility and fertilizers: An introduction to nutrient management**. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, 2005.

HUERGO, L. F. **Regulação do metabolismo de nitrogênio em *Azospirillum brasilense***. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, 2006.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011.

HUTTON, M. Melhoramento de pastagens. In: EMPRESA GOIANA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, Goiânia, GO. Encontro sobre forrageiras do gênero *Brachiaria*. Goiânia, EMGOPA/EMATER, 1977. p.167-185.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) (2016) Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal 2016

INTORNE, A. C. et al. Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. **Archives of Microbiology**, v. 191, p. 477- 483, 2009.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 17, p. 77-119, 1998.

JI, S. H.; GURURANI, M. A.; CHUN, S. C. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiol Research**, v.169, n.1, p.83-98, 2014.

KARIA, C. T.; DUARTE, J. B.; ARAÚJO, A. C. G. D. **Estratégias de desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (Trin.) Griseb. no Brasil**. Brasília: Embrapa Cerrados; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006.

KIM, K. Y.; JORDAN, D.; McDONALD, G. A. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biology and Fertility of Soils**, v. 26, p. 79-87, 1998.

- KIRCHHOF, G. et al. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.157-168, 2001.
- KIRCHHOF, G. et al. Occurrence, physiological and molecular analysis of endofhytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. **Plant Soil**, v. 194, p. 45-55, 1997.
- KITAGISHI, K.; OBATA, H.; KONDO, T. Effect of zinc deficiency on 80s ribosome content of meristematic tissue of rice plant. **Soil Science Plant Nutrition**, v.33, p.423-429, 1987.
- KHAMMAS, K. M. et al. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Res. Microbiol.**, n.140, p.679-693, 1989.
- KREWULAK, K. D.; VOGEL, H. J. Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim Biophys Acta*, v.1778, n.2008, p.1781-1804, 2007.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J. et al. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environ. Microbiol.**, v.6, p.1244-1251, 2004.
- KUSS, A.V. et al. 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.
- LADHA, J.K.; SO, R.B.; WATANABE, I. Composition of *Azospirillum* species associated with wetland rice plant grown in different soils. **Plant and Soil**, v.102, p. 127-129, 1987.
- LAMBRECHT, M. et al. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v.298, n.7, p.298-300, 2000.
- LANGE, A.; MOREIRA, F. M. S. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de orchidaceae e de outras famílias vegetais. **Revista brasileira de ciência do solo**, v.26, p.529-533, 2002.
- LAVRINENKO, K. et al. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. **International journal of systematic and evolutionary microbiology.**, v.60, n. 12, p.2832-2837, 2010.
- LI, J.; GLICK, B. R. Transcriptional regulation of the *Enterobacter cloacae* UW4 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene (*acdS*). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 259-267, 2001.
- LIMA, E. S.; DEMINICIS, B. B. Produção e composição química de cultivares de capim-elefante. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia - PUBVET**, v.2, n.14, 2008.
- LIN, S. Y. et al. *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. et al. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, n. 4, p.761-765, 2009.
- LIN, S. Y. et al. Description of *Niveispirillum 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, p.1149-1162, 2014.
- LODEWYCKX, C. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, p. 583-606, 2002.

- LOGESHWARAN, P.; THANGARAJU, M.; RAJASUNDARI, K. Hydroxamate siderophores of endophytic bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolated from sugarcane roots. **Aust. J. Basic Appl Sci**, v. 3, p. 3564-3567, 2009.
- LOPES, A. S. **Solos sob " cerrado": características, propriedades e manejo**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1984.
- LUVIZOTTO, D. M. **Caracterização fisiológica e molecular de Burkholderia spp. associadas as raízes de cana-de-açúcar**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2008.
- MAGALHÃES, F. M. et al. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais-Academia Brasileira de Ciências**, v. 55, p. 417-430, 1983.
- MACEDO, M. C. M. Pastagens no ecossistema Cerrados: evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentável. **Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia**, v. 42, n. 2005, p. 56-84, 2005.
- MALAVOLTA, E.; BOARETTO, A. E.; PAULINO, V. T. Micronutrientes: uma visão geral. In: FERREIRA, M. E; CRUZ, M.C.P. Micronutrientes na agricultura. Piracicaba: POTAFOS, 1991. p. 1-34.
- MANTELIN, S.; TOURAINE, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal Experimental Botany**, v.55, p.27-34, 2004.
- MARQUES, A. C. R. et al. Biological nitrogen fixation in C<sub>4</sub> grasses of different growth strategies of South America natural grasslands. **Appl Soil Ecology** v.113, p.54-62, 2017.
- MARRA, L. M. et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v.357, p.289-307, 2012.
- MEHNAZ, S. *Azospirillum*: A Biofertilizer for Every Crop. In: ARORA, N. K. (Ed.). **Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets**. New Delhi: Springer India, 2015. p.297-314. ISBN 978-81-322-2068-8.
- MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 620-624, 2007.
- MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2805-2809, 2007.
- MENGEL, K.; KIRKBY, A. **Principles of plant nutrition**. Bern: International Potash Institute, 687p, 1987.
- MIETHKE, M.; MARAHIEL, M. A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.71, n.3, p.413-451, 2007.
- MIRANDA, C. H. B.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Selection of *Panicum maximum* for associated biological nitrogen fixation using the <sup>15</sup>N isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, v.22, p. 657-663, 1990.
- MONTEIRO, M. D. C. da C.; de LUCAS, E. D.; SOUTO, S. M. Estudo de seis espécies forrageiras do gênero *Brachiaria*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira – Série Zootecnia**, Rio de Janeiro, v.9, n.3, p.17-20, 1974.
- MOREIRA, F. M. S et al. (2010) Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.
- MOREIRA, F. M. S. E SIQUEIRA, J. O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. **MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2ª ed., Lavras: Editora UFLA, p. 449-542, 2006.**

NAUTIYAL, C. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, p. 265-270, 1999.

NEILANDJS, B.; LEONGS, A. Siderophores in relation to plant growth and disease. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, p. 187-208, 1986.

NEILANDS, J. B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 26723-26732, 1995.

NEWTON, W. E. (2000) Nitrogen fixation in perspective. In: **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Springer, Dordrecht, 2000. p. 3-8.

NEYRA, C. A.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation in grasses. **Advances in Agronomy**, v. 29, p. 1-38, 1977.

OBATA, H.; UMEBAYASHI, M. Effect of zinc deficiency on protein synthesis in cultured tobacco plant cells. **Soil Science Plant Nutrition**, v. 34, p. 351-357, 1988.

OLIVARES, F. L. Infection of mottled stripe diseasesusctible and resistant varieties of sugar cane by endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, v. 135, p 723-737, 1997.

OLIVEIRA, A. L. M. et al. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, p. 23-32, 2006.

OLIVEIRA, A. L. M. et al. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v. 242, p. 205-215, 2002.

OLIVEIRA, O. C. **A baixa disponibilidade de nutrientes do solo como uma causa potencial da degradação de pastagens no cerrado brasileiro**. SOBRAD/UFV/DPS/DEF, 1997.

OLIVEIRA, P. P. A. et al. Liming and fertilization to restore degraded *Brachiaria decumbens* pastures grown on an entisol. **Scientia Agricola**, v. 60, p. 125-131, 2003.

OLIVEIRA, P. P. A.; DE OLIVEIRA, W. S.; BARIANI 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.

PALMER, J. D. Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. **The American Naturalist**, v. 130, p. S6-S29, 1987.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência sistêmica. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia: princípios e cinceitos**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, v.1, cap.22, p.471-454, 1995.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p. 3795-3801, 2002.

PEDRAZA, R. O. et al. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic production by associative nitrogenfixing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 233, p. 15-21, 2004.

PEDRINHO, E. A. N. et al. Identification and evaluation of bacteria isolated from roots of maize. **Bragantia**, v. 69, p. 905-911, 2010.

PENG, G. et al. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1263-1271, 2006.

PERIN, L. et al. *Burkholderia silvatlantica* sp nov., a novel diazotrophic bacterium associated with sugarcane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.1931-1937, 2006.

- PERIN, L. et al. Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz. **Agronomia**, v. 37, p. 47-53, 2003.
- PIZARRO, E. A. et al. Regional experience with Brachiaria: Tropical América – Savannas. In: MILES, J. W.; MAAS, B. L.; VALLE, C. B do. (Ed.) **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cail-Colombia: CIAT; Campo Grande – Brasil: Embrapa, 1996, cap. 15, p. 225-246.
- 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 de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2001.
- RAAIJMAKERS, J. M. et al. Utilization of heterologous siderophores and rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* spp. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 126-135, 1995.
- REINHOLD, B. et al. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **Int. J. Syst. Bacteriol.**, n. 37, p. 43-51, 1987.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in microbiology**, v. 6, n. 4, p. 139-144, 1998.
- REIS JUNIOR, F. B. et al. Isolamento, caracterização e seleção de estirpes de *Azospirillum amazonense* e *Herbaspirillum seropedicae* associadas a diferentes variedades de milho cultivadas no Cerrado. Embrapa Cerrados, 2008.
- REIS JUNIOR, F.B. et al. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 35, p. 985–994, 2000.
- REIS JÚNIOR, F. B.; TEIXEIRA, K. R. N.; REIS, F. R. Fixação biológica de nitrogênio associada a pastagens de braquiária e outras gramíneas forrageiras. Embrapa Cerrados, 2002
- REIS JUNIOR, F. B. et al. Identificação de isolados de *Nitrospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, n. 1, p.103-113, 2004.
- REIS, V. M. et al. Biological nitrogen fixation associated with tropical pasture grasses. **Austral. J. Plant Physiol.**, v.28, p. 837-844, 2001.
- REIS, V. M. et al. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2155-2162, 2004.
- RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. D.; KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J. W.; MASS, B. L.; VALLE, C. B do. (Ed.) **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cail-Colombia: CIAT; Campo Grande – Brasil: Embrapa, v.1, p. 1-15, 1996.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319-339, 1999.
- RODRÍGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; SELMAN, G.. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. **Journal of Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 155-161, 2000.
- ROESCH, L. F. W. et al. Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 10, p. 1377-1383, 2007

- ROY, N.; CHAKRABARTTY, P. K. Effect of aluminum on the production of siderophore by *Rhizobium sp.*(*Cicer arietinum*). **Current microbiology**, v. 41, n. 1, p. 5-10, 2000.
- RUSCHEL, A. P. **Fixação biológica de nitrogênio**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 1975.
- SANTOS, M. C. M. et al. Ocorrência e atividade de bactérias diazotróficas em forrageiras cultivadas na Região semiárida no Brasil. **Revista Caatinga**, v.26, p. 27–34, 2013.
- SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Chemosphere**, v.66, n.9, p.1794-1798, 2007a.
- SARAVANAN, V. S. et al. Zinc metal solubilization by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and induction of pleomorphic cells. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 17, p. 1477-1482, 2007b.
- SAWANA, A.; ADEOLU, M.; GUPTA R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. **Front Genet**, v. 5, n. 429, p. 1-22, 2014.
- SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 2, p. 311-329, 2000.
- SILVA, K. et al Density and diversity of diazotrophic bacteria isolated from Amazonian soils using N-free semi-solid media. **Scientia Agricola**, v. 68, p. 518-525, 2011.
- SILVA, L. L. G. G. et al. Fixação biológica de nitrogênio em pastagens com diferentes intensidades de corte. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, p. 21-30, 2010.
- SILVA, M. C. P. et al Plant growth promoting bacteria in *Brachiaria brizantha*. **World J Microbiol Biotechnol.**, v. 29, p. 163-171, 2013.
- SERRÃO, E. A de S.; SIMÃO NETO, M. Informações sobre duas espécies de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* na Amazônia: *B. decumbens* Stapf e *B. ruziziensis* Germain et Everard. **Embrapa Amazônia Oriental-Séries anteriores (INFOTECA-E)**, 1971.
- SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. S.; CAPRONI, A. L. Solubilização de fosfato in vitro por microrganismos rizosféricos de guandu. **Bioscience Journal**, v. 23, p. 53-60, 2007.
- SOUTO, S.M.; SILVA, T.P. Fixação biológica de nitrogênio na fase de estabelecimento de gramíneas forrageiras tropicais em uma região do estado do Rio de Janeiro. **In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 26, Porto Alegre. Anais. SBZ. Porto Alegre. p. 408, 1989.
- SOUZA FILHO, A. P. da S.; DUTRA, S. Resposta do *Brachiaria humidicola* à adubação em campo Cerrado do Estado do Amapá, Brasil. **Pasturas Tropicais**, v. 13, n. 2, p. 42-45, 1991.
- SOUZA, M. S. et al. *Azospirillum spp.* from native forage grasses in Brazilian Pantanal floodplain: biodiversity and plant growth promotion potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** v.33, n.4, p. 1-13, 2017.
- SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrogênio. **FERNANDES, MS Nutrição mineral de plantas. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, p. 215-252, 2006.
- STAUFFER, M. D.; SULEWSKI, G. Fósforo essencial para a vida. **Simpósio Sobre Fósforo na Agricultura Brasileira, Piracicaba. Anais... Piracicaba: Potafos/Anda**, 2004.

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.

STURZ, A. V. et al. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 162-167, 1998.

TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, p. 967-980, 1978

THULER, D. S. et al. Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp. in chemically defined media. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 174-178, 2003.

TRÂN VAN, V. et al. Isolation and nitrogenase activity of *Burkholderia vietnamiensis*, a nitrogen-fixing bacterium associated with rice (*Oryza sativa* L.) on a sulphate acid soil of Vietnam. **Agronomie**, v. 16, n.8, p. 479-491, 1996.

VALLE, C. B.; EUCLIDES, V. B. P.; MACEDO, M. C. M. Característica das plantas forrageiras do gênero *Brachiaria*. **SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM**, v. 17, p. 65-108, 2000.

VALLE, C. B.; MILES, J. W. Melhoramento de gramíneas do gênero *Brachiaria*. **SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM**, v.11, p. 1-23, 1994.

VANDENDERGH, P. A.; GONZALES, C. F. **Method for protecting the growth of plants employing mutant siderophore producing strains of *Pseudomonas putida***. U.S. Patent n. 4,479,936, 30 out. 1984.

VASQUEZ, P. et al. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 460-468, 2000.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 435-440, 2003.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, n. 2-3, p. 127-141, 2001

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, p. 571 – 586, 2003.

VIDEIRA, S. S. et al. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant Soil**, v. 356, p. 51-66, 2012.

XIE, C. H.; YOKOTA, A. (2005) *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1435-1438, 2005.

WANG, C.; BROWN, H.N.; CROWLEY, D.E.; SZANIZLO, P.J. (1993) Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B in axenically grown cucumber. **Plant Cell Environmental**, n. 16, p. 579-585.

WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2277-2285, 2000.

WEBER, O. B. et al. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, v. 210, p. 103-113, 1999.

- WERNER, J. C. Adubação de pastagens. Nova Odessa, Instituto de Zootecnia. 49p. **Boletim técnico**, v. 18, 1986.
- WHITELAW, M. A. Growth promotion of plant inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, v. 69, p. 99-151, 2000.
- YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. Taxonomic studies of acetic acid bacteria and allied organisms. Part XI. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, n. 8, p. 1244-1251, 1997.
- YANG, J.; KLOEPPER, J.W.; RYU, C. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, v.14, n.1, p.1-4, 2009.
- YDOYAGA, D. F. et al. Métodos de recuperação de pastagens de *Brachiaria decumbens* Stapf. no Agreste Pernambucano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 699-705, 2006.
- YOUNG, C. C. et al. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 58, n. 4, p. 959-963, 2008.

## **CAPÍTULO I**

### **DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS DE GENÓTIPOS DE *BRACHIARIA***

## RESUMO

Bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Nitrospirillum* podem colonizar a rizosfera e endofiticamente tecidos de genótipos de *Brachiaria* e contribuir para o desenvolvimento da cultura por meio do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de hormônios de crescimento vegetal e biodisponibilização de nutrientes. O objetivo desse estudo foi isolar e avaliar a ocorrência e a diversidade de bactérias diazotróficas dos gêneros *Azospirillum* e *Nitrospirillum* em 20 genótipos de *Brachiaria* coletados em solos do Cerrado no Banco Ativo de Germoplasma do Centro Nacional de Pesquisa Gado de Corte, bem como suas características funcionais para auxiliar na promoção de crescimento vegetal. Um total de 222 isolados foram obtidos de solo rizosférico e raízes com e sem desinfestação a partir da inoculação de suspensão de solo e tecidos vegetais em meios Nfb e LGI semi-sólidos livres de N. Estes foram analisados genotipicamente por sequências dos genes 16S rRNA e *nifH*, e fenotipicamente por suas capacidades funcionais para produzir auxina, solubilizar fosfato e zinco, produzir sideróforos e degradar celulose *in vitro*. De forma geral, o tamanho da população de bactérias diazotróficas viáveis, colonizando os 20 genótipos em estudo, variou de  $10^2$  a  $10^8$  bactérias por grama de tecido fresco. As raízes desinfestadas da *Brachiaria humidicula* H47 registraram-se as maiores densidades populacionais ( $1,1 \times 10^8$  bactérias por g de raiz) de bactérias em relação os demais genótipos. O sequenciamento do gene 16S rRNA confirmou a presença dos gêneros *Azospirillum* e *Nitrospirillum*, além de revelar a presença de *Paraburkolderia silvatlantica*, *Paraburkolderia tropica*, *Phytobacter diazotrophicus*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*, e *Stenotrophomonas spp* nos genótipos de *Brachiaria*. A maior diversidade foi proveniente do genótipo *B. decumbens* D24/27 e o maior número de isolados foi obtido do genótipo de *B. decumbens* X009. A capacidade de solubilização de fosfato inorgânico foi detectada em 39,2% das bactérias; 9,5% solubilizou Zn; 32,4% apresentaram capacidade celulolítica, 84,2% produziram sideróforos, 18,5% produziram compostos indólicos e a presença do gene *nifH* foi observada em 85,14% dos isolados. Os isolados NRB085 e NRB088, oriundos da *B. humidicula* comum e *Brachiaria sp.* Ipyporã, respectivamente, apresentaram todas as atividades funcionais, sendo capazes de fixar nitrogênio, solubilizar Pi e Zn, produzir sideróforos, apresentar capacidade celulolítica e produzir indoles. Além destes, pode ser destacado o isolado NRB214 originário de *B. decumbens* cv D24/27 e mais 29 isolados de acordo com as suas capacidades funcionais apresentadas. Foram selecionados 32 isolados contrastantes para a formulação de inoculante turfoso para os testes em associação com doze genótipos de *Brachiaria* em experimento em casa de vegetação da Embrapa Agrobiologia, visando definir interações positivas da bactéria vs genótipo para estudos posteriores de inoculação em condições de campo.

**Palavras-chave:** Isolamento, capacidade funcionais, sequenciamento, taxonomia

## ABSTRACT

Bacteria of the genera *Azospirillum* and *Nitrospirillum* can colonize the rhizosphere and endophytic tissues of *Brachiaria* genotypes and contribute to the plant development through the biological nitrogen fixation (BNF) process, production of plant growth hormones and bioavailability of nutrients. The objective of this study was to evaluate the occurrence and diversity of endophytic bacteria of the genus *Azospirillum* and *Nitrospirillum* in 20 genotypes of *Brachiaria* collected in Cerrado soils at the Germplasm Active Bank of the National Center for Research Gado de Corte, as well as to evaluate their functional characteristics involved in plant growth promoting. A total of 222 isolates were obtained from rhizospheric soil and roots with and without disinfection from soil suspension and plant tissues inoculated in N-free NFB and LGI semi-solid media. These isolates were analyzed genotypically by 16S rRNA and *nifH* gene sequences, and phenotypically for their functional abilities to produce auxin, solubilize phosphate and zinc, production of siderophores and degradation of cellulose *in vitro*. In general, the population size of viable diazotrophic colonizing bacteria of the 20 genotypes ranged from  $10^2$  to  $10^8$  bacteria per gram of fresh tissues. The disinfested roots of *Brachiaria humidicula* H47 showed the highest bacterial population densities ( $1.1 \times 10^8$  bacteria per g root) in relation to the other genotypes. Sequencing of the 16S rRNA gene confirmed the presence of the genera *Azospirillum* and *Nitrospirillum*, and in addition showed the presence of *Paraburkolderia silvatlantica*, *Paraburkolderia tropica*, *Phytobacter diazotrophicus*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*, and *Stenotrophomonas spp.* The greatest diversity came from the genotype *B. decumbens* D24/27 and the largest number of isolates was obtained from the genotype of *B. decumbens* X009. The solubility of inorganic phosphate was detected in 39.2% of the bacteria while 9.5% solubilized Zn; 32.4% presented cellulolytic capacity, 84.2% produced siderophores, 18.5% produced indolic compounds and the presence of the *nifH* gene was observed in 85.14% of the isolates. The strains NRB085 and NRB088, isolated from *B. humidicula* common and *B. spp.* Ipyporã, respectively, presented all functional activities, being able to fix nitrogen, solubilize Pi and Zn, produce siderophores and indoles and present cellulolytic capacity. In addition, the isolate NRB214, originating from *B. decumbens* cv D24/27, and other 29 strains classified according to their functional capabilities can be highlighted. Thirty two contrasting strains were selected to formulate an inoculant to be tested in association with twelve *Brachiaria* genotypes in a greenhouse experiment at Embrapa Agrobiologia, in order to observe positive interactions of the bacterium vs genotype for later inoculation studies under field conditions.

**KEY WORDS:** Isolation, functional capabilities, sequencing, taxonomy

## 1 - INTRODUÇÃO

As pastagens representam um dos maiores ecossistemas do Brasil (IBGE, 2014), sendo caracterizadas como complexas, com seus componentes bióticos e abióticos organizados, os quais interagem entre si, determinando a amplitude das respostas de plantas e animais (Da Silva *et al.*, 2008). Dentre as forrageiras, a mais utilizada é a do gênero *Brachiaria*, a qual pertence à família das poáceas, reunindo cerca de 100 espécies, as quais são de grande importância econômica, sendo distribuída por regiões tropicais e subtropicais, ocupando desta forma, a maior parte das pastagens cultivadas (Valle *et al.*, 2009).

Apesar de sua importância econômica, estima-se que cerca de 70% das pastagens cultivadas no Brasil encontram-se em processo de degradação (DIAS-FILHO, 2011), fenômeno este que pode ser explicado, principalmente, pela baixa fertilidade natural dos solos das regiões tropicais e pela falta de reposição de nutrientes (MACEDO, 2005), sendo que o nitrogênio é considerado o elemento mais limitante à produtividade de *Brachiaria spp.* (VASCONCELOS, 2006). No entanto, o uso de fertilizantes nitrogenados onera muito o custo de produção, e com a crescente demanda por alimentos, se faz necessário o uso de alternativas sustentáveis, tal como o uso da fixação biológica de nitrogênio (FBN). A FBN é realizada por bactérias diazotróficas que podem colonizar a rizosfera, o interior ou a superfície de tecidos vegetais (BASHAN *et al.*, 2004).

Em revisão publicada por Baldani e Baldani (2005) sobre o processo de FBN em gramíneas forrageiras, os autores indicam que a FBN é uma fonte renovável e contínua. Deste modo a FBN em pastagens pode ter um papel importante, onde a prática de inoculação das gramíneas com bactérias diazotróficas associativas específicas, poderá substituir, ainda que parcial, a fonte química de nitrogênio em sistemas intensivos, a exemplo dos rotacionados.

Neste contexto, *Azospirillum spp.* e *Nitrospirillum amazonense*, são umas das bactérias diazotróficas mais estudadas que podem estar associadas a várias famílias de plantas (RADWAN *et al.*, 2004), apresentando uma ampla distribuição, sendo encontrada no solo, raízes, folhas e caules das plantas (BALDANI *et al.*, 2014). Existem relatos na literatura de isolamentos de bactérias desses gêneros de gramíneas forrageiras como *Brachiaria spp.* (REIS *et al.*, 2001; REIS JUNIOR *et al.*, 2004; BRASIL *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2013), *Pennisetum purpurem* (VIDEIRA *et al.*, 2012), sorgo forrageiro (BERGAMASCHI *et al.*, 2007), *Paspalum* e *Panicum* (LANGE E MOREIRA, 2002), forrageiras no semiárido brasileiro (SANTOS *et al.*, 2013), forrageiras nativas do Pantanal brasileiro (*Mesosetum chaseae*, *Axonopus purpusii* e *Hymenachne amplexicaulis*) (SOUZA *et al.*, 2017).

Os microrganismos diazotróficos do gêneros *Azospirillum* e *Nitrospirillum*, podem desempenhar importante papel na reabilitação e sustentabilidade das pastagens, uma vez que incorporam N por meio da fixação biológica em quantidade que pode variar de 25 a 50 kg ha<sup>-1</sup>.ano<sup>-1</sup> e ainda produzem e liberam substâncias reguladoras de crescimento vegetal, como auxinas, giberilinas e citocininas (REIS JUNIOR *et al.*, 2004; KUSS *et al.*, 2007; VIDEIRA *et al.*, 2012), solubilizam fosfato inorgânico (RODRÍGUEZ *et al.*, 2004; LÓPEZ-ORTEGA *et al.*, 2013), e produzem sideróforos (TORTORA *et al.*, 2011; SILVA, 2014).

Devido a essas evidências, mais estudos sobre as potencialidades dessas bactérias diazotróficas em gramíneas forrageiras são necessários para entender o papel desses microrganismos na promoção do crescimento das plantas. Reis Junior *et al.* (2002) afirmam a necessidade de pesquisas sobre a FBN e a diversidade de microrganismos

diazotróficos em gramíneas visando à obtenção de estirpes com potencial de promoção de crescimento vegetal.

Diante do exposto, o estudo foi realizado com o objetivo de analisar a diversidade e o potencial de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de vinte genótipos de *Brachiaria* mantidas no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Centro Nacional de Pesquisa Gado de Corte, Campo Grande, MS.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Origem dos genótipos utilizados

O estudo compreende a análise de 20 genótipos de *Brachiaria* coletados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC), sendo parte do projeto: “Estratégias microbiológicas e moleculares para a seleção de interações benéficas entre bactérias diazotróficas e genótipos de *Paspalum* e *Brachiaria* e suas aplicações nos programas de melhoramento das pastagens” de número 02.13.08.004.00.02.003.

Foram escolhidos 5 cultivares de *B. brizantha*, 7 cultivares de *B. decumbens*, 5 cultivares de *B. humidicola*, 1 cultivar de *B. ruziziensis* e 2 cultivares de *B. spp.* O quadro 1 apresenta a lista dos cultivares e suas respectivas características.

### 2.2 - Isolamento de bactérias diazotróficas

A contagem e o isolamento seguiram a metodologia descrita por Baldani *et al.* (2014), utilizando os meios de cultivo semi-sólido livre de nitrogênio (LGI e NFb). Os meios foram desenvolvidos para isolamento de representantes dos gêneros *Nitrospirillum* e *Azospirillum*, mas permitem o isolamento de muitos outros gêneros inclusive não-diazotróficos conforme relatado no trabalho dos autores. As amostras dos 20 genótipos, coletados no BAG do CNPGC, foram transportadas para Embrapa Agrobiologia, em sacos plásticos transparentes de 20 kg, com 2 repetições por genótipo (A e B), cada uma sendo acondicionada em sacos separados e devidamente etiquetados. O material foi coletado com um pouco de solo rizosférico, para as futuras análises. Os materiais foram devidamente etiquetados e transplantados para vasos com 6kg de areia e vermiculita estéril (1:1), mantendo o solo coletado, e acondicionados em casa de vegetação (Figura 1). Foi realizado uma adubação a cada 15 dias com 30 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $35 \text{ g L}^{-1}$ ); 5 mL de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $150 \text{ g L}^{-1}$ ) e 5 mL de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ), totalizando 6 adubações, pois permaneceram em casa de vegetação por três meses.



**Figura 1.** Exemplos dos 20 genótipos de *Brachiaria* coletados na Embrapa Gado de Corte e transplantados para vasos contendo areia e vermiculita estéril (1:1) para o isolamento das bactérias diazotróficas.

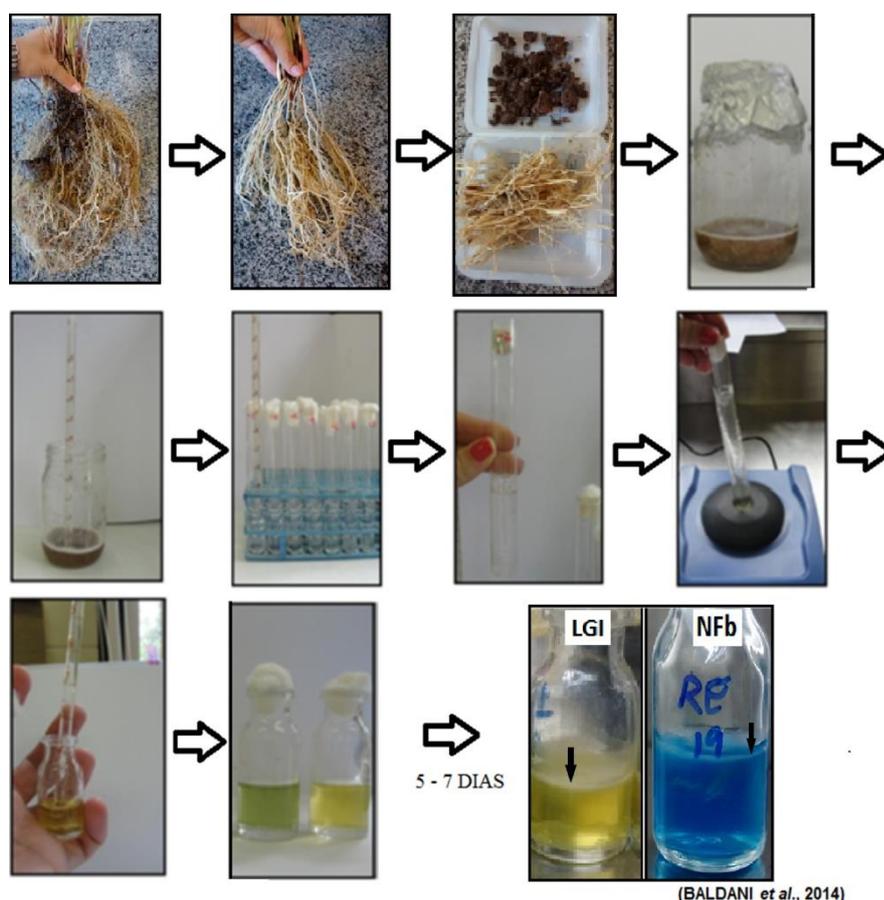
No laboratório, o solo rizosférico foi separado e as raízes foram lavadas em água corrente para remover o solo remanescente, sendo esta analisada na forma com ou sem desinfestação. Para o processo de desinfestação superficial das raízes foi utilizado uma concentração de  $10 \text{ g L}^{-1}$  de Cloramina-T ( $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NNaCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) por 5 minutos. Após desinfestação da superfície, as raízes foram colocadas em água destilada estéril por

Quadro 1. Cultivares de Brachiaria utilizadas no presente estudo e suas características como recomendação de utilização em relação ao tipo de solo, grau de susceptibilidade às cigarrinhas-das-pastagens, precipitação, pH do solo, produção de forragem e porcentagem de proteína bruta da forragem.

Espécie	Cultivar	Características gerais	Grau de susceptibilidade às cigarrinhas-das-pastagens	Precipitação (mm)	pH do solo	Produção de forragem (t. ms/ha/ano)	Proteína bruta da forragem (%)
<i>B. brizantha</i>	B140	Solos de média e alta fertilidade, bem drenados	Resistentes	590-2770	4,0-8,0	-	-
	Piatã					9,5	7,3 a 9,5
	Xaraés					25	8,7 a 13,5
	Paiaguás					10 a 15	11 a 13
	Marandu					10 a 20	9 a 12
<i>B. decumbens</i>	Basilisk	Solos de baixa a média fertilidade, bem drenados	Susceptíveis	870-1900	4,9-7,0	10	7 a 9
	D24/27					-	-
	D24/45					-	-
	D24/2					-	-
	X009					-	-
	79-10					-	-
<i>B. ruziziensis</i>	B001	Solos de média fertilidade	Susceptível	890-1710	5,0-6,8	-	-
	Comum					12 a 15	12 a 13
<i>B. humidicola</i>	Comum	Solos de baixa fertilidade, úmidos, tolerante a solos com altos teores de Al <sup>+3</sup> , ácidos e pobres em fósforo	Tolerantes	600-2800	4,0-7,0	8 a 10	8 a 10
	Llanero					7 a 9	7 a 9
	H47					-	-
	Tupi					8 a 10	3 a 6
<i>B. spp</i> (híbridos)	H31	Solos de média fertilidade, bem drenados	Resistentes	700-2200	5,0-7,0	-	-
	Ipyporã					8 a 14	11 a 13
<i>B. arrecta</i>	Mulato II	Solos de baixa a média fertilidade, alagados	Tolerante	-	-	10	8 a 11
	A-2					-	-

1 minuto e 30 segundos, depois em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) por 1 minuto e 30 segundos, e novamente em água destilada por 5 minutos, sendo estas raízes utilizadas para o isolamento de bactérias diazotróficas consideradas endofíticas. Já para as raízes que não foram desinfestadas, as mesmas foram mantidas em água destilada pelo mesmo período de tempo que o utilizado em todo no processo de desinfestação.

Para o isolamento de representantes da comunidade bacteriana diazotrófica, foram preparadas soluções a partir de dez gramas de solo rizosférico ou de raízes onde foram suspensos com 90mL de solução salina (ANEXO A) e homogeneizada (solo) ou maceradas (raízes) em liquidificador. A solução resultante foi diluída sucessivamente até  $10^{-7}$ . Alíquotas de 100  $\mu$ L de cada diluição de cada genótipo em estudo foram inoculadas em frascos contendo 7 mL dos meios de cultura semi-sólido NFb (DÖBEREINER *et al.*, 1995) (ANEXO B) e LGI (MAGALHÃES *et al.*, 1983) (ANEXO C). Foram utilizadas três repetições por diluição inoculada nos frascos contendo o meio semi-sólido, os quais foram incubados sob temperatura de 30°C por até sete dias. Após este período, foi feita a estimativa do número de bactérias presentes nas amostras pelo método do Número Mais Provável (NMP), utilizando-se a tabela de McGrady. O número de frascos positivos foi determinado pela presença de película característica (em forma de véu) no meio de cultura semi-sólido. Os detalhes do isolamento estão apresentados na figura 2 conforme detalhado por Baldani *et al.* (2014).



**Figura 2.** Etapas do processo de isolamento de bactéria diazotrófica a partir de tecidos das plantas de braquiária.

O isolamento das bactérias diazotróficas foi feito por meio da transferência com alça de inoculação de parte da película formada nos frascos de maior diluição com

crescimento positivo, para um novo meio semi-sólido (NFb e LGI). Após a formação da uma nova película (Figura 3), as culturas foram semeadas em placas de Petri, contendo meio de cultura sólido seletivo para cada microrganismo a ser isolado, e incubadas a 30°C até a formação de colônias características de cada espécie (Figura 4).



**Figura 3.** Exemplos de frascos de maior diluição com crescimento positivo (película superficial) em meio semi-sólido LGI.

Para a purificação, as colônias formadas foram novamente transferidas para meios de cultura semi-sólidos, e após a formação de película, semeadas para placas de Petri contendo o meio Batata (ANEXO D).



**Figura 4.** Placa de Petri com meio sólido NFb, apresentando colônias características da espécie *Azospirillum brasilense*.

### 2.3 - Caracterização taxonômica dos isolados

Para a caracterização taxonômica, os isolados foram cultivados em meio DYGS (RODRIGUES NETO *et al.*, 1986) por 24 horas, à 30°C à 180 rpm. Um mililitro da suspensão bacteriana foi centrifugado à 5000 rpm por 15 minutos e a extração foi realizada utilizando o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, USA-) (Cat. No. A1120, Lote 0000094032) seguindo as recomendações do fabricante. A quantidade do DNA genômico foi avaliada em espectrofotômetro Nanodrop® 3300 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA).

O DNA bacteriano purificado foi, então, amplificado por PCR para posterior sequenciamento dos genes 16S *rRNA* e *nifH* com o objetivo de efetuar a caracterização taxonômica e o depósito das mesmas na Coleção de Cultura de Bactérias Diazotróficas (CCBD) do Centro de Recursos Biológicos Johanna Dobereiner (CRB-JD).

### 2.3.1- Amplificação do gene 16S rRNA

Para a amplificação do fragmento do gene 16S rRNA foi utilizada a combinação dos iniciadores 27f (5' – AGA GTTTA TCC TG CTG AG – 3') (FURUSHITA et al., 2003) e Amp2 (5' – AAG GAG GT ATC CAT CCG CA – 3') (WANG et al., 1996) como descrito por Videira et al. (2009). Cada reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 25 ng DNA genômico; tampão para Taq DNA polimerase 1X (1 mM de Tris-HCl, pH 9,0 e 5 mM de KCl); 1,75 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,25 mM de cada dNTP; 1,25 U de *Taq* DNA polimerase e 0,2 µM de cada iniciador. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Mastercycler® gradiente (Eppendorf Hamburgo, Alemanha), programado para realizar uma desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos; seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 minuto; a 62°C por 1 minuto; a 72°C por 2 minutos; e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Após o término da reação, 2 µL de produto PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) a uma voltagem de 90 volts (~5 V cm<sup>-1</sup>) por 1 hora e 30 minutos em tampão TAE 1X (40 mM de Tris-acetato pH 8,0 e 1 mM de EDTA pH 8,0). Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5 µg mL<sup>-1</sup>) e visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador KODAK® Gel Logic Cabinet 100 (Eastman Kodak Company, Rochester, EUA).

### 2.3.2-Amplificação do gene *nifH*

Para amplificação de fragmentos do gene *nifH* foi utilizada a combinação dos iniciadores PolF (5'-TC GAY CCS AAR GCB GAC TC-3') e PolR (5'-ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA-3') (POLY et al., 2001). Cada reação de amplificação foi realizada com volume final de 50 µL, contendo 25 ng de DNA genômico; tampão para Taq DNA polimerase 1X (1 mM de Tris-HCl, pH 9,0 e 5 mM de KCl); 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,25 mM de cada dNTP; 1,25 U de Taq DNA polimerase e 0,2 µM de cada iniciador. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Agilent Technologies (SureCycler 8800), programado com uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos; seguido de 29 ciclos a 94°C por 1 minuto; 56°C por 45 segundos; e 72°C por 45 segundos; e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Após o término da reação, 2 µL de produto PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) a uma voltagem de 90 volts (~5 V cm<sup>-1</sup>) por 1 hora e 30 minutos em tampão TAE 1 X (40 mM de Tris-acetato pH 8,0 e 1 mM de EDTA pH 8,0). Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5 µg mL<sup>-1</sup>) e visualizado sob luz ultravioleta em foto-documentador KODAK® Gel Logic Cabinet 100 (Eastman Kodak Company, Rochester, EUA).

### 2.3.3- Sequenciamento

O sequenciamento dos fragmentos amplificados 16S rRNA e *nifH* foi realizado utilizando o kit comercial Big Dye® Terminator Cycle Sequencing v3.1 da Thermo Fisher Scientific (Cat. No.4337456) no sequenciador automático ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As amplificações para sequenciamento dos fragmentos dos genes 16S rRNA e *nifH* foram realizadas em microplacas de 96 poços usando os mesmos primers descritos anteriormente. Cada reação de amplificação foi realizada com um volume de 10 µL, contendo 1 µL de Big Dye® Terminator Cycle Sequencing v3. (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 4337456); 1 µL do iniciador (0,5 µM); 80-100 ng do produto de PCR e 1,5 µL de tampão (400 mM Tris-HCl, pH 9; 10 mM de MgCl<sub>2</sub>). As reações de amplificação foram realizadas no termociclador Agilent Technologies (SureCycler 8800), programado com uma desnaturação inicial de 96°C por 1 minuto; seguido de 35 ciclos a 96°C por 15 segundos; 50 °C por 15 segundos; e 60 °C

por 4 minutos. Para cada 10 µL do produto da PCR de sequenciamento foi adicionado 1 µL de EDTA (125 mM), 1 µL de acetato de amônio (3 M) e 25 µL de etanol absoluto. As microplacas foram então seladas, misturadas por inversão e incubadas a temperatura ambiente por 15 min no escuro. Após a incubação, foi realizado a centrifugação a 2000 x g por 30 minutos. Em seguida, as placas foram invertidas e submetidas a um spin de 150 x g. Foi então adicionado 35 µL de etanol 70% em cada reação e as microplacas foram submetidas a centrifugação de 1650 x g por 15 minutos, em seguida, as placas foram invertidas e submetidas a um spin de 185 x g. As amostras permaneceram em temperatura ambiente por uma hora no escuro, para a completa secagem. As amostras foram resuspenas em 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) e injetadas no sequenciador automático ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido).

As sequências foram analisadas e montadas utilizando o programa BioEdit versão 7.1.9 (Hall, 1999) para verificar a qualidade das mesmas. As sequências foram então submetidas ao programa BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastnePAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastnePAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) (ALTSCHUL *et al.*, 1997), para análise de similaridade de nucleotídeos com o banco de dados de sequências depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information). Foram construídas árvores filogenéticas com as sequências de 16S rRNA (~1400 pb) e *nifH* (~360 pb) para verificação da posição filogenética destas em relação às espécies-tipo de cada isolado identificado. As sequências foram processadas pelo programa MEGA6 (TAMURA *et al.*, 2013) e a árvore consenso foi construída pelo método *Neighbor-Joining*, considerando um *bootstrap* de 1000 repetições.

O sequenciamento dos fragmentos amplificados *nifH*, só foi realizado para os 32 isolados selecionados e utilizados no experimento de casa de vegetação.

## 2.4 - Avaliação da capacidade funcional das estirpes

Todos os isolados foram avaliados quanto capacidade de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico, solubilização de óxido zinco, produção de sideróforos, capacidade celulolítica e, de produção de compostos indólicos a fim de se identificar aqueles mais promissores como promotores de crescimento em ensaios em casa de vegetação. Essa seleção foi realizada de acordo com as características das bactérias que apresentaram pelo menos 3 dos 6 mecanismos estudados. A atividade de redução de acetileno (ARA) só foi realizada para os isolados selecionados para os ensaios em casa de vegetação.

Primeiramente, foi realizado a avaliação qualitativa de cada capacidade funcional para as bactérias estudadas. Após o *screening*, as análises das capacidades funcionais foram avaliadas em triplicata técnica.

### 2.4.1 - Fixação biológica de nitrogênio- avaliação qualitativa

A capacidade dos isolados em realizar o processo de FBN foi avaliada qualitativamente *in vitro*, em frascos de penicilina contendo 7 mL de meio de cultura NFB ou LGI semi-sólido, livre de nitrogênio, a partir da inoculação das culturas crescidas em seus respectivos meios semi-sólido. A incubação foi realizada por 72 horas a 30°C no escuro. Após esse período foi verificada a formação de película de crescimento próximo à superfície dos frascos (FIGURA 3). Foram realizadas três repetições para cada isolado bacteriano, e este procedimento foi repetido. A reinoculação sucessiva dos isolados é realizada para confirmar se o crescimento não está ocorrendo à custa de reservas de

nitrogênio das células, bem como para verificar a estabilidade dessa característica dos isolados (CATTELAN, 1999).

#### 2.4.1 - Solubilização de fosfato inorgânico

Primeiramente foram realizados ajustes metodológicos para a padronização do meio a ser utilizado nos ensaios *in vitro*. Os meios de cultivo testados foram: NBRIP (National Botanical Research Institute) (NAUTIYAL, 1999) - 10g de glicose; 5g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ; 5g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,25g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2g de KCl; 0,1g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 15g de ágar; pH 6,0 e volume final de 1 litro - com diferentes fontes de carbono: glicose, glicerol e frutose em pH 6,0 e, GL modificado (pH ajustado para 6,0 e 7,0) (SYLVESTER-BRADLEY *et al.*, 1982) com 5g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Para tal, foram testadas 30 bactérias isoladas de braquiária e com 3 repetições. A estirpe *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 (BR11281) foi utilizada como controle positivo.

Uma colônia característica de cada estirpe de interesse foi cultivada em meio líquido DYGS (RODRIGUES NETO *et al.*, 1986) sob agitação a 180 rpm a 30°C por 24 horas. Posteriormente, uma alíquota de 10  $\mu\text{l}$  foi inoculado em placas de Petri contendo os meios de cultura em teste e deixadas abertas em capela de fluxo laminar por 15 minutos. O halo de solubilização foi medido no 12º dia após a inoculação. O critério de comparação usado foi o índice de solubilização (IS) descrito por Kumar e Narula (1999):

$$\text{IS}=\text{A}/\text{B}$$

Onde: A= Diâmetro total (Diâmetro da colônia + diâmetro do halo) e B= Diâmetro da colônia.

Após avaliar as diferentes fontes de carbono mencionadas anteriormente, ficou evidenciado que a glicose foi a melhor fonte de carbono e desse modo o teste de solubilização de fosfato foi realizado com glicose.

#### 2.4.2 Solubilização de óxido de zinco

A capacidade de solubilização de zinco foi testada em meio de cultura NBRIP sólido (*National Botanical Research Institute's Phosphate*). Este meio foi desenvolvido por Nautiyal (1999) contendo 10 g de glicose; 1,2 g de ZnO; 5 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,25 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2 g de KCl; 0,1 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 15 g de ágar; pH 6,0 e volume final de 1 litro. As bactérias foram cultivadas em meio DYGS líquido por 24 horas sob temperatura de 30°C. Em seguida, usando o método do plaqueamento em gota, uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  foi inoculada na superfície da Placa de Petri contendo o meio de cultivo solidificado. O diâmetro do halo de solubilização, percebido como uma área translúcida ao redor da colônia, foi determinado após 8 e 15 dias de incubação. Foram utilizadas três alíquotas por placa.

#### 2.4.3 - Produção de sideróforos

Para eliminar traços de ferro da vidraria e padronizar as condições de cultura tendo como única variável a quantidade de íons férricos em solução, todo o material utilizado nas culturas foi tratado. A vidraria foi deixada por pelo menos 48 h imersa em uma solução HCl a 5% (v/v) e posteriormente, foi lavada com água deionizada (SCHWYN E NEILANDS, 1987) e, em seguida, autoclavada.

A produção de sideróforos foi avaliada empregando-se o método cromo azulol S (CAS) adaptado de Schwyn e Neilands (1987). Para preparar 45 mL da solução CAS inicialmente foram dissolvidos 30,2 mg de CAS em 20 mL de água deionizada. Em seguida, foi adicionada uma solução composta de 5 mL da mistura da solução de  $\text{Fe}^{3+}$  (1 mM de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e 10 mM de HCl). Por último, foi adicionada uma solução de 36,5

mg de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) previamente dissolvido em 20 ml de água que resultou numa solução de coloração azul.

Foi inoculado uma colônia característica de cada isolado em tubo de ensaio contendo 5 mL de meio líquido NFB ou LGI, sem ferro  $\text{Fe}^{3+}$  e com  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para indução da produção de sideróforos ou de compostos quelantes de ferro. Os tubos foram incubados a uma agitação de 180 rpm,  $30^\circ\text{C}$  por 48 h. Após a incubação, três alíquotas de  $10 \mu\text{L}$  cada, foram inoculadas em placa de NFB ou LGI [sem ferro  $\text{Fe}^{3+}$  e com  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ] contendo 1% de CAS. As bactérias foram incubadas por até 3 dias a  $30^\circ\text{C}$ . Após o crescimento, foi avaliado a produção de sideróforos através da presença ou ausência de halo. Foi também avaliado a intensidade da produção de sideróforos em baixo, médio e alto de acordo com o tamanho do halo.

#### 2.4.4 - Atividade celulolítica

O ensaio foi realizado de acordo com Kasana *et al.* (2008). As estirpes foram crescidas em meio Dygs líquido sob agitação a 180 rpm a  $30^\circ\text{C}$  por 24 horas e inoculadas, como 3 repetições  $10 \mu\text{L}$  cada, em placas de meio CMC. O meio CMC é composto de  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ ,  $1 \text{ g}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4$ ,  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{KCl}$ ,  $2 \text{ g L}^{-1}$  de carboximetilcelulose (CMC),  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  peptona,  $17 \text{ g L}^{-1}$  de ágar. As bactérias foram incubadas por 4 dias a  $30^\circ\text{C}$ . Após o crescimento, as placas foram coradas por 5 minutos com uma solução de Iodo de Gram ( $2 \text{ g}$  de  $\text{KI}$  e  $1 \text{ g}$  de iodo em  $300 \text{ mL}$  de água destilada), o excesso de solução foi descartado e os halos evidenciados. O diâmetro dos halos e o das colônias foram aferidos com o auxílio de um paquímetro digital. O índice da atividade celulolítica (IC) foi calculado através do diâmetro total da colônia mais a zona de hidrólise dividido pelo diâmetro da colônia conforme proposto por Hankin e Anagnostakis (1975).

#### 2.4.5 - Capacidade de produção de compostos indólicos

As estirpes bacterianas isoladas de *Brachyaria* foram analisadas quanto à síntese de compostos indólicos conforme o método de microplaca proposto por Sarwar e Kremer (1995). Cada isolado bacteriano foi cultivado em um tubo contendo 5 mL de DYGS líquido por 24 h sob temperatura de  $30^\circ\text{C}$ . Logo após, uma alíquota de  $20 \mu\text{L}$  de cada tubo foi transferida para outro tubo contendo meio NFB líquido modificado ( $5 \text{ g}$  de ácido málico,  $5 \text{ mL}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (solução a 10%),  $2 \text{ mL}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (solução a 10%),  $1 \text{ mL}$  de  $\text{NaCl}$  (solução a 10%),  $2 \text{ mL}$  de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (solução a 1%)  $4 \text{ mL}$  de  $\text{FeEDTA}$  (solução a 1,64%),  $2 \text{ mL}$  de solução de micronutrientes para meio de cultura cultura ( $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $1,175 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $1,4 \text{ g}$  de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $0,04 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,12 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ),  $1 \text{ mL}$  de vitamina para meio de cultura ( $100 \text{ mg L}^{-1}$  de Biotina e  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de Piridoxol-HCl),  $4,5 \text{ g}$  de  $\text{NaOH}$  e,  $1 \text{ g}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 6,5 e volume final de 1 litro e o meio LGI líquido sem o indicador de pH, ambos acrescidos com L-triptofano ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e foram submetidos a agitação de 180 rpm por um período de 72 h, em ambiente sem luminosidade e com temperatura ambiente de  $30^\circ\text{C}$ . Então, alíquotas de  $1 \text{ mL}$  de cada tubo foram retiradas no tempo de 72 h de crescimento bacteriano e centrifugadas a  $12.000 \text{ rpm}$  por 5 minutos. Para o ensaio, foram utilizados os meios NFB e LGI, conforme a origem de cada isolado avaliado.

Em seguida à centrifugação,  $150 \mu\text{L}$  do sobrenadante de cada amostra foi adicionado em três poços de microplaca (96 poços) mesclado a  $100 \mu\text{L}$  do reagente de Salkowski ( $1 \text{ mL}$  de  $\text{FeCl}_3$  a  $0,5 \text{ M}$  em  $49 \text{ mL}$  de ácido perclórico a 35%). As amostras foram incubadas no escuro por 30 min sob temperatura ambiente e após este período foram realizadas leituras utilizando-se espectrofotômetro (Labsystems iEMS Reader MF) em um comprimento de onda de  $540 \text{ nm}$ , e os dados de absorvância foram processadas

pelo programa Ascent for iEMS Reader MF. A estirpe *Azospirillum brasiliense* Sp245 foi utilizada como controle positivo. As leituras foram normatizadas por meio de uma curva padrão previamente obtida com concentrações conhecidas de ácido 3-indol-acético (25 a 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Para normalizar os valores da determinação dos compostos indólicos, o conteúdo de proteínas foi determinado pelo método descrito por Bradford (1976). As células centrifugadas durante o procedimento de determinação dos compostos indólicos foram ressuspensas em 1 mL de meio DYGS líquido, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  desta suspensão foram transferidas para um tubo de 1,5 mL contendo 100  $\mu\text{L}$  de NaOH 1M. A mistura foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente para lise das células. Posteriormente, 100  $\mu\text{L}$  da solução anterior foi adicionado a 900  $\mu\text{L}$  de solução de Bradford e incubada sob temperatura de 37°C por 30 minutos. As leituras foram feitas em leitor de microplaca com comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteína foi determinada usando a curva padrão obtida pelos valores de absorvância das quantidades conhecidas de BSA (albumina sérica bovina), nas seguintes concentrações: 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ . Todas as amostras foram analisadas em triplicata e o resultado foi decorrente de uma média das 3 leituras.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Contagem do NMP e Isolamento das bactérias diazotróficas em meios semi-sólidos NFb e LGI

A quantidade estimada de bactérias diazotróficas presentes no solo da rizosfera e nas raízes das plantas diferiu conforme o material utilizado para o isolamento (raízes não desinfestadas (RND), raízes desinfestadas superficialmente (RD) e solo da rizosfera (S), bem como ao tipo de meio semi-sólido (NFb e LGI). As maiores populações de bactérias nas forrageiras avaliadas, seguiram a seguinte ordem: raiz desinfestada superficialmente > raiz não desinfestada > solo da rizosfera (Tabela 1), sugerindo uma aparente preferência dos isolados bacterianos pelo hospedeiro. O maior número de *Azospirillum* spp., originário de raízes lavadas do que das raízes desinfestadas, também foi observado em outras gramíneas forrageiras como *Brachiaria humidicola* e *B. decumbens* (REIS JUNIOR *et al.*, 2004), e *B. humidicola*, capim mimoso (*Axonopus purpusii*) e capim corona (*Elyonurus muticus*) cultivado no Pantanal Matogrossense (BRASIL *et al.*, 2005).

De forma geral, o tamanho da população de bactérias diazotróficas viáveis colonizando os 20 genótipos em estudo variou de  $10^2$  a  $10^8$  bactérias por grama de tecido fresco. Os resultados são similares aos observados por Reis Junior *et al.* (2004) para a população encontrada nas raízes e rizosfera de braquiárias cultivadas em solos de Goiás e Minas Gerais, assim como no estudo realizado por Santos e colaboradores (2013) em gramíneas forrageiras cultivadas na região semi-árida no Brasil, e no trabalho de Peng *et al.* (2006) na gramínea *Melinis minutiflora*, indicando haver uma relação direta entre as Poaceae e estas bactérias diazotróficas, independentemente do tipo de solo, conforme atribuído por Baldani *et al.* (1999).

As raízes desinfestadas da *Brachiaria humidicola* H47 apresentaram as maiores densidades populacionais de bactérias ( $1,1 \times 10^8$  bactérias  $g^{-1}$  de tecido fresco) em relação às demais forrageiras, enquanto as menores densidades (70 bactérias  $g^{-1}$  de tecido fresco) foram observadas nas raízes desinfestadas da *Brachiaria decumbens*. É possível que inúmeros fatores tenham favorecido a maior densidade bacteriana nas raízes desinfestadas, dentre eles: aderência das bactérias, baixa competição com outros organismos, especificidade com a gramínea hospedeira, ou mesmo, devido à plasticidade adaptativa das forrageiras sob às variações sazonais (ALLEN EVALLS, 1987).

O isolamento realizado a partir de frascos da maior diluição (presença de película característica) confirmou a presença de bactérias diazotróficas dos gêneros *Azospirillum* e *Nitrospirillum* associadas às vinte forrageiras. Foram obtidos isolados dessas bactérias em todas as forrageiras, com exceção de amostras da *Brachiaria ruziziensis* R134 inoculadas em meio LGI. Do total de 222 isolados obtidos das forrageiras avaliadas, o maior percentual foi em raízes não desinfestadas (RND) com 21,17%, seguido de 12,61% em raízes desinfestadas superficialmente (RD) e de 19,27% no solo da rizosfera em meio NFb enquanto que no meio LGI o percentual foi de 18,47% em RND, 16,22% em RD e de 12,16% no solo da rizosfera.

Estes dados sugerem uma maior preferência destes microrganismos pelas condições ambientais da superfície das raízes destas forrageiras em relação aos demais tecidos vegetais. Este resultado corrobora com o de outros autores, os quais verificaram que a maioria das bactérias diazotróficas isoladas também foram originárias das raízes lavadas de plantas (MAGALHÃES *et al.*, 1983; REIS JUNIOR *et al.*, 2000; REIS JUNIOR, 2002; BRASIL *et al.*, 2005; GARRIDO *et al.*, 2010; BRASIL *et al.*, 2016). Os percentuais de isolados obtidos também variaram com relação à espécie da forrageira, sendo maiores nas *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizanta* cv. Marandu e *B. humidicola*

**Tabela 0-1.** Quantificação da população de bactérias diazotróficas cultiváveis (número de células por grama de solo ou raiz) colonizando vinte genótipos de *Brachiaria* usando os meios de cultivo semi-sólidos livres de nitrogênio (NFb e LGI).

Espécie	Genótipo	Meio de cultivo NFb			Total de isolados	Meio de cultivo LGI			Total de isolados
		n° de bactérias x 10 <sup>3</sup> /g raiz ou solo				n° de bactérias x 10 <sup>3</sup> /g raiz ou solo			
		RND	RD	SR		RND	RD	SR	
<i>Brachiaria arrecta</i>	A2	-	45	45	2	140	0,25	-	7
<i>Brachiaria brizanta</i>	B140	150	25	9,5	9	150	1500	45	7
<i>Brachiaria brizanta</i>	Marandu	9500	1500	150	6	950	-	250	1
<i>Brachiaria brizantha</i>	Paiaguás	140	-	-	3	140	110	0,75	10
<i>Brachiaria brizantha</i>	Piatã	140	140	25	6	140	30	1,5	4
<i>Brachiaria brizantha</i>	Xaraés	140	7,5	45	6	140	140	25	6
<i>Brachiaria decumbens</i>	Basilisk	14000	45000	250	9	750	-	-	3
<i>Brachiaria decumbens</i>	D24/2	1500	1500	-	7	2	-	-	1
<i>Brachiaria decumbens</i>	D24/27	140	140	140	8	3	0,07	140	8
<i>Brachiaria decumbens</i>	D24/45	140	3	45	8	-	25	250	6
<i>Brachiaria decumbens</i>	79-10	140	140	140	8	140	140	140	10
<i>Brachiaria decumbens</i>	X009	140	110	110	15	4	110	-	7
<i>Brachiaria decumbens</i>	B001	25	-	0,25	3	0,45	0,07	-	4
<i>Brachiaria humidicula</i>	Comum	110	-	140	5	-	200	140	5
<i>Brachiaria humidicula</i>	H31	140	140	45	4	140	2,5	2	6
<i>Brachiaria humidicula</i>	H47	95	-	-	1	45000	110000	-	4
<i>Brachiaria humidicula</i>	Tupi	-	95	-	2	-	-	0,04	2
<i>Brachiaria spp.</i>	Ipyporã	140	140	140	8	140	140	140	7
<i>Brachiaria spp.</i>	Mulato II	140	140	140	7	140	3	150	6
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	R134	-	2,5	-	1	-	-	-	-

Legenda: RND: Raiz não desinfestada superficialmente, RD: Raiz desinfestada superficialmente e SR: Solo rizosférico. O isolamento foi realizado com os dois exemplares de *Brachiaria* de cada genótipo analisado, sendo inoculando em meio semi-sólido até a diluição 10<sup>-7</sup>.

H47 (Tabela 1). A maior colonização pelas bactérias no sistema radicular pode estar relacionada à liberação de exsudatos, pois as variações que ocorrem na população microbiana da rizosfera são altamente dependentes do tipo de solo, espécie vegetal e genótipo utilizado. Diante do exposto, um aspecto importante a ser considerado na seleção de estirpes promissoras é a relação de especificidade entre planta e bactéria (BALDANI E BALDANI, 2005).

A presença de bactérias diazotróficas em raiz não desinfestada, raiz desinfestada superficialmente e solo da rizosfera dos 20 genótipos de *Brachiaria* foi demonstrado pela formação de película característica nos dois meios semi-sólidos livres de nitrogênio (NFb e LGI). Os resultados indicam a ocorrência de bactérias diazotróficas dos gêneros *Azospirillum* e *Nitrospirillum* em solo do cerrado associadas às vinte espécies de *Brachiaria* estudadas (Tabela 1). Bactérias diazotróficas da espécie *Nitrospirillum amazonense* (syn. *Azospirillum amazonense*) foram observadas em diferentes pastagens de *Brachiaria* por Reis Junior et al. (2004), estabelecidas em regiões do ecossistema Cerrado (Santo Antônio de Goiás, GO) e de Mata Atlântica (Itabela, BA) indicando ampla distribuição desses microorganismos.

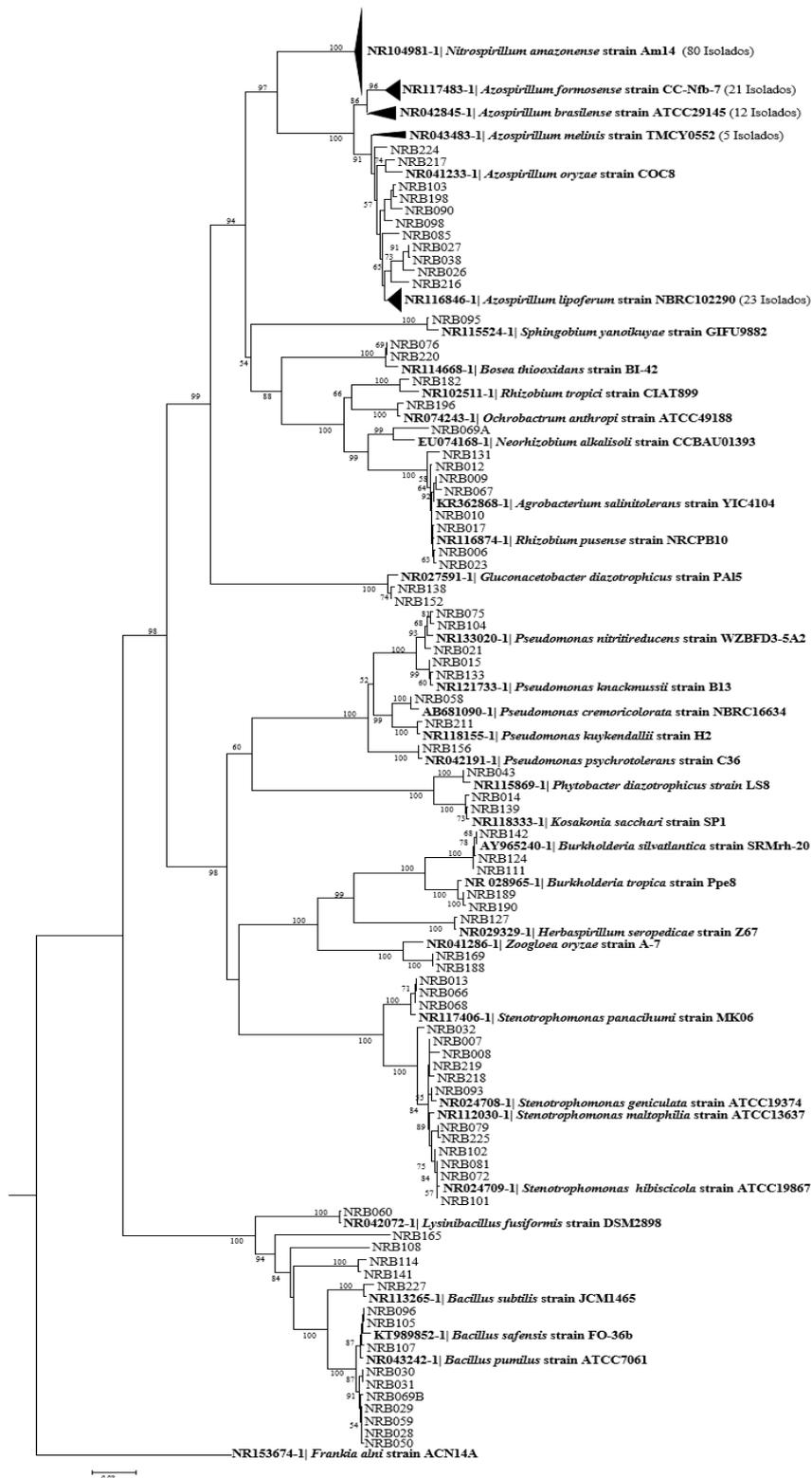
### 3.2. Caracterização molecular e Análise da diversidade dos Isolados

As sequências da subunidade 16S rRNA apresentaram entre 97% e 99% de similaridade quando comparadas às sequências do banco de dados NCBI (ANEXO E). As análises das sequências parciais do gene 16S rRNA permitiram a identificação taxonômica dos 216 isolados em nível de gênero, sendo observado uma elevada diversidade bacteriana com a identificação de 17 gêneros, mesmo utilizando os meios de cultivo semi-seletivos NFb e LGI (FIGURA 5). Esses resultados corroboram assim com os estudos realizados por Chalita *et al.* (2013) que também observaram uma enorme diversidade de bactérias diazotróficas associadas a plantas de *Brachiaria brizantha* e *B. humidicula* cultivadas em solos do Cerrado.

A análise dos dados permitiu inferir que sequências de bactérias diazotróficas que predominantemente colonizavam os tecidos dos vinte genótipos de *Brachiaria* no momento da coleta pertenciam aos gêneros *Nitrospirillum* (35,6%), seguido de *Azospirillum* (32,9%) e *Bacillus* (6,5%).

As análises filogenéticas indicam a presença de *Nitrospirillum amazonense* (NRB046, NRB116, NRB135, NRB143, NRB144A, NRB150, NRB174, NRB187, entre outras), *Azospirillum brasilense* (NRB194, NRB200, NRB204), *A. lipoferum* (NRB025, NRB024, NRB080, NRB099, NRB106, NRB199, NRB203) e *A. formosense* (NRB018, NRB071, NRB082, NRB089, NRB214, NRB222, NRB230) (FIGURA 5). Além destas espécies, sequências similares a espécie *Paraburkholderia tropica* (NRB189 e NRB190), *Paraburkholderia silvatlantica* (NRB111, NRB124 e NRB142), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (NRB138 e NRB152) e *Herbaspirillum seropedicae* (NRB127) também foram identificadas (FIGURA 5).

Além da diversidade de gêneros obtidos, foi observado no gênero *Azospirillum* uma diversidade intragênica, uma vez que foram formados subgrupos dentro do agrupamento das espécies de *A. lipoferum* (ANEXO F), *A. brasilense* (ANEXO G), *A. formosense* (ANEXO H) e *A. melinis* (ANEXO I). Martin-Didonet *et al.*, (2000) e Venieraki *et al.*, (2011) em seus estudos com *Azospirillum* também observaram uma

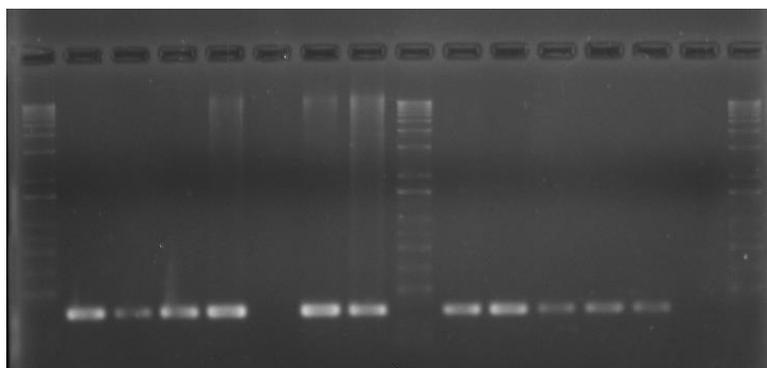


**Figura 5.** Árvore filogenética baseada em sequências do gene 16S rRNA (~1.450bp), incluindo as estirpes tipos de bactérias depositadas no banco de dados NCBI. A filogenia foi baseada no agrupamento de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e modelo Kimura utilizando o programa MEGA6.1. Números localizados nos ramos indicam a porcentagem de 1.000 subamostragens (bootstrap). A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. A sequência do gene 16S rRNA de *Frankia alni* foi utilizada para o enraizamento da árvore

diversidade intragênica entre seus isolados. Martin-Didonet e colaboradores (2000), alegam que as diferenças nos padrões de DNA encontrados entre as estirpes da mesma espécie de *Azospirillum* sugerem que, embora seja estável, as estruturas do genoma desses organismos parecem evoluir mais rapidamente do que a diferenciação das espécies. O mecanismo subjacente ao desenvolvimento dessas estruturas genômicas é desconhecido, mas provavelmente envolve rearranjos genéticos entre sequências de DNA homólogas compartilhadas por dois ou mais replicons, como observado em *Brucella* (JUMAS-BILAK *et al.*, 1988), além de também envolver a troca horizontal de genes.

O gênero *Nitrospirillum* também apresentou uma diversidade intragênica, sendo observado a formação de quatro grupos distintos. O primeiro e maior grupo é formado por 42 estirpes, o segundo pelas estirpes NRB153 e NRB157, o terceiro por 33 estirpes e o quarto formado por uma única estirpe, a NRB181 (ANEXO J). Tal fato, corrobora com os estudos realizados por Reis Junior *et al.* (2006) e Azevedo *et al.* (2005), onde estes autores encontraram uma diversidade entre as estirpes de *Nitrospirillum* isoladas de *Brachiaria* e arroz, respectivamente.

Outras bactérias filogeneticamente similares às espécies *Phytobacter diazotrophicus* (NRB043), *Stenotrophomonas maltophilia* (NRB218, NRB219 e NRB225), também foram identificadas entre as estirpes diazotróficas isoladas. Embora todas as estirpes tenham sido obtidas de meios semi-sólidos, para a confirmação que as mesmas são microrganismos diazotóxicos, todas as 222 estirpes foram submetidas a amplificação do gene *nifH* utilizando os iniciadores descritos por Poly *et al.* (2001). A reação de PCR mostrou produto de amplificação do tamanho esperado (~360 bp) para a maioria das estirpes (FIGURA 6), exceção feita para 33 estirpes que não mostraram produto de amplificação do gene alvo (ANEXO L). Tal ocorrido pode ser devido a metodologia utilizada ou por estas estirpes apresentarem uma via alternativa da nitrogenase, sendo os genes envolvidos os *vnf* e *anf* (JOERGER *et al.*, 1989; CHAKRABORTY *et al.*, 1995; WAUGH *et al.*, 1995; FARNELID *et al.*, 2013; SHIN *et al.*, 2016)



**Figura 6.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% da amplificação do gene *nifH* de bactérias isoladas de *Brachiaria*

O sequenciamento dos fragmentos do gene *nifH* foi realizado somente nas estirpes selecionadas para experimento de casa de vegetação, sendo que das 32 estirpes selecionadas (ANEXO K), duas não apresentaram a banda do fragmento esperado (NRB021 e NRB108) e outras duas apresentaram concentrações muito baixas do produto da PCR (NRB045 e NRB054), inviabilizando assim o sequenciamento das mesmas. O sequenciamento das demais estirpes identificadas anteriormente com base no gene 16S rRNA mostraram que as estirpes NRB041, NRB046, NRB115, NRB140, NRB146,

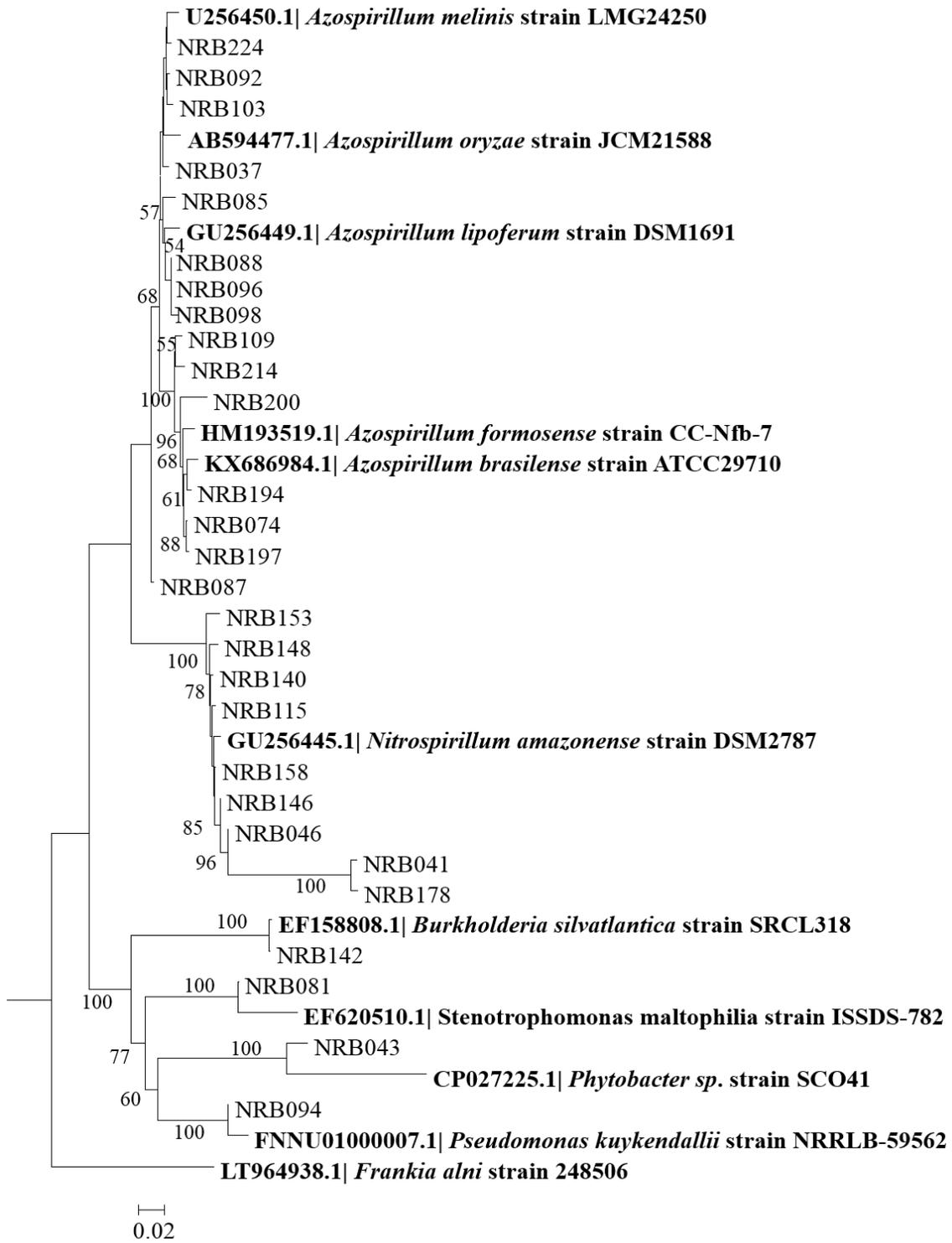
NRB148, NRB153, NRB158 e NRB178 tiveram 100% de homologia com gene *nifH* de *Nitrospirillum amazonense*. Este valor de homologia também foi observado para a estirpe NRB142 com o gene *nifH* de *Burkholderia silvatlantica*, NRB081 com o gene *nifH* de *Stenotrophomonas maltophilia*, NRB043 com o gene *nifH* de *Phytobacter* sp. e NRB094 com o gene *nifH* de *Pseudomonas kuykendallii* (FIGURA 7), corroborando assim com os resultados obtidos na análise do gene 16S rRNA.

As estirpes NRB074, NRB109, NRB194, NRB197, NRB200 e NRB214 estão intimamente relacionadas às espécies *Azospirillum brasilense* ou *A. formosense*, em relação aos genes 16S rRNA e *nifH*. No entanto, cada árvore filogenética apresentou diferentes topografias (FIGURAS 5 e 7). Tal fato pode ser explicado pela alta similaridade dos genes 16S e *nifH* entre as espécies *A. brasilense* e *A. formosense* (LIN *et al.*, 2012). As demais estirpes mostraram homologia com o gene *nifH* de *A. melinis*, *A. lipoferum* e *A. oryzae*, assim como o observado para o gene 16S rRNA, porém apresentaram agrupamentos distintos (FIGURAS 5 e 7). Os resultados observados podem ser devidos à ausência de sincronismo evolutivo entre os genes analisados, para as diferentes espécies de *Azospirillum*, apesar do elevado nível de similaridade que estes genes apresentam' (LIU *et al.*, 2012). Além disso, Gaby e Buckley (2014) relatam que, devido à divergência genética dos genes *nifH* e 16S rRNA, eles geralmente produzem resultados diferentes, além do fato que metade dos genomas de *Azospirillum lipoferum* e *A. brasilense* compreendem genes adquiridos por transferência horizontal (WISNIEWSKI-DYÉ *et al.*, 2012). Diante do exposto, para a confirmação dos agrupamentos obtidos, é necessário o estudo com outros genes, tais como os genes housekeeping (*dnaK*, *glnII*, *gyrB* e *recA*). A análise de genes housekeeping tornou-se uma ferramenta amplamente empregada para a investigação de relações taxonômicas. Em comparação com o 16S rRNA, o maior grau de divergência de sequências dos genes housekeeping é considerado essencial para fins de identificação, já que as sequências do gene rRNA são mais conservadas e nem sempre permitem a discriminação de espécies (WERTZ *et al.*, 2003; ADEKAMBI E DRANCOURT, 2004; CHRISTENSEN *et al.*, 2004; HOLMES *et al.*, 2004; NASER *et al.*, 2005; THOMPSON *et al.*, 2005).

O gênero *Azospirillum* apresentou o maior número de espécies (*A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. melinis*, *A. formosense* e *A. oryzae*), seguido dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* (TABELA 2). A maior diversidade bacteriana foi observada entre os isolados obtidos de *Brachiaria decumbens*, seguida da *B. brizantha*, sendo o genótipo 24/27 aquele que apresentou o maior número de espécies diferentes compondo a coleção de isolados produzida (TABELA 2).

A maior frequência de isolados foi observada para a espécie *Nitrospirillum amazonense* (35,78%), com 22 estirpes originárias de raízes desinfestadas, 35 estirpes de raízes não desinfestadas e 20 estirpes de solo da rizosfera. Esta espécie bacteriana foi isolada de quase todos os genótipos de *Brachiaria*, com exceção do Marandu e R134 (TABELA 2). Dentre os vinte genótipos em estudo, o cultivar 79-10 apresentou o maior número de estirpes de *N. amazonense* isoladas e que corresponderam a 10,25% do total de isolados (TABELA 2). As espécies bacterianas com o segundo e terceiro maior número de representantes foram a *Azospirillum lipoferum* (29 estirpes) e *Azospirillum formosense* (24 estirpes), sendo que, a primeira foi isolada de 15 genótipos e a segunda de 8 genótipos de *Brachiaria*.

O fato dos gêneros *Nitrospirillum* e *Azospirillum* terem apresentado o maior número de isolados deve ser devido ao uso dos meios semi-seletivos LGI e NFb para estes gêneros, respectivamente, além da ampla distribuição ecológica (DÖBEREINER E PEDROSA, 1987), já tendo sido encontrados em associação com *Brachiaria spp.* (REIS



**Figura 7.** Árvore filogenética baseada em sequências do gene *nifH* (~360bp), incluindo as estirpes de bactérias depositadas no banco de dados NCBI. A filogenia foi baseada no agrupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e modelo Kimura utilizando o programa MEGA6.1. Números localizados nos ramos indicam a porcentagem de 1.000 subamostragens (bootstrap). A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. A sequência do gene *nifH* de *Frankia alni* foi utilizada para o enraizamento da árvore.

*et al.*, 2001; REIS JUNIOR *et al.*, 2004; BRASIL *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2013), *Pennisetum purpureum* (Videira *et al.*, 2012) sorgo forrageiro (BERGAMASCHI *et al.*, 2007), forrageiras no semiárido brasileiro (SANTOS *et al.*, 2013), forrageiras nativas do Pantanal brasileiro (*Mesosetum chaseae*, *Axonopus purpusii* e *Hymenachne amplexicaulis*) (SOUZA *et al.*, 2017), além de outras gramíneas como milho (DÖBEREINER *et al.*, 1976; ROESCH *et al.*, 2007), trigo (SALA *et al.*, 2005); arroz (BALDANI *et al.*, 1984; XIE E YOKOTA, 2005; KUSS *et al.*, 2007; CARDOSO *et al.*, 2010), cana-de-açúcar (REIS JUNIOR *et al.*, 2000. Além de fixar o nitrogênio atmosférico (STEENHOUDT E VANDERLEYDEN, 2000; KUSS *et al.*, 2007; VIDEIRA *et al.*, 2012), essas espécies são capazes de solubilizar fosfato (RODRÍGUEZ *et al.*, 2004; VIDEIRA *et al.*, 2012; LÓPEZ-ORTEGA *et al.*, 2013) produzir hormônios vegetais como o ácido-indol-acético (REIS JUNIOR *et al.*, 2004; KUSS *et al.*, 2007; VIDEIRA *et al.*, 2012), estimulando o desenvolvimento radicular, aumento a densidade e crescimento das raízes laterais.

Dentre os 222 isolados, 15 isolados apresentaram similaridade taxonômica com o gênero *Bacillus* sp. (TABELA 2 e ANEXO E), gênero este que já foi encontrado em associação com arroz (DAFFONCHIO *et al.*, 1998; XIE *et al.*, 1998; BENEDUZI *et al.*, 2008), trigo (NEAL E LARSON, 1976;), gramíneas tropicais semi-áridas da Índia (SARATHAM-BAL *et al.*, 2015), *Brachiaria brizantha* (SILVA *et al.*, 2013), solo de pastagem da Amazônia (SILVA *et al.*, 2011). Existem mais de 191 espécies e 4 subespécies descritas no gênero *Bacillus* (LPSN, 2018). No âmbito da agricultura existem diversos produtos que tem como ingrediente ativo bactérias deste gênero, consideradas como rizobactérias promotoras do crescimento vegetal. Estudos realizados por Beneduzi *et al.* (2008), Sarathambal *et al.* (2015) e Passari *et al.* (2016) com *Bacillus* comprovam o grande potencial deste gênero em solubilizar fósforo inorgânico, atuar no controle biológico de fitopatógenos com a produção de sideróforos e capacidade celulolítica, produzir AIA e fixar biologicamente o nitrogênio atmosférico.

Foi possível isolar bactérias com alta similaridade à espécie *Stenotrophomonas maltophilia* (TABELA 2 e ANEXO E). Já foi relatado na literatura o seu isolamento de amostras de solo e raízes de *Brachiaria brizantha* (SILVA *et al.*, 2013), além de outras gramíneas tais como arroz (MEHNAZ *et al.*, 2001), trigo (GERMIDA E SICILIANO, 2001) e também de raízes de bananeira (AMBAWADE E PATHADE, 2013). Bactérias pertencentes a este gênero são candidatas promissoras para aplicações biotecnológicas na agricultura, uma vez que, podem promover um efeito positivo na produtividade das plantas através de vários mecanismos, como a produção de ácido-indol-acético (SUCKSTORFF E BERG, 2003; AMBAWADE E PATHADE, 2013), fixação de biológica do nitrogênio atmosférico (PARK *et al.*, 2005; LIBA *et al.*, 2006), e oxidação de enxofre elementar (BANERJEE; YESMIN, 2009).

Também foi possível isolar bactérias com alta similaridade ao gênero *Pseudomonas* (TABELA 2 e ANEXO E). A literatura relata o seu papel como promotor de crescimento vegetal em gramíneas (PERRINE *et al.*, 2001; GRAY E SMITH, 2005). O gênero *Pseudomonas* possui uma ampla distribuição mundial, já sendo encontrado em canola, arroz e trigo (VERMA *et al.*, 2001), milho (RODRÍGUEZ-BLANCO *et al.*, 2015), *Pennisetum purpureum* (VIDEIRA *et al.*, 2012), *Brachiaria brizantha* (SILVA *et al.*, 2013) e em diversas espécies vegetais (ZINNIEL *et al.*, 2002; MOCALI *et al.*, 2003). Sua atuação é relevante devido à capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico (RODRÍGUEZ-BLANCO *et al.*, 2015), de produzir o fitohormônio ácido-indolacético (PATTEN E GLICK 2002; PEDRAZA *et al.*, 2004; VIDEIRA *et al.*, 2012; PASSARI *et al.*, 2016), de solubilizar fosfato (RODRÍGUEZ E FAGA, 1999; PASSARI *et al.*, 2016),

**Tabela 0-2.** Número de espécies bacterianas isoladas dos vinte genótipos de *Brachiaria* e identificadas taxonomicamente por sequenciamento do gene 16S rRNA

Espécie de planta	Genótipo	Quant	Espécie bacteriana	Espécie de planta	Genótipo	Quant	Espécie bacteriana
<i>B. arrecta</i>	A-2	7	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	<i>B. humidicula</i>	H31	5	<i>Nitrospirillum amazonense</i>
<i>B. arrecta</i>	A-2	3	<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>B. humidicula</i>	H31	2	<i>Azospirillum lipoferum</i>
<i>B. arrecta</i>	A-2	1	<i>Bacillus aerius strain</i>	<i>B. humidicula</i>	H31	1	<i>Bacillus aerius</i>
<i>B. arrecta</i>	A-2	1	<i>Kosakonia sacchari</i>	<i>B. humidicula</i>	H31	1	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B. arrecta</i>	A-2	1	<i>Rhizobium pusense</i>	<i>B. humidicula</i>	H31	1	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>
<i>B. decumbens</i>	Basilisk	1	<i>Azospirillum oryzae</i>	<i>B. humidicula</i>	H31	1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
<i>B. decumbens</i>	Basilisk	2	<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>B. humidicula</i>	H31	1	<i>Rhizobium endolithicum</i>
<i>B. decumbens</i>	Basilisk	2	<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>B. humidicula</i>	H31	1	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>
<i>B. decumbens</i>	Basilisk	3	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	<i>B. humidicula</i>	H47	5	<i>Nitrospirillum amazonense</i>
<i>B. decumbens</i>	Basilisk	1	<i>Kosakonia sacchari</i>	<i>B. humidicula</i>	H47	1	<i>Azospirillum formosense</i>
<i>B. decumbens</i>	D24/2	1	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	<i>B. humidicula</i>	Tupi	1	<i>Nitrospirillum amazonense</i>
<i>B. decumbens</i>	D24/2	1	<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>B. humidicula</i>	Tupi	1	<i>Bacillus safensis</i>
<i>B. decumbens</i>	D24/2	1	<i>Burkholderia tropica</i>	<i>B. humidicula</i>	Tupi	1	<i>Pseudomonas geniculata</i>
<i>B. decumbens</i>	D24/2	1	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	<i>B. humidicula</i>	Tupi	1	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>
<i>B. decumbens</i>	D24/45	5	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	<i>B. brizantha</i>	Marandu	1	<i>Azospirillum brasilense</i>
<i>B. decumbens</i>	D24/45	1	<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>B. brizantha</i>	Marandu	3	<i>Azospirillum formosense</i>
<i>B. decumbens</i>	D24/45	4	<i>Azospirillum formosense</i>	<i>B. brizantha</i>	Marandu	2	<i>Azospirillum lipoferum</i>
<i>B. decumbens</i>	D24/45	4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>B. brizantha</i>	Marandu	1	<i>Paraburkholderia silvatlantica</i>
<i>B. decumbens</i>	D24/45	1	<i>Rhizobium pusense</i>	<i>B. brizantha</i>	Paiaguás	6	<i>Nitrospirillum amazonense</i>
<i>B. decumbens</i>	D24/45	2	<i>Pseudomonas knackmussii</i>	<i>B. brizantha</i>	Paiaguás	1	<i>Azospirillum lipoferum</i>
<i>B. decumbens</i>	D24/27	7	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	<i>B. brizantha</i>	Paiaguás	1	<i>Azospirillum melinis</i>
<i>B. decumbens</i>	D24/27	2	<i>Azospirillum formosense</i>	<i>B. brizantha</i>	Paiaguás	1	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. decumbens</i>	D24/27	2	<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>B. brizantha</i>	Paiaguás	1	<i>Phytobacter diazotrophicus</i>
<i>B. decumbens</i>	D24/27	1	<i>Azospirillum melinis</i>	<i>B. brizantha</i>	Paiaguás	1	<i>Zoogloea oryzae</i>

<i>B. decumbens</i>	D24/27	1	<i>Bacillus aerius</i>	<i>B. brizantha</i>	Piatã	4	<i>Nitrospirillum amazonense</i>
<i>B. decumbens</i>	D24/27	1	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	<i>B. brizantha</i>	Piatã	1	<i>Azospirillum brasilense</i>
<i>B. decumbens</i>	D24/27	1	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	<i>B. brizantha</i>	Piatã	1	<i>Azospirillum formosense</i>
<i>B. decumbens</i>	D24/27	1	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i>	<i>B. brizantha</i>	Piatã	1	<i>Azospirillum lipoferum</i>
<i>B. decumbens</i>	D24/27	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>B. brizantha</i>	Piatã	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>B. decumbens</i>	D24/27	2	<i>Stenotrophomonas panacihumi</i>	<i>B. brizantha</i>	Xaraés	3	<i>Nitrospirillum amazonense</i>
<i>B. decumbens</i>	79-10	8	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	<i>B. brizantha</i>	Xaraés	2	<i>Azospirillum lipoferum</i>
<i>B. decumbens</i>	79-10	1	<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>B. brizantha</i>	Xaraés	1	<i>Azospirillum melinis</i>
<i>B. decumbens</i>	79-10	2	<i>Azospirillum formosense</i>	<i>B. brizantha</i>	Xaraés	1	<i>Pseudomonas kuykendallii</i>
<i>B. decumbens</i>	79-10	2	<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>B. brizantha</i>	Xaraés	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>B. decumbens</i>	79-10	1	<i>Azospirillum oryzae</i>	<i>B. brizantha</i>	Xaraés	1	<i>Zoogloea oryzae</i>
<i>B. decumbens</i>	79-10	1	<i>Bacillus aerius</i>	<i>B. brizantha</i>	B140	3	<i>Nitrospirillum amazonense</i>
<i>B. decumbens</i>	79-10	1	<i>Bacillus safensis</i>	<i>B. brizantha</i>	B140	3	<i>Azospirillum lipoferum</i>
<i>B. decumbens</i>	79-10	2	<i>Pseudomonas nitritireducens</i>	<i>B. brizantha</i>	B140	2	<i>Azospirillum oryzae</i>
<i>B. decumbens</i>	79-10	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>B. brizantha</i>	B140	1	<i>Paraburkholderia tropica</i>
<i>B. decumbens</i>	B001	3	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	<i>B. brizantha</i>	B140	1	<i>Paraburkholderia silvatlantica</i>
<i>B. decumbens</i>	B001	3	<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>B. brizantha</i>	B140	1	<i>Pseudomonas kuykendallii</i>
<i>B. decumbens</i>	B001	1	<i>Bacillus aerius</i>	<i>B. ruzizienses</i>	R134		<i>Azospirillum lipoferum</i>
<i>B. decumbens</i>	B001	1	<i>Bacillus cereus</i>	<i>B. spp.</i>	Mulato II	4	<i>Nitrospirillum amazonense</i>
<i>B. decumbens</i>	X009	6	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	<i>B. spp.</i>	Mulato II	1	<i>Azospirillum formosense</i>
<i>B. decumbens</i>	X009	10	<i>Azospirillum formosense</i>	<i>B. spp.</i>	Mulato II	1	<i>Azospirillum oryzae</i>
<i>B. decumbens</i>	X009	1	<i>Azospirillum melinis</i>	<i>B. spp.</i>	Mulato II	1	<i>Bacillus aryabhatai</i>
<i>B. decumbens</i>	X009	1	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	<i>B. spp.</i>	Mulato II	1	<i>Bacillus safensis</i>
<i>B. decumbens</i>	X009	1	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	<i>B. spp.</i>	Mulato II	1	<i>Bacillus safensis</i>
<i>B. decumbens</i>	X009	5	<i>Rhizobium pusense</i>	<i>B. spp.</i>	Ipyporã	4	<i>Nitrospirillum amazonense</i>
<i>B. decumbens</i>	X009	1	<i>Stenotrophomonas panacihumi</i>	<i>B. spp.</i>	Ipyporã	2	<i>Azospirillum lipoferum</i>
<i>B. decumbens</i>	X009	1	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	<i>B. spp.</i>	Ipyporã	1	<i>Azospirillum oryzae</i>

<i>B. humicula</i>	Comum	3	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	<i>B. spp.</i>	Ipyporã	1	<i>Bacillus aerius</i>
<i>B. humicula</i>	Comum	1	<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>B. spp.</i>	Ipyporã	2	<i>Bosea thiooxidans</i>
<i>B. humicula</i>	Comum	3	<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>B. spp.</i>	Ipyporã	1	<i>Paraburkholderia silvatlantica</i>
<i>B. humicula</i>	Comum	1	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	<i>B. spp.</i>	Ipyporã	1	<i>Rhizobium tropici</i>

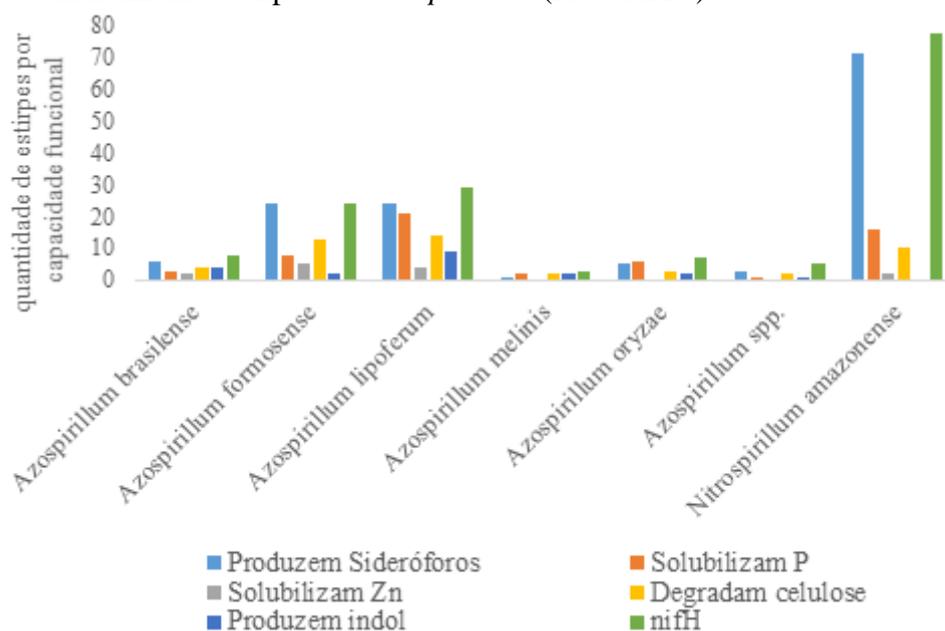
---

solubilizar ZnO (FASIM *et al.*, 2002). Além de promover o crescimento de plantas este gênero é descrito como agente no controle de pragas e doenças já que são produtoras de sideróforos (TIAN *et al.*, 2009; PASSARI *et al.*, 2016).

Além das espécies já mencionadas anteriormente, também foi obtido um isolado de *Ochrobactrum anthropi*, NRB196, sendo este o primeiro relato de isolamento desta espécie em *Brachiaria* spp. (TABELA 2 e ANEXO E). No entanto, já foi observado sua presença em milho (MCINROY E KLOPPER, 1995); mandioca (TEIXEIRA, 2004); rizosfera de figo-da-índia (COSTA, 2003); raízes de alcachofra (MENG *et al.*, 2014). Além de fixar o nitrogênio atmosférico, representantes desta espécie são capazes de solubilizar fosfato, produzir hormônios vegetais como o ácido-indol-acético e produzir sideróforos (CHAKRABORTY *et al.*, 2009; MENG *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2015).

### 3.3. Avaliação da capacidade funcional das estirpes

Todas as estirpes de *Azospirillum* e *Nitrospirillum* apresentaram a banda específica do gene *nifH*, o que já era o esperado, uma vez que estes gêneros pertencem a o grupo de bactérias diazotróficas. Em relação às capacidades de produção de sideróforos, solubilização de fosfato inorgânico e degradação celulolítica, todas as espécies de ambos os gêneros anteriormente citados apresentaram estirpes com estas capacidades. Tal fato não foi observado nas capacidades de solubilização de zinco e produção de indol, uma vez que somente as espécies *A. brasilense*, *A. formosense*, *A. lipoferum* e *N. amazonense* apresentaram estirpes com a primeira capacidade, já para a segunda capacidade não foi observada em nenhuma estirpe de *Nitrospirillum* (FIGURA 8).

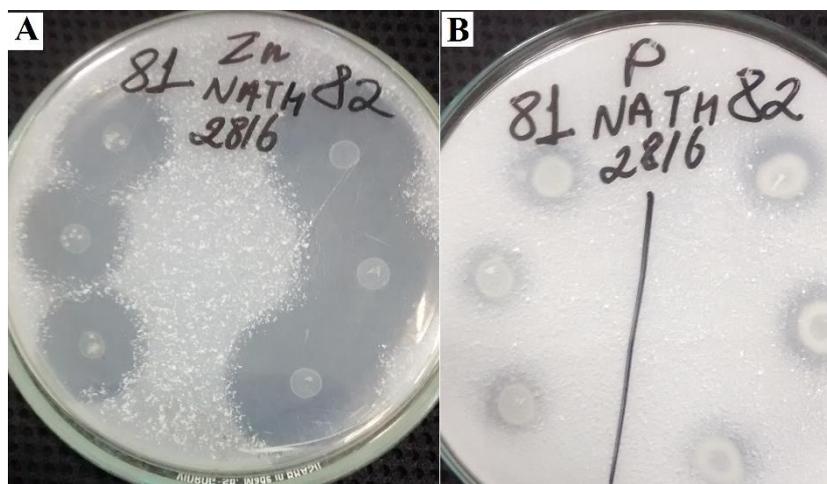


**Figura 8.** Quantidade de isolados bacterianos de sete espécies de bactérias diazotróficas (*Nitrospirillum amazonense*, *Azospirillum* spp., *A. melinis*, *A. lipoferum*, *A. formosense*, *A. oryzae* e *A. brasilense*) por capacidade funcional avaliada (produção de sideróforos, solubilização de fosfato e zinco inorgânico, capacidade celulolítica e produção de indol)

Ao avaliar o número de estirpes por espécie com capacidade de produzir sideróforos, foi observado que todas as estirpes de *A. formosense* apresentaram esta capacidade, seguida da *N. amazonense* (92,21%) e *A. lipoferum* (82,76%). Já em relação as capacidades de solubilização de fosfato inorgânico e degradação de celulose, as espécies que apresentaram a maior porcentagem de estirpes com estas capacidades foram *A. oryzae* (85,71%) e *A. melinis* (66,67%), respectivamente.

### 3.3.1. Solubilização de Fosfato inorgânico e Zinco

A capacidade de solubilização de fosfato inorgânico e zinco pelas estirpes bacterianas isoladas de genótipos de *Brachiaria* spp. foram demonstradas por meio do halo de solubilização de acordo com Kumar e Narula (1999) (FIGURA 9).



**Figura 9.** Exemplo de formação de halo de solubilização de zinco (A) e solubilização de P (B) pelas estirpes NRB081 e NRB082 isoladas de *Brachiaria*

Das 222 estirpes, somente 87 (39,2%) apresentaram capacidade de solubilizar fosfato inorgânico. A estirpe que apresentou o maior índice de solubilização (I.S) foi a *Azospirillum formosense* NRB004 (2,6) seguida das *Rhizobium pusense* NRB010, *Pseudomonas nitritireducens* NRB075, *Bosea thiooxidans* NRB076, *A. lipoferum* NRB085, *Nitrospirillum amazonense* NRB180 e *A. formosense* NRB214 que apresentaram um I.S. maior que 2,0 enquanto que as *R. pusense* NRB009 (1,01) e *Bacillus aerius* NRB031 (1,12) apresentaram os menores I.S. (TABELA 3). De acordo com Madhaiyan et al (2004), o índice de solubilização de fosfato pode ser classificado em níveis, sendo alto quando maior que  $IS > 3$ , médio ( $2 < IS < 3$ ) e baixo ( $IS < 2$ ). Dos 39,2% de estirpes que apresentaram a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico, 8,05% obtiveram nível médio de I.S e as demais estirpes apresentaram nível baixo de solubilização (TABELA 3).

Além das espécies bacterianas mencionadas anteriormente com a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico *in vitro*, também foi observado estirpes das espécies como, por exemplo, *A. brasilense* (NRB074 e NRB208), *A. melinis* (NRB103 e NRB226), *A. oryzae* (NRB087 e NRB091), *Stenotrophomonas maltophilia* (NRB032 e NRB081), *Phytobacter diazotrophicus* (NRB043) e *Paraburkholderia silvatlantica* (NRB124 e NRB142), todas apresentando um índice de solubilização baixo (TABELA 3).

Rodríguez *et al.* (2004) mostraram capacidade de solubilização em P inorgânico em placas, observando halos de solubilização de 11 mm de diâmetro para estirpes de *A. brasilense* e 20 mm de diâmetro para *A. lipoferum*. Murty e Ladha (1988) ao inocularem *A. lipoferum* em sementes de arroz observaram um aumento no teor de íons fosfato, que resultou em melhorias significativas no comprimento da raiz e nos pesos de brotos frescos e secos. Em estudos realizados por López-Ortega e colaboradores (2013), todas as estirpes em estudo solubilizaram fosfato tricálcico, porém os isolados do gênero *Azospirillum* apresentaram valores inferiores quando comparados as espécies *B. japonicum* USDA110; T6: *Rhizobium* sp., C50; T7: *Klebsiella variicola* BRCG3. Tais estudos comprovam a capacidade do gênero *Azospirillum* em solubilizar fosfato inorgânico mencionada por

Rodríguez e Fraga (1999). Tal capacidade também foi observada em outras bactérias diazotróficas como por exemplo o trabalho de Estrada *et al.* (2013) que investigou a capacidade de 49 bactérias diazotróficas isolados de arroz. Os autores observaram que bactérias do gênero *Herbaspirillum* foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico somente em meio GL enquanto que as bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL5, *Burkholderia vietnamiensis* estirpes AR1121, AR1122, AR1125, AR114 e *B. kururiensis* estirpe VR2236 foram capazes de solubilizar fosfato tanto em meio GL como em meio NBRIP.

**Tabela 0-3.** Avaliação *in vitro* da capacidade de solubilizar fosfato inorgânico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) de bactérias diazotróficas obtidas de genótipos de *Brachiaria*

Isolado	I.S. <sup>(1)</sup>	Isolado	I.S. <sup>(1)</sup>	Isolado	I.S. <sup>(1)</sup>	Isolado	I.S. <sup>(1)</sup>
NRB004	2,60	NRB069B	1,48	NRB103	1,40	NRB179	1,27
NRB006	1,58	NRB074	1,88	NRB104	1,11	NRB180	2,27
NRB008	1,81	NRB075	2,49	NRB105	1,18	NRB181	1,30
NRB009	1,01	NRB076	2,52	NRB106	1,13	NRB182	1,47
NRB010	2,36	NRB078	1,70	NRB107	1,55	NRB186	1,19
NRB018	1,77	NRB080	1,46	NRB108	1,30	NRB189	1,27
NRB019	1,64	NRB081	1,61	NRB109	1,59	NRB192	1,14
NRB020	1,48	NRB082	1,47	NRB115	1,34	NRB193	1,37
NRB024	1,31	NRB084	1,99	NRB124	1,73	NRB195	1,27
NRB025	1,39	NRB085	2,45	NRB137	1,29	NRB198	1,35
NRB027	1,44	NRB086	1,89	NRB139	1,78	NRB199	1,30
NRB028	1,37	NRB087	1,77	NRB142	1,78	NRB203	1,35
NRB030	1,34	NRB088	1,37	NRB144A	1,34	NRB208	1,21
NRB031	1,12	NRB090	1,33	NRB144B	1,28	NRB210	1,26
NRB032	1,16	NRB091	1,33	NRB145	1,16	NRB213	1,38
NRB035	1,34	NRB092	1,40	NRB154	1,28	NRB214	2,20
NRB038	1,39	NRB095	1,51	NRB155	1,41	NRB217	1,33
NRB043	1,28	NRB097	1,22	NRB156	1,82	NRB220	1,29
NRB058	1,38	NRB098	1,25	NRB159	1,27	NRB224	1,38
NRB059	1,35	NRB099	1,38	NRB162	1,30	NRB226	1,27
NRB064	1,48	NRB100	1,39	NRB170	1,21	NRB228	1,32
NRB069A	1,51	NRB102	1,42	NRB177	1,28	PAL5 <sup>(2)</sup>	1,90

<sup>(1)</sup>Índice de solubilização (I.S.) é o diâmetro do halo dividido pelo diâmetro da colônia .

<sup>(2)</sup>*Gluconacetobacter diazotrophicus*, utilizada como controle positivo no teste de solubilização de fosfato *in vitro*.

A solubilização de fosfato tem sido atribuída à liberação de diversos ácidos orgânicos, sendo que, em estudos realizados por Lin e colaboradores (2006) o ácido glucônico foi o principal responsável pela solubilização de trifosfato de cálcio em uma estirpe de *B. cepacia*. Rodríguez *et al.* (2004) relataram que, na presença de frutose e glicose, as estirpes de *A. brasilense* e *A. lipoferum* produziram ácido glucônico envolvido no processo de solubilização do fosfato. Em estudos realizados com *A. formosense* (LIN *et al.*, 2012), *Stenotrophomonas maltophilia* (XIÃO *et al.*, 2009), *Pseudomonas spp* (MILLER *et al.*, 2010) comprovaram a produção de ácido glucônico por estas bactérias. Tal fato pode explicar a capacidade de solubilizar fosfato de algumas estirpes

do presente estudo, porém não foi realizada a quantificação da produção de ácido glucônico nas nossas estirpes.

Pouco se sabe sobre a espécie *Phytobacter diazotrophicus*, descrita por Zang *et al.* (2007). Em sua descrição não há relato sobre a capacidade de produção de ácido glucônico nem de solubilização de fosfato, no entanto a estirpe NRB043 (*P. diazotrophicus*) apresentou a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico (TABELA 3). Apesar de se saber que bactérias da espécie *Azospirillum formosense* são capazes de produzir ác. glucônico, não há relatos na literatura da sua capacidade de solubilizar fosfato, sendo assim um resultado inédito do presente estudo.

O entendimento da capacidade e da eficiência de microrganismos, em solubilizar fosfatos, pode levar à seleção de isolados com alto potencial de uso para a inoculação em plantas, levando em consideração que o fósforo é um dos nutrientes mais limitantes do crescimento vegetal, e em solos tropicais a sua disponibilidade é muito baixa (SOUCHIE *et al.*, 2007). A adubação com fósforo é uma prática necessária em solos agrícolas, mas, a grande maioria do fósforo aplicado acaba se tornando indisponível para as plantas, pois é rapidamente imobilizado por íons de ferro e alumínio em solos ácidos e por íons de cálcio em solos alcalinos (MOREIRA *et al.*, 2010). Assim, diversos microrganismos podem atuar por meio de mecanismos de solubilização de fosfato e desta forma contribuir para a promoção do crescimento vegetal (VERMA *et al.*, 2001).

Em relação a capacidade de solubilizar óxido de zinco, somente 21 estirpes apresentaram a atividade funcional dentre as 222 testadas (TABELA 4). Dentre estas 21 estirpes, dez também possuem a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, sendo estas: NRB043, NRB074, NRB075, NRB076, NRB081, NRB082, NRB085, NRB088, NRB139, NRB214 (TABELAS 3 e 4 e FIGURA 8).

**Tabela 0-4.** Avaliação *in vitro* da capacidade de solubilizar óxido de zinco de bactérias diazotróficas obtidas de genótipos de *Brachiaria*

Isolado	I.S. <sup>(1)</sup>	Isolado	I.S. <sup>(1)</sup>	Isolado	I.S. <sup>(1)</sup>
NRB011	1,29	NRB076	4,17	NRB096	1,80
NRB026	1,40	NRB078	3,54	NRB139	1,81
NRB043	1,66	NRB081	4,04	NRB208	1,46
NRB045	3,78	NRB082	5,13	NRB210	1,27
NRB060	1,29	NRB084	4,37	NRB214	3,32
NRB064	1,38	NRB085	4,46	PAL5 <sup>(2)</sup>	4,50
NRB074	3,48	NRB086	4,19		
NRB075	2,21	NRB088	2,48		

<sup>(1)</sup>Índice de solubilização (I.S.) é o diâmetro do halo dividido pelo diâmetro da colônia.

<sup>(2)</sup>*Gluconacetobacter diazotrophicus*, utilizada como controle positivo no teste de solubilização de óxido de zinco *in vitro*.

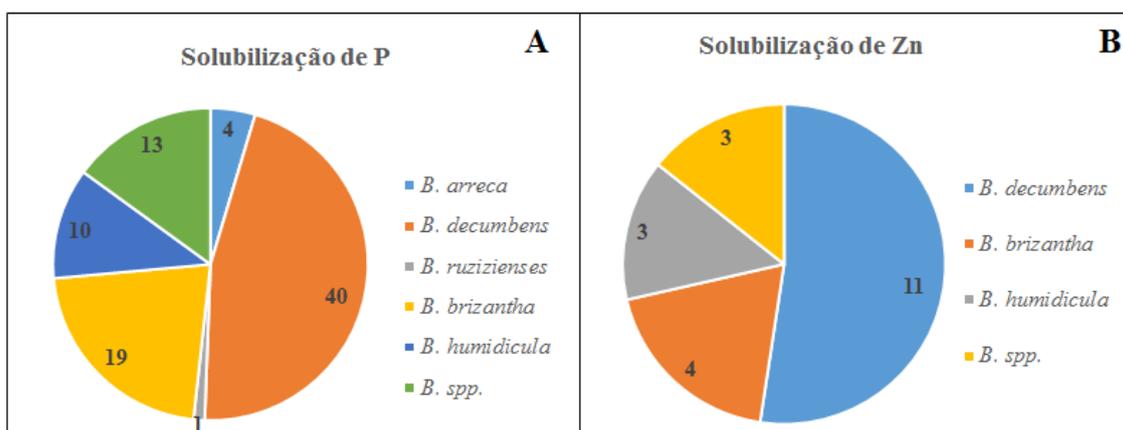
A estirpe de *A. formosense* NRB082, apresentou um índice de solubilização de óxido de zinco (I.S.) igual a 5,13, este sendo maior do que o controle positivo PAL5 (4,51) (TABELA 4). Saravanan e colaboradores (2007a) ao avaliarem a capacidade de solubilização de Zn em estirpes de *G. diazotrophicus*, observaram que todas possuíam a capacidade de solubilização, no entanto, a eficiência para solubilizar formas insolúveis de Zn variou entre as estirpes e a fonte de carbono utilizada.

Em trabalho realizado por Madhaiyan *et al.* (2004), os autores também verificaram uma variação entre os isolados de *G. diazotrophicus* para solubilizar as fontes de zinco insolúveis, onde todos os isolados foram capazes de solubilizar ZnO e ZnCO<sub>3</sub>,

exceto o isolado de beterraba (B3), enquanto que a estirpe *G. diazotrophicus* PAL5 mostrou a capacidade de solubilizar todas as fontes de zinco apresentando halos de solubilização de 38mm ( $ZnCO_3$ ), 32mm ( $ZnO$ ) e 26mm ( $ZnPO_4$ ) com glicose como fonte de carbono. No entanto, FASIM *et al.* (2002) em seu estudo com *Pseudomonas aeruginosa* obteve uma maior solubilização de  $ZnO$  do que  $Zn_3(PO_4)_2$ . Goteti e colaboradores (2013) em sua pesquisa de solubilização de zinco em estirpes de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. em meios suplementados com  $ZnO$  e  $ZnCO_3$ , observaram que todas as estirpes apresentaram a capacidade de solubilizar zinco em ambos os suplementos, porém o halo de solubilização foi maior para todas as estirpes de *Pseudomonas* avaliadas.

Kamran *et al.* (2017) ao avaliar a capacidade de solubilização de zinco em 24 isolados de trigo e cana-de-açúcar com 5 diferentes fontes de zinco ( $ZnCO_3$ ,  $ZnO$ ,  $Zn_3(PO_4)_2$ ,  $ZnCl_2$  e  $ZnSO_4$ ) observaram que nenhum isolado foi capaz de solubilizar zinco em meio suplementado com  $ZnCl_2$  e  $ZnSO_4$ . No entanto, nos meios suplementados com  $ZnCO_3$  e  $ZnO$ , observaram que seis estirpes apresentaram esta capacidade, sendo uma do gênero *Pseudomonas*, duas de *Pantoea*, duas de *Enterobacter* e uma de *Rhizobium*. Já no meio suplementado com  $Zn_3(PO_4)_2$ , vinte estirpes apresentaram uma fraca capacidade de solubilização, demonstrado assim que existe variação na capacidade de solubilização para diferentes formas químicas de Zn em relação aos demais testados. Tal fato pode explicar a baixa ocorrência de estirpes com capacidade de solubilizar zinco no presente trabalho, uma vez que só foi testado o meio suplementado com  $ZnO$ .

De todas espécies de *Brachiaria* em estudo foi possível identificar pelo menos um representante bacteriano com capacidade de solubilização de fosfato inorgânico (FIGURA 10.A), fato este não observado na solubilização de óxido de zinco, onde somente 4 das 7 espécies de braquiária apresentaram estirpes com esta capacidade (FIGURA 10.B). A espécie *B. decumbens* mostrou maior número de estirpes com ambas as capacidades, sendo 40 deles com capacidade de solubilizar fosfato inorgânico e 11 para solubilizar óxido de zinco.



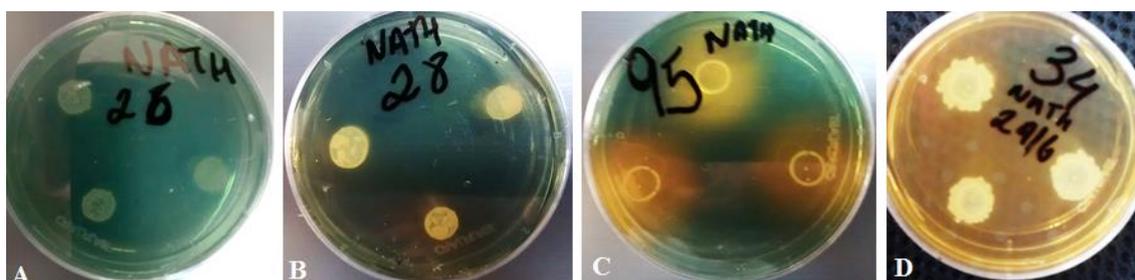
**Figura 10.** Quantidade de representantes bacterianos isolados de espécie de *Brachiaria* com capacidade de solubilização de fosfato inorgânico (A) e de solubilização de óxido de zinco (B).

Diante do exposto, a inclusão no inoculante de uma bactéria capaz de solubilizar o fosfato e zinco, além de fixar biologicamente o nitrogênio atmosférico é interessante para países com alta incidência de deficiência destes nutrientes. Assim, o entendimento dos mecanismos envolvidos na promoção do crescimento pode ajudar a minimizar o custo da produção de culturas já que o nitrogênio, fósforo e o zinco são os nutrientes

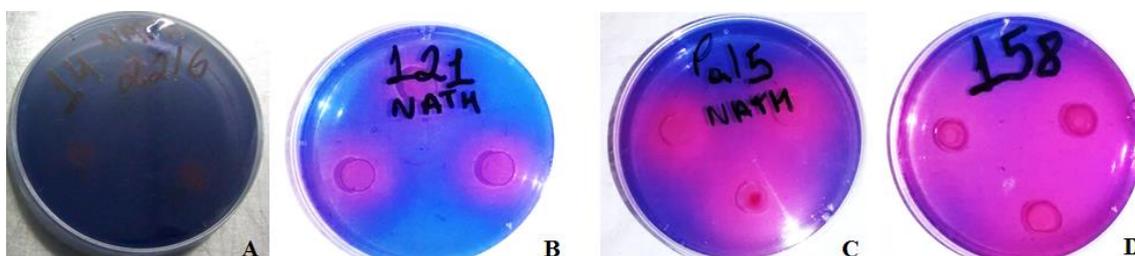
essencialmente exigidos pelas culturas e são relativamente lixiviados ou transformados em formas insolúveis. Assim, o uso de bactérias diazotróficas capazes de solubilizar Zn e P, podem ajudar a planta a compensar a deficiência desses nutrientes no solo. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar o potencial de solubilização de P e Zn para avaliar a sua viabilidade prática.

### 3.3.2. Produção de sideróforos

Das 222 estirpes testadas, 187 estirpes (84,23%) apresentaram uma alteração na cor de azul/amarelado (FIGURA 11) ou azul/rosa (FIGURA 12) nas placas de meio CAS indicando a produção de sideróforos. Cento e vinte e oito estirpes (68,45%), do total de estirpes com esta capacidade, apresentaram intensidade baixa, cinquenta (26,74%) apresentaram intensidade média, e nove (4,81%) apresentaram alta capacidade de produção de sideróforos (TABELA 5).



**Figura 11.** Produção de sideróforos das estirpes obtidas de *Brachiaria* em meio NFb sólido, sem azul de bromotimol e com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 0,1% de CAS. A mudança de cor azul/amarelo pode ser observada após 72 horas de incubação a 30° C. (A) isolado sem capacidade de produção; (B) isolado com capacidade baixa de produção; (C) isolado com capacidade média; e (D) isolado com capacidade alta de produção de sideróforos *in vitro*.



**Figura 12.** Produção de sideróforos das estirpes obtidas de *Brachiaria* em meio LGI sólido, sem azul de bromotimol e com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 0,1% de CAS. A mudança de cor azul/rosa pode ser observada após 72 horas de incubação a 30° C. (A) isolado sem capacidade de produção; (B) isolado com capacidade baixa de produção; (C) isolado com capacidade média; e (D) isolado com capacidade alta de produção de sideróforos *in vitro*.

As maiores intensidades de produção de sideróforos foram observadas em *Pseudomonas nitritireducens* estirpes NRB021 e NRB075, *Azospirillum lipoferum* estirpe NRB034, *Rhizobium pusense* estirpe NRB067, *Paraburkholderia silvatlantica* estirpe NRB124, *Nitrospirillum amazonense* estirpes NRB148 e NRB158, *Zoogloea oryzae* estirpe NRB169 e *Azospirillum formosense* estirpe NRB230 (TABELA 5). As estirpes NRB021, NRB034 e NRB230 produziram sideróforos do tipo catecolato uma vez que a mudança de cor foi do azul/amarelo (SCHWYN E NEILANDS, 1987). A produção de sideróforo foi tão intensa na *A. lipoferum* estirpe NRB034 que alterou a cor total do meio de cultivo da placa (FIGURA 11.D)

**Tabela 0-5.** Avaliação *in vitro* da capacidade de produção de sideróforos por bactérias diazotróficas isoladas de genótipos de *Brachiaria*.

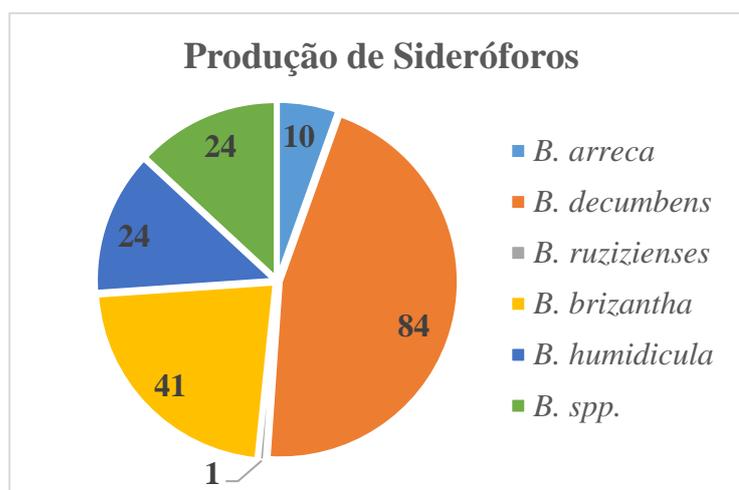
Isolado	Int. <sup>(1)</sup>	Isolado	Int. <sup>(1)</sup>														
NRB001	B	NRB025	B	NRB047	B	NBR072	M	NBR094	M	NBR122	B	NBR148	A	NBR177	B	NBR203	B
NRB002	B	NRB027	B	NRB048	B	NBR073A	M	NBR095	M	NBR123	B	NBR149	B	NBR178	B	NBR204	B
NRB003	B	NRB028	B	NRB049	B	NBR073B	B	NBR097	M	NBR124	A	NBR150	B	NBR179	B	NBR205	M
NRB004	B	NRB029	M	NRB050	B	NBR074	M	NBR098	B	NBR125	B	NBR151	M	NBR181	B	NBR206	B
NRB005	B	NRB030	B	NRB051	B	NBR075	A	NBR101	B	NBR126	M	NBR153	M	NBR182	B	NBR208	M
NRB006	B	NRB031	B	NRB052	B	NBR076	M	NBR102	M	NBR127	B	NBR154	B	NBR183	B	NBR209	M
NRB007	M	NRB032	B	NRB053	B	NBR077	B	NBR103	M	NBR128	B	NBR157	B	NBR184	B	NBR210	M
NRB008	M	NRB033	B	NRB054	B	NBR078	M	NBR104	M	NBR129	B	NBR158	A	NBR185	B	NBR211	B
NRB009	M	NRB034	A	NRB055	B	NBR079	B	NBR105	M	NBR130	M	NBR159	M	NBR186	B	NBR212	B
NRB010	M	NRB035	B	NBR060	B	NBR080	B	NBR106	B	NBR132	M	NBR160	B	NBR187	B	NBR214	B
NRB011	B	NRB036	B	NBR061	B	NBR081	B	NBR107	M	NBR133	B	NBR161	B	NBR188	M	NBR215	B
NRB012	B	NRB037	B	NBR062A	B	NBR082	M	NBR108	B	NBR134	B	NBR163	B	NBR189	M	NBR217	B
NRB015	M	NRB038	B	NBR062B	B	NBR083	B	NBR109	M	NBR135	B	NBR166	B	NBR190	B	NBR220	B
NRB016	M	NRB039	B	NBR063	B	NBR084	B	NBR111	M	NBR139	B	NBR167	B	NBR192	B	NBR221	B
NRB017	B	NRB040	B	NBR064	B	NBR085	M	NBR113	B	NBR140	B	NBR169	A	NBR194	M	NBR222	M
NRB018	B	NRB041	B	NBR065	B	NBR086	B	NBR114	B	NBR141	B	NBR170	M	NBR195	B	NBR224	M
NRB019	B	NRB042	B	NBR066	M	NBR087	M	NBR115	B	NBR142	M	NBR171	B	NBR196	B	NBR228	M
NRB020	B	NRB043	B	NBR067	A	NBR088	B	NBR116	B	NBR144	B	NBR172	B	NBR197	M	NBR230	A
NRB021	A	NRB044	B	NBR069B	M	NBR089	B	NBR119	B	NBR145	B	NBR173	B	NBR198	B	PAL5 <sup>(2)</sup>	M
NRB023	M	NRB045	B	NBR070	M	NBR090	B	NBR120	B	NBR146	B	NBR174	B	NBR199	B		
NRB024	B	NRB046	B	NBR071	M	NBR091	B	NBR121	B	NBR147	B	NBR175	B	NBR201	M		

<sup>(1)</sup> Análise qualitativa do nível de intensidade de produção de sideróforos (Int.) pelo isolado, sendo B: intensidade baixa, M: intensidade média e A: intensidade alta de produção.

<sup>(2)</sup> *Gluconacetobacter diazotrophicus*, utilizada como controle positivo no teste de produção de sideróforos *in vitro*

Todas as estirpes obtidas a partir de meio semi-sólido LGI produziram sideróforos do tipo oxalato uma vez que a cor final no meio foi rosa (SCHWYN E NEILANDS, 1987) (FIGURA 12). Quatro estirpes NRB067 (*Rhizobium pusense*), NRB124 (*Paraburkholderia silvatlantica*), NRB148 (*Nitrospirillum amazonense*) e NRB158 (*N. amazonense*) apresentaram uma alta intensidade na produção de sideróforos, 14 estirpes com produção média e 70 estirpes com baixa produção de sideróforos (Tabela 5).

Foi possível identificar pelo menos um representante bacteriano com a capacidade de produção de sideróforos para todas as espécies de *Brachiaria* em estudo (FIGURA 13). As espécies *B. decumbens* e *B. brizantha* mostraram a ocorrência de maior número de isolados com esta capacidade, 84 e 41 bactérias respectivamente, em contraste a espécie *B. arrecta* que teve somente um representante.



**Figura 13.** Quantidade de representantes bacterianos isolados de sete espécies de *Brachiaria* com capacidade de produção de sideróforos

A produção de sideróforos por bactérias associativas podem melhorar o crescimento vegetal, tanto aumentando a disponibilidade de nutrientes por meio da absorção de ferro como impedindo o crescimento de patógenos do solo devido à limitação de ferro (Chaiarn et al. 2009; Miethke e Marahiel 2007; Sayyed e Chincholkar 2009). Já foi demonstrado que uma variedade de espécies vegetais adquire ferro a partir de complexos de Fe-sideróforos, incluindo *Cucurbita pepo*, *Brassica. juncea* (SINHA E MUKHERJEE, 2008; BURD et al., 2000), *Helianthus annuus* (DIMKPA et al., 2009), *Medicago sativa* (CARRILLO-CASTANEDA et al., 2002) e *Vigna unguiculata* (DIMKPA et al., 2009) e, além disso, foi demonstrado que essa aquisição foi a razão de seu crescimento estimulado em solos contaminados por metais. Sendo assim, o isolamento e seleção de bactérias capazes de produzir sideróforos podem contribuir para o controle de fitopatógenos e desenvolvimento das plantas na agricultura.

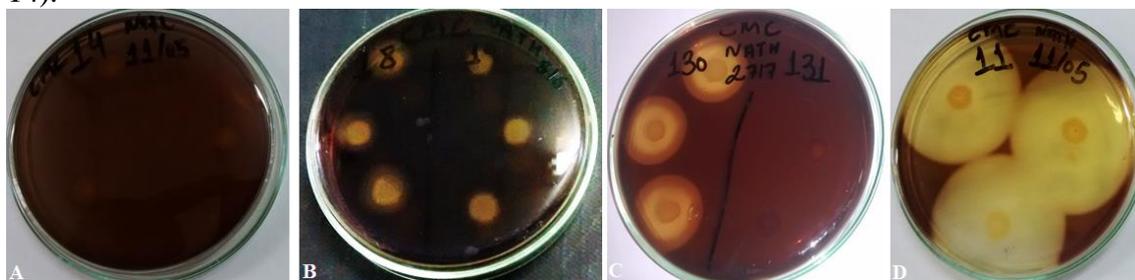
A produção de sideróforos no gênero *Azospirillum* já foi relatada por diversos autores, como por exemplo Pedraza et al. (2007 e 2010) e Tortora et al. (2011) em estirpes de *A. brasilense* isoladas de morango; Saxena et al. (1986) e Shah et al. (1992) em estirpes de *A. lipoferum* isoladas de raízes esterilizadas da *Digitaria*. Também já foram encontradas bactérias deste gênero produzindo sideróforos em rizosfera de plantas de tomate (MANIVANNAN E THOLKAPPIA, 2013). Assim como no presente estudo, onde os isolados do gênero de *Azospirillum* produziram sideróforos do tipo catecolato, em estudos realizados por Manivannan e Tholkappia (2013) também foi observado por espécies deste gênero isoladas de tomateiro.

A capacidade de produção de sideróforos também já foi observada em outros gêneros, tais com *Burkholderia* (LEWENZA *et al.*, 1999; LUVISOTTO, 2008); *G. diazotrophicus* (LOGESHWARAN *et al.*, 2009); *Bacillus sp.* (CHAIHARN *et al.*, 2009) e *Pseudomonas sp* (CARRILLO-CASTANEDA *et al.*, 2002); Chaiharn *et al.*, 2009; Saranraj *et al.* 2013; KAMRAN *et al.*, 2017); *Rhizobium* (CARRILLO-CASTANEDA *et al.*, 2002); *Kosakonia oryzae* (KAMRAN *et al.*, 2017).

Numa análise geral, podemos inferir que os resultados do presente trabalho mostram que há diferenças entre os isolados quanto à capacidade de produzir sideróforos, o que deve ser levado em consideração na seleção de estirpes para os testes de promoção de crescimento de plantas.

### 3.3.3. Determinação da atividade celulolítica

A capacidade celulolítica das estirpes bacterianas isoladas de genótipos de *Brachiaria* spp. foi demonstrada por meio do halo claro ao redor das colônias correspondente a zona de hidrólise da celulose, demonstrando que o microrganismo produz enzimas celulolíticas. Estes halos podem ser classificados como representando baixa, média e alta atividade de acordo com Dantur e colaboradores (2015) (FIGURA 14).



**Figura 14.** Determinação da atividade celulolítica das estirpes obtidas de genótipos de *Brachiaria*. As bactérias foram inoculadas em placas de meio CMC, contendo 0,2% de carboximetilcelulose (A) isolado sem capacidade de degradação; (B) isolado com capacidade baixa de degradação; (C) isolado com capacidade média; e (D) isolado com capacidade alta de degradação de celulose *in vitro*

Das 222 estirpes testadas, setenta e duas (32,43%) apresentaram capacidade celulolítica, incluindo representantes dos gêneros *Azospirillum* (41), *Nitrospirillum* (10), *Bacillus* (6), *Pseudomonas* (5), *Rizhobium* (3), *Stenotrophomonas* (3), *Paraburkholderia* (2), *Ochrobactrum* (1) e *Bosea* (1) (TABELA 6).

A estirpe NRB011 (*Azospirillum formosense*) apresentou a maior capacidade de atividade celulolítica com um índice celulolítico (I.C.) igual a 6,8, conforme observado pelo seu maior halo (Figura 9), seguida das estirpes NRB033 (*Azospirillum lipoferum*) e NRB214 (*Azospirillum formosense*), que apresentaram um I.C. de 4,92 e 4,62, respectivamente. No entanto, somente a estirpe NRB011 apresentou um I.C. maior que o controle positivo *G. diazotrophicus* PAL5 (5,397) (TABELA 6). As estirpes que apresentaram os menores índices de degradação de celulose foram a NRB027 (1,04), NR032 (1,06) e NRB008 (1,06), sendo a primeira pertencente ao gênero *Azospirillum* e as demais do gênero *Stenotrophomonas*.

De acordo com a classificação de atividade celulolítica descrita por Dantur *et al.*, (2015), foi observado que das 41 estirpes do gênero *Azospirillum*, uma possui alta atividade (I.C. > 6,1), 15 apresentaram atividade mediana (I.C. 2,1-6,0) e 25 tiveram baixa capacidade celulolítica (I.C. < 2,0), sendo que, somente neste gênero foi identificada uma estirpe com alta capacidade de degradar celulose (TABELA 6). O gênero *Nitrospirillum*

apresentou 7 estirpes com média capacidade celulolítica e 3 com baixa, sendo observado uma variação do I.C. de 1,21 (NRB041) à 3,88 (NRB061).

**Tabela 0-6.** Avaliação *in vitro* da capacidade celulolítica de bactérias diazotróficas obtidas de genótipos de *Brachiaria*.

Isolado	I.C. <sup>(1)</sup>	Isolado	I.C. <sup>(1)</sup>	Isolado	I.C. <sup>(1)</sup>
NRB001	1,09	NRB038	1,31	NRB114	3,6
NRB002	1,15	NRB041	1,21	NRB122	1,27
NRB003	4,03	NRB042	3,42	NRB124	3,3
NRB004	1,25	NRB046	3,44	NRB130	3,16
NRB005	1,24	NRB047	3,32	NRB133	1,4
NRB008	1,06	NRB049	3,81	NRB156	1,69
NRB009	4,83	NRB061	3,88	NRB167	2,99
NRB010	1,46	NRB068	2,1	NRB178	2,58
NRB011	6,8	NRB071	1,62	NRB185	1,82
NRB015	4,52	NRB076	1,55	NRB189	2,46
NRB017	1,57	NRB077	1,4	NRB194	1,87
NRB018	1,62	NRB080	1,29	NRB196	1,41
NRB019	1,14	NRB085	3,87	NRB199	1,86
NRB021	1,77	NRB088	3,16	NRB200	3,49
NRB022	1,13	NRB089	1,72	NRB202	3,3
NRB024	1,85	NRB090	1,16	NRB208	1,87
NRB025	2,75	NRB091	1,25	NRB209	2,22
NRB027	1,04	NRB092	1,21	NRB212	4,14
NRB028	1,08	NRB094	1,37	NRB213	1,64
NRB030	1,75	NRB096	4,31	NRB214	4,62
NRB032	1,06	NRB098	1,61	NRB224	1,35
NRB033	4,92	NRB099	1,33	NRB227	3,09
NRB035	1,07	NRB103	3,82	PAL 5 <sup>(2)</sup>	5,4
NRB036	3,82	NRB108	3,73		
NRB037	2,58	NRB109	3,44		

<sup>(1)</sup>Índice celulolítico (I.C.) – calculado pela relação do diâmetro do halo dividido pelo diâmetro da colônia.

<sup>(2)</sup>*Gluconacetobacter diazotrophicus*, utilizada como controle positivo no teste de atividade celulolítica *in vitro*, quando o meio de cultivo utilizado for o LGI.

Corroborando com o presente estudo, Mehdipour-Moghaddam *et al.* (2010) ao avaliarem a capacidade celulolítica em isolados de *Azospirillum* de cultivares de arroz e trigo, observaram uma atividade máxima de 1,32 u/ml após 5 dias de crescimento em meio contendo CMC e de 1,88 u/ml quando cultivado em meio contendo celulose. Wisniewski-Dye *et al.* (2011) ao avaliarem a atividade enzimática de celulase das espécies *A. brasilense* Sp245, *Azospirillum lipoferum* 4B e *Azospirillum* sp. B510, observaram que somente a primeira apresentou esta capacidade. Mostajeran *et al.* (2007) observaram que a inoculação de *Azospirillum brasilense* intensificou a atividade de celulase nas raízes de cultivares de trigo em relação ao controle, concluindo assim, a presença da capacidade celulolítica desta espécie. Apesar de ter sido observado a

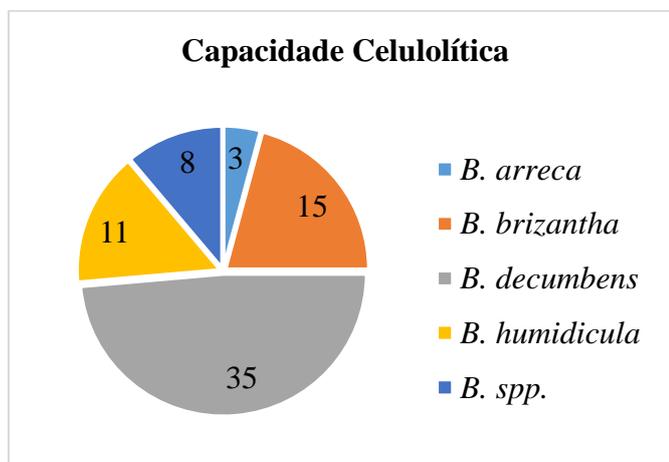
capacidade de degradar celulose em estirpes de *N. amazonense*, não há relato na literatura sobre esta capacidade no gênero *Nitrospirillum*. No estudo realizado por Elbeltagy *et al.* (2000) em isolados de arroz, não foi observado a atividade celulase na estirpe de *N. amazonense*.

A capacidade em degradar celulose pelas estirpes de *Bacillus* variou de 1,08 a 4,31, sendo o menor valor na estirpe NRB028 e o maior na NRB096. Já nos gêneros *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* a variação observada foi de 1,37 à 4,52 e 1,06 à 2,1, respectivamente (TABELA 6). Nestes três gêneros foi observado estirpes tanto com baixa e média capacidade celulolítica de acordo com a classificação de Dantur e colaboradores (2015). As duas estirpes de *Paraburkholderia* com atividade celulolítica, NRB124 e NRB189, apresentaram um médio I.C. enquanto que a estirpe *Ochrobactrum anthropi* NRB196 apresentou um baixo I.C. (TABELA 6).

Segundo Cho *et al.* (2007) e Reetha *et al.* (2014) bactérias endofíticas dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, possuem atividade celulolítica além de outras atividades enzimáticas, sendo este um indicativo de que bactérias endofíticas são capazes de colonizar tecidos internos de plantas devido suas atividades enzimáticas. Prakamhang *et al.* (2009) e Verma *et al.* (2001) em seus estudos com bactérias diazotróficas endofíticas em milho e em arroz, respectivamente, também observaram a capacidade celulolítica de algumas estirpes de *Pseudomonas*.

Diversas espécies de *Bacillus* são conhecidas por apresentarem atividade celulase, como por exemplo o *B. cereus* (THAYER E DAVID, 1978), *B. subtilis* (ROBSON E CHAMBLISS, 1984), e *Bacillus sp.* KSM-330 (OZAKI E ITO, 1991). Ladeira *et al.* (2015) observaram que um isolado de *Bacillus sp.* produziu celulase em meio líquido na presença de bagaço de cana-de-açúcar e em líquido proveniente da maceração de milho. Acharya e Chaudhary (2012) também mostrou a atividade celulolítica neste gênero após a incubação por 60 h na presença de trigo e palha de arroz. Correlacionando com o relato anterior, Acharya *et al.* (2012) observaram que o isolado de *B. subtilis* apresentou a maior capacidade celulolítica dentre os isolados avaliados após 8 dias.

Das 72 estirpes bacterianas com capacidade de degradar celulose, 35 estirpes foram isoladas de *B. decumbens*, sendo que 2,86% apresentaram uma alta capacidade celulolítica, 28,57% média e 68,57% baixa. A *B. brizantha* apresentou o segundo maior número de representantes com esta capacidade, seguida da *B. humidicula*. Somente a *B. ruzizienses* não teve representante com esta capacidade funcional (FIGURA 15).



**Figura 15.** Quantidade de representantes bacterianos isolados de espécies de *Brachiaria* com capacidade de degradação de celulose



Todas as estirpes que apresentaram a capacidade de produção de indol foram isoladas de meio NFb e foram observados representantes de diversos gêneros, tais como *Azospirillum* (19), *Rizobium* (8), *Bacillus* (5), *Stenotrophomonas* (6), *Pseudomonas* (2) e *Ochrobactrum* (1).

As estirpes de *Rhizobium pusense* apresentaram uma variação de produção de indol de 47,49 a 470,53  $\mu\text{g AIA mg}^{-1}$  de proteína, sendo que a estirpe NRB023 apresentou o maior valor de produção AIA-equivalente para esta espécie (TABELA 7). Todas as estirpes desta espécie com a capacidade de produção de AIA-equivalente foram isoladas de *B. decumbens*, no entanto, a NRB023 foi isolada de raiz desinfestada do genótipo D24/27, enquanto que a NRB017 foi isolada de solo do genótipo D24/45. As demais foram isoladas de raiz desinfestada e não desinfestada do genótipo X009.

**Tabela 0-7.** Avaliação *in vitro* da capacidade de produção de indoles de bactérias diazotróficas obtidas de genótipos de *Brachiaria*.

Isolado	Genótipo de origem	Amostra	$\mu\text{g de AIA mg}^{-1}$ de proteína
Sp245	*		376,05
NRB006	<i>B. decumbens</i> cv X009	RND	261,58
NRB009	<i>B. decumbens</i> cv X009	RND	195,94
NRB010	<i>B. decumbens</i> cv X009	RND	47,49
NRB012	<i>B. decumbens</i> cv X009	RD	202,38
NRB013	<i>B. decumbens</i> cv D24/27	RND	159,23
NRB017	<i>B. decumbens</i> cv D24/45	SR	154,97
NRB022	<i>B. decumbens</i> cv D24/27	RND	162,66
NRB023	<i>B. decumbens</i> cv D24/27	RD	470,53
NRB025	<i>B. arrecta</i> cv A2	SR	39,36
NRB027	<i>B. humidicula</i> cv comum	RND	69,39
NRB028	<i>B. decumbens</i> cv B001	SR	476,61
NRB029	<i>B. decumbens</i> cv D24/27	SR	378,08
NRB030	<i>B. decumbens</i> cv X009	SR	311,17
NRB032	<i>B. decumbens</i> cv D24/45	RD	61,01
NRB033	<i>B. humidicula</i> cv H31	RND	214,65
NRB036	<i>B. arrecta</i> cv A2	RD	18,64
NRB037	<i>B. spp.</i> cv Ipyporã	RD	364,03
NRB066	<i>B. decumbens</i> cv X009	RD	277,00
NRB067	<i>B. decumbens</i> cv X009	RND	53,68
NRB068	<i>B. decumbens</i> cv D24/27	RND	33,56
NRB069	<i>B. humidicula</i> cv H31	RD	113,28
NRB074	<i>B. brizantha</i> cv Piatã	RND	247,59
NRB075	<i>B. decumbens</i> cv 79-10	RND	53,42
NRB078	<i>B. decumbens</i> cv D24/45	RD	75,68
NRB081	<i>B. brizantha</i> cv Xaraés	RND	74,21
NRB085	<i>B. humidicula</i> cv comum	RND	176,85
NRB086	<i>B. spp.</i> cv Ipyporã	SR	139,78
NRB087	<i>B. spp.</i> cv Mulato II	RD	127,18

NRB088	<i>B. spp.</i> cv Ipyporã	RND	14,31
NRB089	<i>B. humidicula</i> cv H47	RND	170,71
NRB094	<i>B. brizantha</i> cv B140	RD	116,08
NRB097	<i>B. ruzizienses</i> cv R134	RD	349,83
NRB103	<i>B. brizantha</i> cv Paiaguás	RND	50,21
NRB108	<i>B. spp</i> cv Mulato II	SR	123,05
NRB109	<i>B. humidicula</i> cv comum	RND	163,64
NRB194	<i>B. brizantha</i> cv Marandu	SR	137,91
NRB196	<i>B. decumbens</i> cv D24/2	RND	13,96
NRB197	<i>B. brizantha</i> cv Marandu	RND	196,78
NRB201	<i>B. decumbens</i> cv D24/2	RD	97,93
NRB207	<i>B. decumbens</i> cv Basilisk	SR	89,99
NRB216	<i>B. decumbens</i> cv 79-10	RND	46,18

Legenda: RND: Raiz não desinfestada superficialmente, RD: Raiz desinfestada superficialmente e SR: Solo rizosférico

\*Espécies pertencentes à Coleção de Culturas da EMBRAPA – Agrobiologia, Seropédica, RJ.

As estirpes do gênero *Bacillus* apresentaram produção diferenciada de AIA-equivalente que variaram de 123,05 a 476,61  $\mu\text{g AIA mg}^{-1}$  de proteína (TABELA 7), sendo que a estirpe NRB028 (*B. aerius*) apresentou o maior valor e a NRB108 (*B. aryabhatai*) o menor valor na produção ácido-indol-3-acético. Também foi possível observar uma produção diferenciada nas estirpes do gênero *Azospirillum* (14,31 a 364,03  $\mu\text{g AIA mg}^{-1}$  de proteína), tendo a estirpe NRB037 da espécie *A. oryzae* apresentado a maior produção e a espécie *A. lipoferum* estirpe NRB088 a menor produção (Tabela 7). Tais resultados corroboram com o estudo realizado por Bergamaschi *et al.* (2007), que observou que os isolados de *Azospirillum sp.* oriundos de cultivares de sorgo forrageiro apresentaram uma variação na produção de AIA de 1,64 a 10,7  $\mu\text{g AIA mg}^{-1}$  de proteína. Tal fato, também foi observado nos trabalhos realizados por Roesch *et al.* (2007) e Santos *et al.* (2015), onde isolados de *Azospirillum* oriundos de plantas de milho apresentaram uma variação de 3,51 a 246,49 e 1,234 a 15,649  $\mu\text{g AIA mg}^{-1}$  de proteína respectivamente. Pedraza *et al.* (2004) em sua pesquisa com diferentes bactérias diazotróficas (*Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *G. azotocaptans*, *G. johannae* e *Pseudomonas stutzeri*), observaram que todas as estirpes bacterianas produziram AIA, mas as estirpes de *Azospirillum* apresentaram maiores valores, sendo, *A. brasilense* UAP14 com o nível mais alto (27,36  $\mu\text{g AIA mg de proteína}^{-1}$ ). No entanto, os valores de produção de ácido-indol-3-acético em bactérias diazotróficas descritos por esses autores são inferiores aos encontrados no presente estudo.

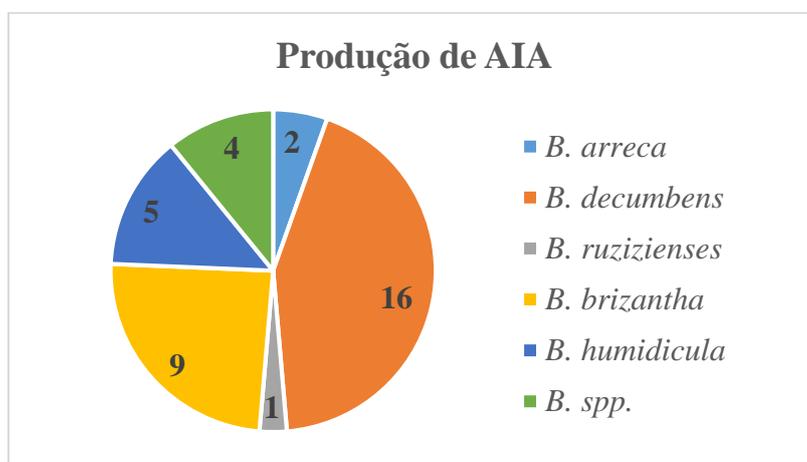
O *B. aerius* estirpe NRB028 foi o que produziu a maior quantidade de AIA, 476,61  $\mu\text{g AIA mg}^{-1}$  de proteína, sendo esta estirpe isolada do solo rizosférico de *B. decumbens* cv B001 em meio NFb semi-sólido. Em seguida, aparecem a *Rhizobium pusense* estirpe NRB023 (470,53  $\mu\text{g AIA mg}^{-1}$  de proteína) e *B. aerius* estirpe NRB029 (378,08  $\mu\text{g AIA mg}^{-1}$  de proteína), sendo o primeiro isolado de raiz desinfestada e o segundo do solo rizosférico de *B. decumbens* cv. D24/27. A menor produção de AIA foi observada na espécie *Ochrobactrum anthropi* estirpe NRB196 (TABELA 7), obtida do solo rizoférico de *B. decumbens* cv D24/2. Verma et al (2001) ao avaliarem a produção de AIA em *Ochrobactrum anthropi*, também observaram uma baixa produção de AIA (0,193  $\mu\text{g AIA mg}^{-1}$  de proteína), corroborando assim com o presente estudo. Nos

trabalhos realizados por Cerigioli (2005), Meng *et al.* (2014) e Xu *et al.* (2015), foram observados uma produção de AIA de 18,59  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; 55,49  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; e 13,25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , respectivamente, para esta espécie bacteriana.

Também foi observado a produção de AIA em estirpes de *Pseudomonas* (NRB075 e NRB094) e *Stenotrophomonas* (NRB013, NRB032, NRB066, NRB068, NRB078 e NRB081). Estas estirpes foram isoladas de raízes desinfestadas ou não de *Brachiaria decumbens*, com exceção das estirpes NRB030 e NRB081 que foram isoladas de *B. brizantha*. As estirpes NRB094 e NRB066, isoladas de raízes desinfestadas, apresentaram a maior produção de AIA nos gêneros *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*, respectivamente (Tabela 7). Foi observado uma produção de 53,42 e 116,08  $\mu\text{g AIA } \mu\text{g}^{-1}$  de proteína nas estirpes de *Pseudomonas* enquanto que nas estirpes de *Stenotrophomonas* foi observado uma variação de 35,56 a 277,0  $\mu\text{g AIA } \mu\text{g}^{-1}$  de proteína (Tabela 7). Apesar de haver relatos na literatura da capacidade de produção de ácido-indol-3-acético em estirpes de *Pseudomonas* (PEDRAZA *et al.*, 2004; VIDEIRA *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2014; e PASSARI *et al.*, 2016) e de *Stenotrophomonas* (SUCKSTORFF E BERG, 2003; AMBAWADE E PATHADE, 2013), as estirpes do presente trabalho apresentaram uma produção superior deste fitohormônio em relação aos já descritos.

Apesar de nenhuma estirpe de *N. amazonense*, deste estudo, ter apresentado a capacidade de produção AIA, Reis Junior *et al.* (2004) mencionam que, em testes realizados com *N. amazonense* associadas a *Brachiaria* spp., a quantidade de AIA produzida variou de 35 a 110  $\mu\text{M}$ . Rodrigues *et al.* (2008) também descrevem, em pesquisa realizada com estirpes de *N. amazonense* isoladas de plantas de arroz, uma variabilidade entre estirpes de 0,06 a 2,02  $\mu\text{M mg}$  de proteína<sup>-1</sup> na produção de AIA. Tal fato pode ser devido a quantidade de triptofano utilizada, podendo assim, ser necessário maiores doses deste para que bactérias da espécie *Nitrospirillum* sejam capazes de produzir ácido-indol-3-acético. A literatura relata que a produção de AIA, via dependente de triptofano, está diretamente relacionada a disponibilidade do triptofano como precursor (MALHOTRA E SRIVASTAVA, 2006; 2008; ONA, 2003).

De todas as espécies de *Brachiaria* avaliadas neste estudo foi possível identificar pelo menos um representante bacteriano com a capacidade de produção de ácido indolilacético (FIGURA 17). As espécies *B. decumbens* e *B. brizantha* apresentaram a ocorrência de estirpes com esta capacidade, 16 e 9 bactérias, respectivamente, em contraste a espécie *B. arrecta* que teve somente um representante.



**Figura 17.** Quantidade de representantes bacterianos isolados espécies de *Brachiria* com capacidade de produção de AIA

Tem-se verificado que o AIA produzido pelas bactérias que colonizam a rizosfera é responsável pela estimulação do crescimento e proliferação das raízes secundárias, ou pela patogênese em diversas plantas. Muitos grupos microbianos, incluindo aqueles de vida livre ou que vivem em associação com o tecido das plantas podem produzir AIA. Glick (2012), em revisão, relata que alguns organismos pertencentes aos gêneros *Gluconacetobacter*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* podem promover o crescimento vegetal aumentando o comprimento das raízes e o número de pêlos radiculares.

Shigenaga e Argueso (2016), em revisão, relataram que as auxinas podem atuar na sinalização do processo de defesa da planta, assim como é já conhecido para o ácido jasmônico e ácido salicílico. Assim sendo, a utilização de bactérias diazotróficas que apresentem a capacidade de sínteses de AIA na formulação de inoculantes, podem ter papel importante no controle de doenças (KAZAN E MANNERS 2009; TIAN *et al.*, 2017), além de estimular a germinação das sementes e promover o crescimento das raízes secundárias.

O resultado sumarizado das características funcionais das estirpes estudadas tais como capacidade de solubilização de fosfato inorgânico e óxido de zinco, produção de sideróforos, atividade celulolítica, capacidade de produção de indoles, e presença do gene *nifH* está apresentado na tabela 8. Com base na avaliação das características funcionais das estirpes bacterianas estudadas pode-se observar que 39% foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico, 9% solubilizam óxido de zinco, 84% produzem sideróforos, 32% possuem atividade celulolítica, 18% são capazes de produzir indoles e 85% apresentaram o fragmento do gene *nifH* do tamanho esperado. Apenas as estirpes NRB085 (*A. lipoferum*) e NRB088 (*A. lipoferum*) possuem todas as características funcionais avaliadas. Por outro lado, 12 estirpes (NRB009, NRB025, NRB027, NRB032, NRB074, NRB078, NRB081, NRB086, NRB103, NRB109, NRB208 e NRB214) apresentam cinco das seis características funcionais avaliadas enquanto que 95 estirpes bacterianas possuem pelo menos três características funcionais. Os demais isolados apresentam duas características funcionais, exceto os isolados NRB007, NRB013, NRB014, NRB036B, NRB050, NRB052, NRB055, NRB058, NRB059, NRB072, NRB131, NRB138, NRB143, NRB152, NRB168, NRB176 e NRB225 que apresentaram somente uma capacidade funcional. Em contraste as estirpes NRB093, NRB218 e NRB219 não apresentaram nenhuma das capacidades funcionais avaliadas.

**Tabela 0-8.** Capacidades funcionais das estirpes isoladas dos vinte genótipos de *Brachiaria* do Banco de Germoplasma da Embrapa Gado de Corte.

Estitpe	Sideróforos	Fosfato	Zinco	Celulase	Indols	<i>nifH</i>	Estitpe	Sideróforos	Fosfato	Zinco	Celulase	Indols	<i>nifH</i>
NRB001	+	-	-	+	-	+	NRB113	+	-	-	-	-	+
NRB002	+	-	-	+	-	+	NRB114	+	-	-	+	-	-
NRB003	+	-	-	+	-	+	NRB115	+	+	-	-	-	+
NRB004	+	+	-	+	-	+	NRB116	+	-	-	-	-	+
NRB005	+	-	-	+	-	+	NRB119	+	-	-	-	-	+
NRB006	+	+	-	-	+	-	NRB120	+	-	-	-	-	+
NRB007	+	-	-	-	-	-	NRB121	+	-	-	-	-	+
NRB008	+	+	-	+	-	+	NRB122	+	-	-	+	-	+
NRB009	+	+	-	+	+	+	NRB123	+	-	-	-	-	+
NRB010	+	+	-	+	+	-	NRB124	+	+	-	+	-	+
NRB011	+	-	+	+	-	+	NRB125	+	-	-	-	-	+
NRB012	+	-	-	-	+	+	NRB126	+	-	-	-	-	+
NRB013	-	-	-	-	+	-	NRB127	+	-	-	-	-	+
NRB014	-	-	-	-	-	+	NRB128	+	-	-	-	-	+
NRB015	+	-	-	+	-	+	NRB129	+	-	-	-	-	+
NRB016	+	-	-	-	-	+	NRB130	+	-	-	+	-	+
NRB017	+	-	-	+	+	-	NRB131	-	-	-	-	-	+
NRB018	+	+	-	+	-	+	NRB132	+	-	-	-	-	+
NRB019	+	+	-	+	-	+	NRB133	+	-	-	+	-	-
NRB020	+	+	-	-	-	+	NRB134	+	-	-	-	-	+
NRB021	+	-	-	+	-	-	NRB135	+	-	-	-	-	+
NRB022	-	-	-	+	+	+	NRB137	-	+	-	-	-	+
NRB023	+	-	-	-	+	+	NRB138	-	-	-	-	-	+

NRB024	+	+	-	+	-	+	NRB139	+	+	+	-	-	+
NRB025	+	+	-	+	+	+	NRB140	+	-	-	-	-	+
NRB026	-	-	+	-	-	+	NRB141	+	-	-	-	-	+
NRB027	+	+	-	+	+	+	NRB142	+	+	-	-	-	+
NRB028	+	+	-	+	+	-	NRB143	-	-	-	-	-	+
NRB029	+	-	-	-	+	-	NRB144 A	+	+	-	-	-	+
NRB030	+	+	-	+	+	-	NRB144 B	-	+	-	-	-	+
NRB031	+	+	-	-	-	+	NRB145	+	+	-	-	-	+
NRB032	+	+	-	+	+	+	NRB146	+	-	-	-	-	+
NRB033	+	-	-	+	+	+	NRB147	+	-	-	-	-	+
NRB034	+	-	-	-	-	+	NRB148	+	-	-	-	-	+
NRB035	+	+	-	+	-	+	NRB149	+	-	-	-	-	+
NRB036 A	+	-	-	+	+	+	NRB150	+	-	-	-	-	+
NRB036 B	-	-	-	-	-	+	NRB151	+	-	-	-	-	+
NRB037	+	-	-	+	+	+	NRB152	-	-	-	-	-	+
NRB038	+	+	-	+	-	+	NRB153	+	-	-	-	-	+
NRB039	+	-	-	-	-	+	NRB154	+	+	-	-	-	+
NRB040	+	-	-	-	-	+	NRB155	-	+	-	-	-	+
NRB041	+	-	-	+	-	+	NRB156	-	+	-	+	-	+
NRB042	+	-	-	+	-	+	NRB157	+	-	-	-	-	+
NRB043	+	+	+	-	-	+	NRB158	+	-	-	-	-	+
NRB044	+	-	-	-	-	+	NRB159	+	+	-	-	-	+
NRB045	+	-	+	-	-	+	NRB160	+	-	-	-	-	+
NRB046	+	-	-	+	-	+	NRB161	+	-	-	-	-	+
NRB047	+	-	-	+	-	+	NRB162	-	+	-	-	-	+
NRB048	+	-	-	-	-	+	NRB163	+	-	-	-	-	+

NRB049	+	-	-	+	-	+	NRB166	+	-	-	-	-	+
NRB050	+	-	-	-	-	-	NRB167	+	-	-	+	-	+
NRB051	+	-	-	-	-	+	NRB168	-	-	-	-	-	+
NRB052	+	-	-	-	-	-	NRB169	+	-	-	-	-	+
NRB053	+	-	-	-	-	+	NRB170	+	+	-	-	-	+
NRB054	+	-	-	-	-	+	NRB171	+	-	-	-	-	+
NRB055	+	-	-	-	-	-	NRB172	+	-	-	-	-	+
NRB058	-	+	-	-	-	-	NRB173	+	-	-	-	-	+
NRB059	-	+	-	-	-	-	NRB174	+	-	-	-	-	+
NRB060	+	-	+	-	-	-	NRB175	+	-	-	-	-	+
NRB061	+	-	-	+	-	+	NRB176	-	-	-	-	-	+
NRB062A	+	-	-	-	-	+	NRB177	+	+	-	-	-	+
NRB062B	+	-	-	-	-	+	NRB178	+	-	-	+	-	+
NRB063	+	-	-	-	-	+	NRB179	+	+	-	-	-	+
NRB064	+	+	+	-	-	+	NRB180	-	+	-	-	-	+
NRB065	+	-	-	-	-	+	NRB181	+	+	-	-	-	+
NRB066	+	-	-	-	+	-	NRB182	+	+	-	-	-	+
NRB067	+	-	-	-	+	-	NRB183	+	-	-	-	-	+
NRB068	-	-	-	+	+	-	NRB184	+	-	-	-	-	+
NRB069A	-	+	-	-	+	-	NRB185	+	-	-	+	-	+
NRB069B	+	+	-	-	-	-	NRB186	+	+	-	-	-	+
NRB070	+	-	-	-	-	+	NRB187	+	-	-	-	-	+
NRB071	+	-	-	+	-	+	NRB188	+	-	-	-	-	+
NRB072	+	-	-	-	-	-	NRB189	+	+	-	+	-	+
NRB073A	+	-	-	-	-	+	NRB190	+	-	-	-	-	+
NRB073B	+	-	-	-	-	+	NRB192	+	+	-	-	-	+

NRB074	+	+	+	-	+	+	NRB193	-	+	-	-	-	+
NRB075	+	+	+	-	+	-	NRB194	+	-	-	+	+	+
NRB076	+	+	+	+	-	-	NRB195	+	+	-	-	-	+
NRB077	+	-	-	+	-	+	NRB196	+	-	-	+	+	+
NRB078	+	+	+	-	+	+	NRB197	+	-	-	-	+	+
NRB079	+	-	-	-	-	+	NRB198	+	+	-	-	-	+
NRB080	+	+	-	+	-	+	NRB199	+	+	-	+	-	+
NRB081	+	+	+	-	+	+	NRB200	-	-	-	+	-	+
NRB082	+	+	+	-	-	+	NRB201	+	-	-	-	+	+
NRB084	+	+	+	-	-	+	NRB202	-	-	-	+	-	+
NRB085	+	+	+	+	+	+	NRB203	+	+	-	-	-	+
NRB086	+	+	+	-	+	+	NRB204	+	-	-	-	-	+
NRB087	+	+	-	-	+	+	NRB205	+	-	-	-	-	+
NRB088	+	+	+	+	+	+	NRB206	+	-	-	-	-	+
NRB089	+	-	-	+	+	+	NRB207	-	-	-	-	+	+
NRB090	+	+	-	+	-	+	NRB208	+	+	+	+	-	+
NRB091	+	+	-	+	-	+	NRB209	+	-	-	+	-	+
NRB092	-	+	-	+	-	+	NRB210	+	+	+	-	-	+
NRB093	-	-	-	-	-	-	NRB211	+	-	-	-	-	+
NRB094	+	-	-	+	+	+	NRB212	+	-	-	+	-	+
NRB095	+	+	-	-	-	-	NRB213	-	+	-	+	-	+
NRB096	+	-	+	+	-	+	NRB214	+	+	+	+	-	+
NRB097	+	+	-	-	+	+	NRB215	+	-	-	-	-	+
NRB098	+	+	-	+	-	+	NRB216	-	-	-	-	+	+
NRB099	-	+	-	+	-	+	NRB217	+	+	-	-	-	+
NRB100	-	+	-	-	-	+	NRB218	-	-	-	-	-	-

NRB101	+	-	-	-	-	+	NRB219	-	-	-	-	-	-
NRB102	+	+	-	-	-	-	NRB220	+	+	-	-	-	-
NRB103	+	+	-	+	+	+	NRB221	+	-	-	-	-	+
NRB104	+	+	-	-	-	+	NRB222	+	-	-	-	-	+
NRB105	+	+	-	-	-	-	NRB224	+	+	-	+	-	+
NRB106	+	+	-	-	-	+	NRB225	-	-	-	-	-	+
NRB107	+	+	-	-	-	+	NRB226	-	+	-	-	-	+
NRB108	+	+	-	+	+	-	NRB227	-	-	-	+	-	+
NRB109	+	+	-	+	+	+	NRB228	+	+	-	-	-	+
NRB111	+	-	-	-	-	+	NRB230	+	-	-	-	-	+

---

Símbolo: (+) positivo e (-) negativo para a característica funcional

#### 4. CONCLUSÃO

Com a utilização de meios de cultivos livres de N, foi possível isolar 222 estirpes bacterianas associativas e endofíticas de diferentes genótipos de *Brachiaria*.

A quantidade de bactérias diazotróficas presentes no solo da rizosfera e nas raízes das plantas diferiu conforme o genótipo vegetal, a amostra utilizada e o meio de cultura utilizado para isolamento.

O tamanho da população de bactérias diazotróficas viáveis, colonizando os 20 genótipos em estudo, variou de  $10^2$  a  $10^8$  bactérias por grama de amostra.

A comunidade diazotrófica apresentou uma grande diversidade de gêneros, predominantemente dos gêneros *Azospirillum*, *Nitrospirillum* e *Bacillus*.

O sequenciamento do gene 16S rRNA confirmou a presença do gênero *Nitrospirillum* e de diversas espécies pertencentes ao genero *Azospirillum*, além de revelar a presença de *Paraburkolderia silvatlantica*, *Paraburkolderia tropica*, *Phytobacter diazotrophicus*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*, e *Stenotrophomonas spp* nos genótipos de *Brachiaria*.

As análises filogenéticas evidenciaram uma diversidade intragênica entre as estirpes de *Azospirillum* assim como de *Nitrospirillum*.

Das 222 estirpes bacterianas isoladas, 39,2% apresentaram a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico e 9,5% de oxido de Zn, 32,4% apresentaram capacidade celulolítica, 84,2% produziram sideróforos, 18,5% produziram compostos indólicos em testes realizados em condições *in vitro* e a presença do gene *nifH* foi observada em 85,14% das estirpes.

As estirpes de *A. lipoferum* NRB085 e NRB088, oriundas da *B. humidicula* comum e *B. spp.* Ipyporã, respectivamente, apresentaram o maior número de atividades funcionais *in vitro*, sendo capaz de solubilizar fosfato de cálcio e óxido de zinco, produzir sideróforos, possuir capacidade celulolítica, capacidade de produzir índoles, e presença do gene *nifH*.

Trinta e duas estirpes apresentaram características funcionais contrastantes e desse modo foram selecionadas para testes de avaliação de efeito de promoção de crescimento de plantas em casa de vegetação.

## 5. REFERÊNCIAS

- ACHARYA, A. et al. Isolation and screening of thermophilic cellulolytic bacteria from compost piles. **Scientific World**, v. 10, p. 43–46, 2012.
- ACHARYA, S.; CHAUDHARY, A. Optimization of fermentation conditions for cellulases production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus sp.* MVS3 isolated from Indian Hot Spring. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 4, p. 497-503, 2012.
- ADEKAMBI, T.; DRANCOURT, M. (2004) Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2095-2105, 2004.
- ALLEN, A. C.; VALLS, J. F. M. **Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-grossense**. Departamento de Difusão de Tecnologia, 1987.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- AMBAWADE, M. S.; PATHAD, G. R. Production of Indole Acetic Acid (IAA) by *Stenotrophomonas maltophilia* BE25 isolated from roots of banana (*Musa spp.*). **International Journal of Science and Research**, v. 4, p. 2644-2650, 2013.
- AZEVEDO, M. S. et al. Influence of soil and host plant crop on the genetic diversity of *Azospirillum amazonense* isolates. **Pedobiologia**, v. 49, p. 565-576, 2005.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 549-579, 2005.
- BALDANI, J. I. et al. A fourth azospirillum species from cereal roots. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 56, p. 365, 1984.
- BALDANI, J. I. et al. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant Soil**. v.384, p.413–431, 2014.
- BALDANI, J I; et al. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J. O.; et al., **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS; Lavras: UFLA/DCS. p. 621- 650, 1999
- BANERJEE, M E YESMIN, L. **Sulfur-oxidizing plant growth promoting rhizobacteria for enhanced canola performance**. U.S. Patent n. 7,491,535, 17 fev. 2009.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian journal of microbiology**, v. 50, n. 8, p. 521-577, 2004.
- BEGUIN, P.; ANBERT, J.P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiol Rev**, v. 13, p. 25–58, 1993.
- BENEDUZI, A. et al. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing *Bacillus* isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 39, n. 3, p. 311-320, 2008.
- BERGAMASCHI L. et al. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. **Ciência Rural**. v. 37, n. 3, p. 727-33, 2007.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

- BRASIL, M. da S. et al. Efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas forrageiras do Pantanal. **Pasturas Tropicales**, v. 27, n. 3, p. 22-33, 2005.
- BRASIL, M. da S. et al. Influence of flood areas on the number of diazotrophic bacteria from pasture grasses. **Applied Ecology and Environmental Sciences**, v. 4, n. 4, p. 84-88, 2016.
- BURD, G.I.; DIXON, D. G.; GLICK, B. R. Plant growth promoting bacteria that decreases heavy metal toxicity in plants. **Canadian journal of microbiology**, v. 46, n. 3, p. 237-245, 2000.
- CARDOSO, I. C. M. et al. Ocorrência de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* em arroz irrigado no estado de Santa Catarina. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.9, n.2, p. 178-186, 2010.
- CARRILLO-CASTANEDA, G. et al. Plant growth-promoting bacteria promote copper and iron translocation from root to shoot in alfalfa seedlings. **Journal of plant nutrition**, v. 26, n. 9, p. 1801-1814, 2002.
- CATTELAN, A. J. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 1999.
- CERIGIOLI, M. M. **Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, 2005.
- CHAIHARN, M.; CHUNHALEUCHANON, S.; LUMYONG, S. Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. **World Journal Microbiol. Biotechnol**, v.25, n.11, p.1919-1928, 2009.
- CHAKRABORTY, B.; SAMADDAR, K. R. Evidence for the occurrence of an alternative nitrogenase system in *Azospirillum brasilense*. **FEMS microbiology letters**, v. 127, n. 1-2, p. 127-131, 1995.
- CHAKRABORTY, U. et al. Evaluation of *Ochrobactrum anthropi* TRS-2 and its talc based formulation for enhancement of growth of tea plants and management of brown root rot disease. **Journal of applied microbiology**, v. 107, n. 2, p. 625-634, 2009.
- CHALITA, P. B. et al. Avaliação da diversidade genotípica de bactérias diazotróficas isoladas de plantas de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola* no estado de Roraima. In: **Embrapa Roraima-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 34., 2013, Florianópolis. Ciência do solo: para quê e para quem: anais. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2013.
- CHRISTENSEN, H. et al. Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the Pasteurellaceae. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1601-1609, 2004.
- CHO, K. M. et al. Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. **Microbial Ecology**, v. 54, n. 2, p. 341-351, 2007.
- COSTA, F. E. C. **Biodiversidade de bactérias endofíticas e rizosféricas de figo-da-índia (*Opuntia ficus-indica* Mill.) e potencial de aplicações biotecnológicas**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2003.
- DAFFONCHIO, D. et al. PCR fingerprinting of whole genomes, the spacers between the 16S and 23S rRNA genes and of intergenic tRNA gene regions reveals a different intraspecific genomic variability of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 107-116, 1998.

- DANTUR, K. I. et al. Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of *Diatraea saccharalis* larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass. **Amb Express**, v. 5, n. 1, p. 15, 2015.
- DA SILVA, S. C.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; EUCLIDES, V. B. P. **Pastagens: conceitos básicos, produção e manejo**. Viçosa: Suprema, 2008.
- DIAS-FILHO, M. B. **Degradação de pastagens: processos, causas e estratégias de recuperação**. Embrapa Amazônia Oriental, 2011.
- DIMKPA, C. O. et al. Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. **Soil Biol. Biochem**, v.41, p.154–162, 2009.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1995.
- DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I. E.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Can J Microbiol**, v. 22, p. 1464–1473, 1976.
- DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. (1987) **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Science Tech Publishers, 1987.
- ELBELTAGY, A. et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. **Soil science and plant nutrition**, v. 46, n. 3, p. 617-629, 2000.
- ESTRADA, G. A. et al. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and soil**, v. 369, n.1-2, p.115-129, 2013.
- FARNELID, H. et al. Active nitrogen-fixing heterotrophic bacteria at and below the chemocline of the central Baltic Sea. **ISME J**, v. 7, p. 1413–1423, 2013.
- FASIM, F. et al. Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from the air environment of a tannery. **FEMS Microbiology Letters**. v.213, p.1–6, 2002.
- FERREIRA, E. P. B.; KNUPP, A. M.; MARTIN-DIDONET, C. C. G. Crescimento de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3, p. 655-665, 2014.
- FURUSHITA, M. et al. Similarity of tetracycline resistance genes applied isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. **Appl Environ Microb**, v.69, p.5336–5342, 2003.
- GABY, J. C.; BUCKLEY, D. H. A comprehensive aligned *nifH* gene database: a multipurpose tool for studies of nitrogen-fixing bacteria. **Database**, v.2014, p.1–8, 2014.
- GARRIDO, M. F. et al. Effect of the edaphoclimatic factors and pasture species on the diversity of diazotrophic bacteria. **Pastos y Forrajes**, v. 33, p. 1-11, 2010.
- GERMIDA, J. J.; SICILIANO, S. D. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, p. 410–415, 2001.
- GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications **Scientifica**, v.2012, p.1-15, 2012.
- GOMES, M. de L. **Bactérias Diazotróficas endofíticas em cultivares de milho em áreas de cerrado e mata no Estado de Roraima**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Roraima, 2009.
- GOTETI, P. K et al. Prospective zinc solubilising bacteria for enhanced nutrient uptake and growth promotion in maize (*Zea mays* L.) **International Journal of Microbiology, International journal of microbiology**, v. 2013, 2013.

- GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 395-412, 2005.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v. 67, p. 597-607, 1975.
- HOLMES, D. E.; NEVIN, K. P.; LOVLEY, D. R. Comparison of 16S rRNA, *nifD*, *recA*, *gyrB*, *rpoB* and *fusA* genes within the family Geobacteraceae fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1591-1599, 2004.
- JOERGER, R. D. et al. Nucleotide sequence and mutational analysis of the structural genes (*anfHDGK*) for the second alternative nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol**, v. 171, n. 2, p. 1075-86, 1989.
- JUMAS-BILAK, E. et al. Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the *Proteobacteria*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 10, p. 2749-2755, 1998.
- KAMRAN, S. et al. Contribution of zinc solubilizing bacteria in growth promotion and zinc content of wheat. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 2593, 2017.
- KASANA, R. C. et al. Rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. **Curr Microbiol**, v.57, p. 503-507, 2008.
- KAZAN, K.; MANNERS, J. M. Linking development to defense: auxin in plant pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 7, p. 373-382, 2009.
- KUMAR, V.; NARULA, N. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. **Biol. Fert. Soils**, v.28, n.3, p.301-305. 1999.
- KUSS, A. V. et al. 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.
- LADEIRA, S. A. et al. Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 110-115, 2015.
- LANGE, A.; MOREIRA, F. M. S. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de orchidaceae e de outras famílias vegetais. **R. Bras. Ci. Solo**, v.26, p.529-533, 2002.
- LEWENZA, S. et al. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. **J Bacteriol**, v. 181, n.3, p.748-756, 1999.
- LIBA, C. M. et al. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p.1076-1086, 2006.
- LIN, S. Y. et al. *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, T. F. et al. The protons of glucônico acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. **Bioresource Technology**, v.97, p.957-960, 2006.
- LIU, J.; PENG, M.; LI, Y. Phylogenetic diversity of nitrogen-fixing bacteria and the *nifH* gene from mangrove rhizosphere soil. **Can J Microbiol**, v.58, p.531-539, 2012.
- LOGESHWARAN, P.; THANGARAJU, M.; RAJASUNDARI, K. Hydroxamate siderophores of endophytic bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolated from sugarcane roots. **Aust. J. Basic Appl. Sci.** v. 3 p. 3564-3567, 2009.

- LÓPEZ-ORTEGA, M. P. et al. Characterization of diazotrophic phosphate solubilizing bacteria as growth promoters of maize plants. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 15, n. 2, p. 115-123, 2013
- LUVIZOTTO, D. M. **Caracterização fisiológica e molecular de Burkholderia spp. associadas as raízes de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
- MAGALHÃES, F. M. et al. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais-Academia Brasileira de Ciências**, v. 55, p. 417-430, 1983.
- MACEDO, M. C. M. Pastagens no ecossistema Cerrados: evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentável. **Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia**, v. 42, n. 2005, p. 56-84, 2005.
- MADHAIYAN, M. et al. Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. **Microbiological Research**, v.159, p. 233–243, 2004.
- MALHOTRA, M.; SRIVASTAVA, S. Targeted engineering of *Azospirillum brasilense* SM with indole acetamide pathway for indoleacetic acid over-expression. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 11, p. 1078-1084, 2006.
- MALHOTRA, M.; SRIVASTAVA, S. An ipdC gene knock-out of *Azospirillum brasilense* strain SM and its implications on indole-3-acetic acid biosynthesis and plant growth promotion. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 93, n. 4, p. 425-433, 2008.
- MANIVANNAN, M.; THOLKAPPIAN, P. Prevalence of *Azospirillum* isolates in tomato rhizosphere soils of coastal areas of Cuddalore district, Tamil Nadu. **International Journal of Recent Scientific Research**, v.4, n.10, p.1610-1613, 2013.
- MARTIN-DIDONET, C. C. G. et al. Genome structure of the genus *Azospirillum*. **Journal of Bacteriology**, v.182, p.4113–4116, 2000.
- McINROY, J. A.; KLOPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, v.173, p.337-342, 1995.
- MEHDIPOUR-MOGHADDAM, M. J. et al. Novel phytase and cellulase activities in endophytic *Azospirilla*. **World Applied Sciences Journal**, v.10, n.10, p.1129–1135, 2010.
- MEHNAZ S. et al. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.110–117, 2001.
- MENG, X. et al. Colonization by endophytic *Ochrobactrum anthropic* Mnl promotes growth of Jerusalem artichoke. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 601–610, 2014.
- MIETHKE, M.; MARAHIEL, M. A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 71, n. 3, p. 413-451, 2007.
- MILLER, S. H. et al. Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. **Environmental microbiology reports**, v. 2, n. 3, p. 403-411, 2010.
- MOCALI, S. et al. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, v.154, p.105–114, 2003.
- MOREIRA, F. M. S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae** v.1, n.2, p. 74-99, 2010.
- MOSTAJERAN, A.; AMOOAGHAIE, R.; EMTIAZI, G. The participation of the cell wall hydrolytic enzymes in the initial colonization of *Azospirillum brasilense* on wheat roots. **Plant Soil**, v. 291, p. 239-248, 2007.

- MURTY, M. G.; LADHA, J. K. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. **Plant Soil** v.108, p. 281–285, 1988.
- NASER, S. M. et al. Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 12, p. 2777-2789, 2007.
- NAUTIYAL, C. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.170, p.265-270, 1999.
- NEAL, J. L.; LARSON, R. I. Acetylene reduction by bacteria isolated from the rhizosphere of wheat. **Soil Biology and Biochemistry**, v.8, p.151-155, 1976.
- ONA, O. The effect of pH on indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp7. **Symbiosis**, v. 35, p. 199-208, 2003.
- OZAKI, K.; ITO, S. Purification and properties of an acid endo-1,4- $\beta$ -glucanase from *Bacillus* sp. KSM-330. **Journal of General Microbiology**, v. 137, n.1, p. 41–48, 1991.
- PALMER, J. D. Chloroplast DNA Evolution and Biosystematic Uses of Chloroplast DNA Variation. **The American Naturalist**, v. 130, p. S6-S29, 1987.
- PARK, M. et al. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. **Research in Microbiology**, v.160, p.127–133, 2005.
- PASSARI, A. K. et al. Phytohormone production endowed with antagonistic potential and plant growth promoting abilities of culturable endophytic bacteria isolated from *Clerodendrum colebrookianum* Walp. **Microbiological research**, v. 193, p. 57-73, 2016.
- PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p. 3795-3801, 2002.
- PEDRAZA, R. O. et al. Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. **Plant Soil**, v.295, p.169–178, 2007.
- PEDRAZA, R. O. et al. Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **World J Microbiol Biotechnol**, v.26, n.2, p.265–272, 2010.
- PEDRAZA, R. O. et al. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic production by associative nitrogenfixing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**. v.233, p.15-21, 2004.
- PENG, G. et al. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1263-1271, 2006.
- PERRINE, F. M. et al. *Rhizobium* plasmids are involved in the inhibition of simulation of rice growth and development. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.923-937, 2001.
- POLY, F.; MONROZIER, L. J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Res Microbiol**, v.152, p. 95–103, 2001.
- PRAKAMHANG, J. et al. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). **Appl Soil Ecol**, v.142, n.2, p.141–149, 2009.
- RADWAN, T. EL-S. EL-D; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.39, n.10, p.987-994, 2004.

- REETHA, S. et al. Screening of cellulase and pectinase by using *Pseudomonas fluorescence* and *Bacillus subtilis*. **International Letters of Natural Sciences**, v.8, n.2, p.75-80, 2014.
- REIS JUNIOR, F. B. **Ecologia e diversidade de bactérias do gênero *Azospirillum* em associação com pastagens de *Brachiaria spp.***, Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2002.
- REIS JUNIOR, F. B. et al. **Isolamento, caracterização e seleção de estirpes de *Azospirillum amazonense* e *Herbaspirillum seropedicae* associadas a diferentes variedades de milho cultivadas no Cerrado**. Embrapa Cerrados, 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. et al. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 985–994, 2000.
- REIS JUNIOR, F. B. et al. Identificação de isolados de *Nitrospirillum amazonense* associados a *Brachiaria spp.*, em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 28, n. 1, p.103-113, 2004.
- REIS JUNIOR, F. B.; TEIXEIRA, K. R. N.; REIS, F. R. Fixação biológica de nitrogênio associada a pastagens de braquiária e outras gramíneas forrageiras. **Embrapa Cerrados- Documentos (INFOTECA-E)**, 2002.
- REIS, V. M.; PEDRAZA, R. O.; TEIXEIRA, K. R. S. Diversidade e relação filogenética de espécies do gênero *Azospirillum*. **Embrapa Agrobiologia Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.
- REIS, V. M. et al. Biological nitrogen fixation associated with tropical pasture grasses. **Austral. J. Plant Physiol.**, v.28, p. 837-844, 2001.
- REIS, V. M. et al. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2155-2162, 2004.
- RODRIGUES, E. et al. *Nitrospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N<sub>2</sub> fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, v.302, p.249–261, 2008.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. Citri Tipo B. **Summa Phytopatologica**, v.12, p.16, 1986.
- RODRÍGUEZ-BLANCO, A.; SICARDI, M.; FRIONI, L. Plant genotype and nitrogen fertilization effects on abundance and diversity of diazotrophic bacteria associated with maize (*Zea mays* L.). **Biol. Fert. Soils**, v.51, p.391–402, 2015.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, p.319-339, 1999.RODRÍGUEZ, H. et al. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v.91, p.552-555, 2004.
- ROESCH, L. F. W. et al. Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 10, p. 1377-1383, 2007
- SALA, V. M. R. et al. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p. 345-352, 2005.

- SARATHAMBAL, C. et al. Characterization and crop production efficiency of diazotrophic isolates from the rhizosphere of semi-arid tropical grasses of India. **Applied Soil Ecology**, v.87, p.1-10, 2015.
- SANTOS, J. S. et al. Inoculation and isolation of plant growth-promoting bacteria in maize grown in Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.39, p.78-85, 2015.
- SANTOS, M. C. M. et al. Ocorrência e atividade de bactérias diazotróficas em forrageiras cultivadas na Região semiárida no Brasil. **Revista Caatinga**, v.26, p. 27–34, 2013.
- SARANRAJ, P.; SIVASAKTHIVELAN, P.; SIVA SAKTHI, S. Prevalence and production of plant growth promoting substance by *Pseudomonas fluorescens* isolated from paddy rhizosphere soil of Cuddalore district, Tamil Nadu. **African Journal of Basic and Applied Sciences**, v.5, n.2, p. 95-101, 2013.
- SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Chemosphere**, v.66, n.9, p.1794-1798, 2007a.
- SARWAR, M.; KREMER, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant Soil**, v.172, p.261–269, 1995.
- SAXENA, B.; MODI, M.; MODI, V. V. Isolation and characterization of siderophores from *Azospirillum lipoferum* D-2. **J. Gen. Microbiol.** v.132, p.2219–2224, 1986.
- SAYYED, R. Z.; CHINCHOLKAR, S. B. Siderophore producing *A. feacalis* more biocontrol potential vis-a'-vis chemical fungicide. **Curr Microbiol**, v.58, n.1, p.47–51, 2009.
- SHAH, S.; KARKHANIS, V.; DESAI, A. Isolation and characterization of siderophore, with antimicrobial activity, from *Azospirillum lipoferum* M. **Curr. Microbiol**, v.25, p.347–351, 1992.
- SHIN, W. et al. Role of Diazotrophic Bacteria in Biological Nitrogen Fixation and Plant Growth Improvement. **Korean Journal of Soil Science and Fertilizer**, v. 49, n. 1, p. 17-29, 2016.
- SILVA, E. da. **Isolamento e seleção de bactérias diazotróficas em cultivares de arroz recomendadas para o plantio no Estado do Rio de Janeiro**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2014.
- SILVA, K. et al. Density and diversity of diazotrophic bacteria isolated from Amazonian soils using N-free semi-solid media. **Scientia Agricola**, v.68, p.518-525, 2011.
- SILVA, M. C. P. et al. Plant growth promoting bacteria in *Brachiaria brizantha*. **World J Microbiol Biotechnol.**, v.29, p.163-171, 2013.
- SINHA, S.; MUKHERJEE, S. K. Cadmium-induced siderophore production by a high Cd-resistant bacterial strain relieved Cd toxicity in plants through root colonization. **Curr. Microbiol**, v.56, p.55–60, 2008.
- 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 Agrônomo, p. 97-115, 2007.
- SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v.160, p.47-56, 1987.
- SHIGENAGA, A. M.; ARGUESO, C. T. No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. **Seminars in Cell e Developmental Biology**, v 56, p. 174-189, 2016.

SOUCHIE, E. L.; ABBOUD, A. C. S.; CAPRONI, A. L. Solubilização de fosfato in vitro por microrganismos rizosféricos de guandu. **Bioscience Journal**, v.23, p.53-60, 2007.

SOUZA, M. S. et al. *Azospirillum spp.* from native forage grasses in Brazilian Pantanal floodplain: biodiversity and plant growth promotion potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.33, n.4, p. 1-13, 2017.

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.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, p.1-30, 2000.

SUCKSTORFF, I.; BERG, G. Evidence for dose-dependent effects on plant growth by *Stenotrophomonas* strains from different origins. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.656–66, 2003.

SYLVESTER-BRADLEY, R. et al. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 12, n. 1, p. 15-22, 1982.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Mol. Biol. Evol.** v.30, n.12, p.2725–2729, 2013.

TEIXEIRA, M. A. **Diversidade de bactérias endofíticas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) coletada de diferentes regiões do Brasil**, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2004.

THAYER, D. W.; DAVID, C. A. Growth of seeded cellulolytic enrichment cultures on mesquite wood. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 36, n.2, p. 291–296, 1978.

THOMPSON, F. L. et al. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. **Appl Environ Microbiol**, v.71, p.5107–5115, 2005.

TIAN, B. et al. Beneficial traits of bacterial endophytes belonging to the core communities of the tomato root microbiome. **Agriculture, Ecosystems E Environment**, v. 247, p. 149-156, 2017.

TIAN, F. et al. Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.40, p.276–284, 2009.

TORTORA, M.; DÍAZ-RICCI, J.; PEDRAZA, R. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Arch. Microbiol.**, vol.193, p.275-286, 2011.

VALLE, C. B. do. et al. **Gênero *Brachiaria***. In: FONSECA, D.M. da; MARTUSCELLO, J.A. (Ed.) Plantas forrageiras. Viçosa, MG: Ed. UFV, p.30-77, 2010.

VASCONCELOS, C. N. **Pastagens: implantação e manejo**. Salvador. EDBA, 177p, 2006.

VENIERAKI, A. et al. The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. **Microb. Ecol.**, v.61, p.277–285, 2011.

VIDEIRA, S. S. et al. Occurrence and diversity of nitrogen-fixing *Sphingomonas* bacteria associated with rice plants grown in Brazil. **FEMS Microbiol Lett**, v.293, p.11–19, 2009.

VIDEIRA, S. S. et al. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant Soil**. n.356, p.51-66, 2012.

VERMA, S. C.; LADHA, J.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **J.Biotechnol**, v. 91, p. 127-141, 2001.

- XIÃO, C. et al. Characterization of tricalciumphosphate solubilization by *Stenotrophomonas maltophilia* YC isolated from phosphate mines. **Journal Cent. South University Technology**, v.16, p.581-587, 2009.
- XIE, C. H.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, n.55, p.1435-1438, 2005.
- XIE, G.H.; SU, B.L.; CUI, Z.J. Isolation and identification of N<sub>2</sub>-fixing strains of *Bacillus* in rice rhizosphere of the Yangtze River valley. **Acta Microbiologica Sinica**, v.38, p.480–483., 1998
- XU, S. et al. Isolation and potential of *Ochrobactrum* sp. NW-3 to increase the growth of cucumber. **Int J Agric Policy Res.** v.3, n.9, p.341–350, 2015.
- ZHANG, G. X. et al. Diverse endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from wild rice *Oryza rufipogon* and description of *Phytobacter diazotrophicus* gen. nov. sp. nov. **Arch. Microbiol**, v.189, p.431-439, 2008.
- ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, B. N. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p.2198–2208, 2002.
- WANG, R. F.; CAO, W. W.; CERNIGLIA, C. E. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium prausnitzii* based upon the 16S rRNA gene sequence and PCR confirmation. **Int J Syst Bacteriol**, v.46, p.341–343, 1996.
- WAUGH, S. I. et al. The genes encoding the delta subunits of dinitrogenases 2 and 3 are required for Mo-independent diazotrophic growth by *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol**, v. 177, p. 1505–1510, 1995.
- WERTZ, J. E. et al. A molecular phylogeny of enteric bacteria and implications for a bacterial species concept. **J Evol Biol**, v.16, p.1236–1248, 2003.
- WISNIEWSKI-DYÉ, F. et al. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 12, p. e1002430, 2011.
- WISNIEWSKI-DYÉ, F. et al. Genome sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and comparative analyses of *Azospirillum* core and accessory genomes provide insight into Niche adaptation. **Genes**, v. 3, p. 576–602, 2012.

## **CAPÍTULO II**

### **RESPOSTA DE GENÓTIPOS DE *BRACHIARIA* À INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS COM ATIVIDADES FUNCIONAIS CONTRASTANTES**

## RESUMO

A utilização da tecnologia de inoculação com bactérias diazotróficas promotora de crescimento vegetal 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 do trabalho foi avaliar os efeitos da inoculação de 32 bactérias diazotróficas, selecionadas previamente de acordo com suas capacidades funcionais contrastantes, associadas a doze genótipos de *Brachiaria*. O experimento foi realizado em casa de vegetação, na Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso no modelo de parcelas subdivididas com 120 tratamentos, três repetições, totalizando 360 parcelas experimentais, e cada parcela com 7 plantas. Cada genótipo de *Brachiaria* foi avaliado em dez tratamentos, sendo: oito estirpes, um controle sem nitrogênio e um controle nitrogenado (100 kg de N.ha<sup>-1</sup>). Foram realizados três cortes da parte aérea das plantas, com intervalos de 60 dias após o plantio (DAP), 120 DAP e 180 DAP, respectivamente. Os resultados obtidos mostraram que os doze genótipos de *Brachiaria* responderam de forma diferenciada à inoculação das estirpes. A estirpe NRB085 proporcionou o maior acúmulo de N na planta nos genótipos Ipyporã e H47 em relação aos demais tratamentos inoculados. Por outro lado, as estirpes NRB214 e Sp245 promoveram o melhor desenvolvimento dos genótipos Mulato II e Basilisk, respectivamente. No geral, o tratamento nitrogenado apresentou os maiores acúmulos de massa seca e N na planta em todos os genótipos, com exceção do Tupi. Neste genótipo, a inoculação com as estirpes NRB046 e NRB096 apresentaram os maiores acúmulos de massa seca e N na planta, respectivamente. Dentre os tratamentos inoculados, os resultados obtidos mostraram que foram observadas diferenças estatísticas significativas a 0,1% em relação ao controle absoluto na produção de biomassa e no acúmulo de N da planta nos doze genótipos de *Brachiaria*. Foi observado uma aparente especificidade da bactéria vs planta para os genótipos Xaraés, Paiaguás, Marandu, Tupi e Humidícula comum. Um acúmulo de até 76,9% na massa seca da planta e de até 54,3% no teor de N da planta superior ao tratamento controle absoluto foi observado para algumas estirpes indicando assim potencial biotecnológico. Os resultados sugerem que a utilização dessas bactérias como inoculantes pode ser uma alternativa natural na redução do uso do fertilizante nitrogenado e conseqüentemente na diminuição dos custos de produção em pastagens.

**PALAVRAS-CHAVE:** Inoculação, pastagens, seleção de estirpes, biomassa, N total

## ABSTRACT

The use of plant growth promoting diazotrophic bacteria stands out as a sustainable alternative in reducing the application of N in pastures therefore presenting potential for reduction of degradation levels. The objective of this work was to evaluate the effects of 32 diazotrophic bacteria, previously selected according to their functional abilities, in association with twelve *Brachiaria* genotypes. The experiment was carried out under greenhouse conditions at Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. The experimental design was a randomized complete block design with 120 treatments, with three replications, totalizing 360 experimental plots, and each plot with 7 plants. Each *Brachiaria* genotype was composed of ten treatments: eight strains, one control without nitrogen and nitrogen (100 kg of N.ha<sup>-1</sup>). The shoots were harvested at intervals of 60 days (60 DAP, 120 DAP and 180 DAP). The results showed that the 12 *Brachiaria* genotypes differed in their response to strain inoculation of. The strain NRB085 provided the greatest accumulation of N in the plant in genotypes Ipyporã and H47 in relation to the other inoculated treatments. On the other hand, the strains NRB214 and Sp245 promoted the best development of the Mulato II and Basilisk genotypes, respectively. In general, nitrogen fertilizer treatment showed the highest accumulation of dry mass and N in the plant of all genotypes, except the Tupi. In this genotype, inoculation with strains NRB046 and NRB096 showed the highest accumulation of dry mass and N in the plant, respectively. Among the inoculated treatments, the results showed a statistically significant differences at 0.1% in relation to the absolute control in the biomass production and accumulation of N in the plant of the twelve genotypes of *Brachiaria*. An apparent specificity of bacterium vs plant was observed for the genotypes Xaraés, Paiaguás, Marandu, Tupi and Humidícula common. An accumulation of up to 76.9% in the plant dry mass and up to 54.3% in the N content of the plant superior to the absolute control treatment was observed for some strains indicating their biotechnological potential. The results suggest that the use of these bacteria as inoculants may be a natural alternative in reducing the use of nitrogen fertilizer and consequently the reducing costs of the pastures.

**KEY WORDS:** Inoculation, pasture, strain selection, biomass, total N

## 1 – INTRODUÇÃO

As forrageiras são de grande importância para a bovinocultura brasileira de corte e de leite (LIMA E DEMINICES, 2008) onde cerca de 260 milhões de ha são ocupados por pastagens nativas e cultivadas (ABIEC, 2018). As pastagens são ocupadas principalmente com 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). A maior evidência da importância das forrageiras é o fato de o Brasil possuir o maior rebanho bovino comercial com 220 milhões de cabeças (ABIEC, 2018; USDA, 2018, no entanto segundo o IBGE (2018) o tamanho do rebanho bovino brasileiro é de 170 milhões de cabeças. O Brasil é o maior produtor e exportador de carne (ABIEC, 2018) e o quinto maior produtor de leite (USDA, 2017).

A implementação do gênero *Brachiaria* como forragem representa um marco na pecuária nacional pela ocupação de grandes áreas do Cerrado na região central do Brasil onde as cultivares da gramínea *Panicum maximum* Jacq. apresentavam declínio na produtividade em função da baixa fertilidade natural do solo e manejo inadequado (FAGUNDES *et al.*, 2006). O uso de espécies e/ou cultivares foi proporcionada por suas características desejáveis e favoráveis como forragem, por isso, a supremacia do gênero *Brachiaria* nos sistemas de produção animal em pastagem ainda pode se estender por muito tempo, tendo-se em vista a extensão das áreas cultivadas e o fato do programa de seleção e melhoramento genético de forrageiras do Centro Nacional de Pesquisa Gado de Corte (CNPGC) contemplarem com constância este gênero.

Apesar de sua importância na economia do país, essa grande área coberta por pastagens encontra-se em algum estágio de degradação (DIAS-FILHO, 2011). Muitos são os fatores que desencadeiam a degradação das pastagens, tais como: superlotação; uso de sementes de baixa qualidade; preparo de solo e técnicas de semeadura impróprias; uso de espécie ou cultivar inadequada; ausência ou falta de práticas conservacionistas do solo; falta de correção e adubação na formação e, falta de reposição de nutrientes pela adubação de manutenção. No entanto, o fator preponderante na degradação das pastagens é a limitação de nitrogênio (OLIVEIRA *et al.*, 1997), pois tem sido demonstrado que a solução de apenas este problema pode elevar consideravelmente a produção destas áreas (BODDEY *et al.*, 2003).

As pastagens apresentam respostas positivas ao nitrogênio, no entanto o uso de fertilizantes nitrogenados onera muito o custo de produção, e com a crescente demanda por alimentos, se faz necessário o uso de alternativas sustentáveis, tal como a utilização de inoculação de sementes por bactérias diazotróficas (QUADROS *et al.*, 2014; HUNGRIA *et al.*, 2016), prática amplamente utilizada em leguminosas. Esta é uma alternativa promissora, uma vez que esses microrganismos fixadores de nitrogênio aumentam a disponibilidade de N para a planta, quebrando a ligação tripla do N<sub>2</sub> atmosférico e tornando-o disponível para as plantas. Esta prática pode fornecer até 50% do total de N acumulado para as plantas leguminosas em simbiose com rizóbios (PICCININ *et al.*, 2013).

Em experimentos de inoculação de gramíneas com *Azospirillum*, foi observado uma grande variabilidade nos resultados para as culturas como trigo, arroz, milho e sorgo, onde a média de incremento no rendimento das culturas foi em torno de 20-30% (Reis, 2007). De acordo com Bashan e Levanony (1990) aumentos em torno de 20%, atribuídos à inoculação com diazotróficos endofíticos, são considerados comercialmente significativos na agricultura.

Alves *et al.* (2000) mostraram o ingresso total de N em pastagem de *B. humidicola*, via o processo natural de FBN, de 84 e 56 kg N.ha<sup>-1</sup>, em taxas de lotação de 2 e 4 animais.ha<sup>-1</sup>, respectivamente. Já Silva e colaboradores (2010), ao avaliarem a FBN em pastagem com diferentes intensidades de corte na Zona da Mata de Pernambuco, constataram contribuição da FBN, por meio da população nativa, em torno de 10 a 42% em pastagens formadas de *B. humidicola*, *B. decumbens* e *Pennisetum purpureum*.

Apesar dos ganhos apresentados, observa-se que os estudos de FBN ainda são incipientes para as gramíneas do gênero *Brachiaria*, uma vez que ainda não se encontra disponível no mercado, estirpes aprovadas como inoculante para este gênero pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

No Brasil, está sendo usado um inoculante misto, composto por duas estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6). Inicialmente foi testado em milho e trigo (Hungria *et al.* 2010) e devido aos seus resultados promissores, foi lançado comercialmente com o nome inoculante AzoTotal em 2011. Mais recentemente, estudos com a inoculação destas estirpes em associação com doses de fertilizante nitrogenado em milho (CUNHA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2015), arroz (RODRIGUES *et al.*, 2015; GARCIA *et al.*, 2016), e *Brachiaria* (FERNANDES, 2016; HUNGRIA *et al.*, 2016) mostraram incrementos significativos na produtividade de milho e arroz, e um aumento na produção de forragem em *Brachiaria spp.* em relação ao tratamento controle.

Estudos visando selecionar estirpes com potencial em fixar nitrogênio, demonstram um importante aspecto sobre a necessidade desse processo ser constante, sendo necessário isolar um grande número de bactérias para que, através de processos de seleção específico, sejam obtidas estirpes com maior potencial de fixação de nitrogênio, gerando assim, maiores ganhos de produtividade na cultura de interesse (YATES *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2007).

Um dos motivos que contribuem para complexidade das respostas à inoculação é a interação do genótipo da planta e a estirpe inoculada (SALA *et al.*, 2007). Em muitos casos, a ausência de resposta à inoculação tem sido devido ao uso de estirpes inadequadas como já observado em plantas leguminosas (DOBEREINER E DUQUE, 1980), pois precisa haver compatibilidade entre as bactérias e a planta hospedeira.

Baldani e Dobereiner (1980) testaram a inoculação em trigo com diferentes estirpes isoladas de trigo, milho e arroz, e concluíram que estirpes isoladas da própria espécie vegetal (homólogas) foram mais eficientes do que as isoladas de plantas de outras espécies (heterólogas). Baldani *et al.* (1983), também observaram uma resposta positiva de plantas de trigo inoculadas com bactérias isoladas da própria cultura e ausência de resposta, quando utilizaram estirpes isoladas de milho. Sendo assim, estudar e inocular bactérias homólogas em condições de casa de vegetação permitem uma maior compreensão das diversas interações que possam ocorrer para o desenvolvimento da tecnologia de inoculantes, como já foi observado para as culturas da soja e do arroz (NGUYEN *et al.*, 2003).

Um imenso avanço foi realizado na pesquisa com bactérias diazotróficas para inoculação em gramíneas, sendo observado resultados cada vez mais promissores. Contudo, ainda há muito o que se estudar, desde a interação desses microrganismos com as plantas hospedeiras até a adoção dessa tecnologia pelos agricultores (SILVEIRA E FREITAS, 2007). 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.

Diante deste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da inoculação de diferentes estirpes diazotróficas (pré-selecionadas *in vitro*) em doze

genótipos de *Brachiaria* oriundos do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Gado de Corte, através das análises de parâmetros de crescimento avaliados em experimento conduzido em casa de vegetação. O estudo teve como objetivo final selecionar interações benéficas entre bactérias diazotróficas e genótipos de *Brachiaria* spp. para estudos de inoculação em condições de campo, buscando a inserção da FBN no melhoramento de pastagens.

## 2 - MATEIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Seleção de associações eficientes entre estirpes com diferentes atividades funcionais e genótipos de *Brachiaria* em casa de vegetação (Experimento I)

#### 2.1.1 - Localização do experimento

O experimento foi instalado em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, Seropédica – RJ em abril de 2017 e foi conduzido até novembro de 2017 (FIGURA 1). Foram selecionados 12 genótipos de *Brachiaria*, sendo: *B. brizantha*: cv. Marandu, BRS Piatã, Xaraés, BRS Paiaguás, B140; *B. decumbens*: cv. Basilisk; *B. humidicola*: comum, BRS Tupi, H47, Llanero; *B. ssp.*: cv. Mulato II e H331-Ipyorã. Os parâmetros de crescimento definidos em resposta a inoculação com a estirpe *A. brasilense* Sp245 foram utilizados com base nos estudos realizados por Gomes (2017) em casa de vegetação. As cultivares foram testadas contra 32 estirpes isoladas de diferentes cultivares de *Brachiaria*, visando selecionar pelo menos 4 interações estirpe vs cultivar eficientes para serem novamente avaliados em condições de campo contra as estirpes mais eficientes com o objetivo de selecionar as melhores combinações genótipos/estirpes.



**Figura 1.** Vista geral do experimento de genótipos de *Brachiaria* inoculadas com bactérias diazotróficas e cultivadas em casa de vegetação (60 dias após o plantio).

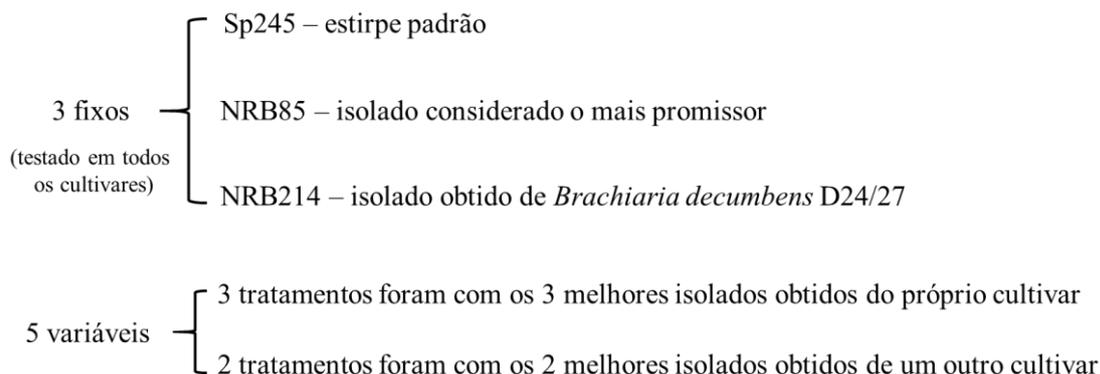
#### 2.1.2. Descrição do solo utilizado e adubação

O solo utilizado neste experimento foi caracterizado como Planossolo com as seguintes características: pH 5,37, teores de P de 16 mg.L<sup>-1</sup>, K de 89,70 mg.L<sup>-1</sup>, Ca de 2,89 mmol dm<sup>-3</sup>, Mg de 1,18 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>. A análise foi realizada no Laboratório de Química Agrícola da Embrapa Agrobiologia, onde os procedimentos são baseados no Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Animal e Alimentos - Embrapa (NOGUEIRA E SOUZA, 2005). De acordo com a análise química do solo foram aplicados o equivalente a 114,46 Kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.ha<sup>-1</sup>, 23 Kg de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.ha<sup>-1</sup> e 15,38 Kg de FTEBR12.ha<sup>-1</sup>.

#### 2.1.3 - Delineamento experimental

O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas com 120 tratamentos, com três repetições, totalizando 360 parcelas experimentais, e cada parcela com 7 plantas. Cada genótipo de *Brachiaria* foi avaliado em dez tratamentos (TABELA 1): oito inoculados, um controle absoluto (sem nitrogênio) e um controle nitrogenado (100 kg de N.ha<sup>-1</sup>). O controle nitrogenado teve sua dosagem total fracionada, sendo aplicada na forma de uréia em três épocas. A primeira adubação foi realizada 30 dias após a semeadura (30 kg de N.ha<sup>-1</sup>), a segunda após o primeiro corte (30 kg de N.ha<sup>-1</sup>) e a terceira após o segundo corte (40 kg de N.ha<sup>-1</sup>), totalizando a dosagem de 100 kg de N.ha<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>. Os tratamentos com inoculação nas sementes foram realizados conforme descrito a seguir:



As estirpes NRB085 (*A. lipoferum*) e NRB214 (*A. formosense*) foram selecionadas para serem testadas em todos os genótipos em razão do potencial em expressar diferentes características relacionadas à capacidade de promoção do crescimento vegetal comparada às demais estirpes avaliadas, enquanto que o uso da Sp245 (*A. brasilense*) foi devido aos resultados promissores observados na inoculação desta estirpe em genótipos de *Brachiaria* no trabalho realizado por Gomes (2017). Para os tratamentos de inoculação variáveis, cada estirpe foi avaliada em dois genótipos de *Brachiaria*.

A semeadura foi realizada no dia 25/04/2017 em caixas de plástico pretas de 15 dm<sup>3</sup> contendo 14 Kg de solo cada, divididas ao meio com uma placa de isopor de 2 cm de espessura de modo que cada tratamento possuía 7 Kg de solos. Cada caixa foi composta por dois tratamentos, um cultivar de *Brachiaria* e dois tratamentos (inoculado, controle nitrogenado ou controle absoluto), cada um colocado em um lado do isopor, com cinquenta sementes por parcela. Quinze dias após a emergência, foi realizado o desbaste mantendo-se sete plantas por parcela.

#### 2.1.4 – Análise estatística

Os dados foram analisados no programa SAEG 8.0 quanto a sua normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Cockran e Bartlett). Em seguida, foram feitas análises de variância e teste DMS (10%) para comparação das médias, utilizando-se o programa SISVAR 5.0.

A significância de 0,1 foi escolhida de acordo com o protocolo oficial para avaliação da viabilidade e eficiência agrônômica de cepas, produtos e tecnologias relacionada às bactérias associativas descrito pelo MAPA (2011).

#### 2.1.5 - Material biológico utilizado – preparo do inoculante

As 32 estirpes foram multiplicadas em meio líquido DYGS sob agitação de 150 rpm a 30°C durante 24 horas em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio. Posteriormente ao crescimento uma alíquota de 15 mL de cultura bacteriana contendo 10<sup>8</sup> células.mL<sup>-1</sup> foi aplicada em um saco contendo 35 g de turfa estéril, este então foi misturado até se obter uma distribuição uniforme do inoculante. Os sacos de turfa inoculados foram acondicionados em estufa a 30°C por 48 horas para a maturação do inoculante. Após esse período foi pesado 1 g de inoculante e misturado com 250 sementes seguido de secagem à sombra e plantados em suas respectivas caixas no dia seguinte. As combinações dos genótipos e estirpes (tratamentos) estão listados na tabela 1 .

**Tabela 0-1.** Matriz de genótipos vs estirpes selecionadas para avaliação do efeito de inoculação no desenvolvimento das plantas em experimento conduzido em casa-de-vegetação

Genótipos / Tratamentos	N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N N																																					
	S R R R R R R R R R R R R R R R R R R R R R R R R R R R R R R R R R R R R R R R																																					
	P B B B B B B B B B B B B B B B B B B B B B B B B B B B B B B B B B B B B B B B																																					
	2 0 2 1 0 0 0 0 1 1 0 1 1 0 2 1 1 0 0 0 0 0 2 0 1 0 1 0 1 0 1 1 1																																					
	4 8 1 0 2 4 8 3 1 4 7 7 4 8 2 5 0 4 4 5 9 9 0 9 5 9 4 8 0 4 4 9 9																																					
C/N	S/N	5	5	4	9	1	1	8	7	5	8	4	8	6	1	4	3	3	3	5	4	8	2	0	4	8	6	0	7	8	6	2	4	7				
Xaraés	x	x	X	x	x			x						x	X	x																						
B140		x	X	x	x				X															x	x		x											
Paiaguás	x	x	X	x	x				x											x	x	x	x															
Piatã	x	x	X	x	x										x	x	x								x			x										
Marandu	x	x	X	x	x																				X								x	x	x			
Ipyporã	x	x	X	x	x				x	x	x		x																							x		
Mulato II	x	x	X	x	x	X																			x								x	x	x			
Tupi	x	x	X	x	x		x																													x		
H. comum	x	x	X	x	x	X	x	x																														
Basilisk	x	x	X	x	x																																	
Llanero	x	x	X	x	x																																	
H47	x	x	X	x	x																																	

Foram realizados três cortes da parte aérea das plantas, com intervalo de 60 dias. O primeiro corte foi realizado 60 dias após o plantio (DAP), a 5 cm do colo da planta, o segundo corte também foi a 5 cm do solo após 120 dias após o plantio, e o terceiro corte foi rente ao colo da planta, conforme descrito por Bonfim-Silva *et al.* (2007), após 180 dias após o plantio. Após o terceiro corte, foi feita a coleta do sistema radicular para avaliação do acúmulo de biomassa e de nutrientes.

#### 2.1.6. Variáveis de crescimento analisadas

As variáveis analisadas foram acúmulo de massa seca da parte aérea e da raiz, acúmulo de N na parte aérea e raízes, acúmulo de massa seca da planta, e acúmulo de N da planta dos 12 genótipos de *Brachiaria* em estudo.

- Acúmulo de massa seca total da parte aérea foi obtido através do peso da parte aérea de cada corte (60 DAP, 120 DAP e 180 DAP), em balança semianalítica, após a permanência do material em estufa de circulação de ar a 65°C por 72 horas, ou até atingir massa seca constante (MALAVOLTA, 1997).
- N total acumulado da massa seca da parte aérea, de cada corte (60 DAP, 120 DAP e 180 DAP), foi obtido após a moagem do material em moinho tipo Willey, com peneiras de diâmetro de 1 mm, pelo método de Kjeldahl (NOGUEIRA E SOUZA, 2005) no Laboratório de Química Agrícola da Embrapa Agrobiologia. O acúmulo de N total foi obtido pelo produto entre a massa seca e o teor do N nutriente.
- Acúmulo de massa seca da raiz foi avaliado somente após o terceiro corte, onde as raízes foram peneiradas em malha de 4 mm e lavadas. Todo o material coletado foi seco em estufa de circulação de ar, a 65°C por 72 horas e posteriormente pesado em balança semianalítica.
- N acumulado da massa seca da raiz (180 DAP), foi obtido após a moagem do material em moinho tipo Willey, com peneiras de diâmetro de 1 mm, pelo método de Kjeldahl (NOGUEIRA E SOUZA, 2005) no Laboratório de Química Agrícola da Embrapa Agrobiologia. O acúmulo de N total foi obtido pelo produto entre a massa seca e o teor do N nutriente.
- Acúmulo de massa seca total planta foi obtido pela soma da massa seca da parte aérea (soma dos três cortes) com a massa seca da raiz.
- N total acumulado da planta foi obtido pela soma do N acumulado da parte aérea (soma dos três cortes) com o N acumulado da raiz.

## 2.2 - Seleção de associações eficientes entre estirpes com diferentes atividades funcionais e genótipos de *Brachiaria* em casa de vegetação (Experimento II – Inoculação por aspersão foliar)

Após a realização do primeiro corte no experimento de casa de vegetação I, foi observado um destaque para os genótipos Marandu quando inoculada com a estirpe NRB214 (*A. formosense*) e Basilisk quando inoculada com a estirpe NRB085 (*A. lipoferum*) em relação ao acúmulo de massa seca da parte aérea em relação aos demais genótipos em estudo. Desta forma, esses genótipos foram selecionados para o experimento de inoculação via aspersão foliar.

### 2.2.1 - Localização do experimento

O experimento foi instalado em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, Seropédica – RJ em julho de 2017 e foi conduzido até março de 2018. Foram selecionados

os genótipos *B. brizantha*: cv. Marandu e *B. decumbens*: cv. Basilisk, conforme descrito anteriormente.

#### 2.2.2 - Descrição do solo utilizado e adubação

A caracterização do solo e a adubação utilizada neste experimento foi igual ao do Experimento I.

#### 2.2.3. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com seis tratamentos, com três repetições, totalizando 18 parcelas experimentais, e cada parcela com sete plantas. Cada genótipo de *Brachiaria* possuiu três tratamentos, dois inoculados e um controle absoluto (sem nitrogênio). No genótipo Marandu foram usadas as estirpes Sp245 e NRB214, e no genótipo Basilisk as estirpes Sp245 e NRB085. O experimento foi conduzido nas mesmas condições do experimento I.

Foram realizados três cortes da parte aérea das plantas, com intervalo de 75 dias. O primeiro corte foi realizado 75 dias após o plantio (DAP), a 5 cm do colo da planta, o segundo corte também foi a 5 cm do solo após 150 DAP, e o terceiro corte foi rente ao colo da planta, conforme descrito por Bonfim-Silva *et al.* (2007), após 225 DAP.

O inoculante utilizado foi na forma líquida via aspersão foliar, sendo aplicado em três momentos do experimento. A primeira foi realizada após 30 dias do plantio, a segunda após 15 dias do 1º corte e a terceira aplicação após 15 dias do 2º corte.

#### 2.2.4 – Análise estatística

A análise estatística utilizada neste experimento foi igual ao do Experimento I

#### 2.2.5 - Material biológico utilizado – preparo do inoculante

As três estirpes (NRB085, NRB214 e Sp245) foram multiplicadas em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de DYGS líquido sob agitação de 150 rpm a 30°C durante 24 horas. Posteriormente ao crescimento, uma alíquota de cultura bacteriana foi adicionada à 90 mL de água destilada, mantendo  $10^8$  células bacterianas mL<sup>-1</sup>, tendo assim a formulação do inoculante líquido. Após o preparo do inoculante, 15 mL do mesmo foi aplicado, via aspersão foliar, em suas respectivas caixas, obtendo assim os tratamentos.

#### 2.2.6 - Variáveis de crescimento analisadas

As variáveis analisadas foram acúmulo de massa fresca e seca da parte aérea e acúmulo de N na parte aérea, conforme descrito anteriormente

### 3 - RESULTADOS

#### 3.1. Seleção de associações eficientes entre estirpes com atividades funcionais contrastantes e genótipos de *Brachiaria* em experimento conduzido em casa de vegetação (Experimento I – inoculação de sementes)

##### 3.1.1. *Brachiaria brizantha*

###### a) Xaraés

A análise da massa seca total e N acumulado na planta do genótipo Xaraés mostrou que o tratamento nitrogenado diferiu significativamente dos demais tratamentos com acúmulos de 156g/vaso para massa seca e de 981 mg N/vaso para o nitrogênio. A única exceção foi tratamento inoculado com a estirpe NRB224 que não diferiu estatisticamente do tratamento nitrogenado em relação ao acúmulo de N na planta (TABELA 2).

Tabela 2. Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés cultivada em casa de vegetação.

Trat.	Espécie	Origem	Massa seca		Inc (%)*		Ntotal		Inc (%)**	
			g/vaso		Controle		mg/vaso		Controle	
C/N	-	-	156	a	54,9		981	a	60,3	
SP245	<i>A. brasilense</i>	Het	92,1	d	0		660,9	de	8	
S/N	-	-	100,7	bcd	-		612	e	-	
NRB085	<i>A. lipoferum</i>	Het	107,6	bcd	6,9		816,5	bc	33,4	
NRB214	<i>A. formosense</i>	Het	116,1	bc	15,3		728,6	bcde	19,1	
NRB041	<i>N. amazonense</i>	Het	95,9	cd	0		692,8	bcde	13,2	
NRB148	<i>N. amazonense</i>	Het	101,6	bcd	0,9		687,7	cde	12,4	
NRB081	<i>S. maltophilia</i>	Hom	108,1	bcd	7,3		774,9	bcd	26,6	
NRB224	<i>A. lipoferum</i>	Hom	119,7	b	18,8		843	ab	37,8	
NRB153	<i>N. amazonense</i>	Hom	111,8	bcd	11		771,4	bcd	26	
CV (%)			13,11				14,2			

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

Dados de acúmulo de biomassa e Nitrogênio referente aos 3 cortes realizados no período de abril a novembro de 2017

Legenda: Trat.: Tratamentos; Het.: Espécies heteróloga; Hom.: Espécies homólogas; Inc.: Incremento

\* % de incremento da massa seca da planta calculado em relação ao controle absoluto

\*\* % de incremento do Ntotal da planta calculado em relação ao controle absoluto

Os tratamentos inoculados com as estirpes NRB085 (816,5 mg/vaso), NRB081 (774,9 mg/vaso), NRB224 (843 mg/vaso) e NRB153 (771,4 mg/vaso) apresentaram valores superiores para o N total acumulado nos tecidos em relação ao tratamento controle absoluto (612 mg/vaso), sendo observado um ganho que variou de 26 à 37,8% no N total da planta (TABELA 2). Apesar dos tratamentos inoculados com as estirpes Sp245,

NRB214, NRB041 e NRB148 não diferiram estatisticamente do tratamento controle absoluto em relação ao N total acumulado da planta, eles apresentaram valores superiores de até 19,1% (TABELA 2).

Em relação a massa seca da planta nenhum tratamento inoculado diferiu estatisticamente do controle absoluto, no entanto, todos os tratamentos inoculados, exceto os com as estirpes Sp245 e NRB041, apresentaram rendimento de massa seca total superiores (até 18,8%) ao tratamento controle.

As análises individualizadas de acúmulo de massas seca e N total da parte aérea e raízes referentes aos cortes no genótipo Xaraés estão apresentadas no anexo M. O tratamento nitrogenado apresentou os maiores rendimentos no total da massa seca e do N acumulado da planta. Porém, foi possível observar que no primeiro corte (60 DAP), o tratamento inoculado com a estirpe NRB081 (homóloga) apresentou um acúmulo de massa seca (16,3 g/vaso) e de N (395,4 mg N/vaso) da parte aérea superior ao tratamento nitrogenado, 16,2 g/vaso e 368,6 mg N/vaso, respectivamente (ANEXO M). Tal fato não foi observado nos demais cortes (120 e 180 DAP), no entanto, no segundo corte os tratamentos inoculados com as estirpes NRB085, NRB224 e NRB153 não diferiram estatisticamente do tratamento com N tanto para a massa seca como para o N acumulado da parte aérea da planta. Também não foi observada diferença estatística significativa no N acumulado da raiz entre os tratamentos inoculados com as estirpes NRB085, NRB214 e NRB041 com o tratamento nitrogenado. Entretanto, em relação a massa seca da raiz, este efeito só foi observado no tratamento inoculado com a estirpe NRB214 (ANEXO M).

#### b) Paiaguás

Assim como o observado no capim Xaraés, o tratamento nitrogenado para o capim Paiaguás também apresentou os maiores rendimentos na massa seca (109,1 g/vaso) e no N total (792,9 mg N/vaso) da planta. Entretanto, o mesmo não diferiu estatisticamente dos tratamentos inoculados com as estirpes NRB214, NRB103, NRB043 e NRB045 em relação ao N total acumulado nos tecidos das plantas do cv. Paiaguás (TABELA 3).

O tratamento inoculado que apresentou o maior acúmulo de massa seca total da planta foi a estirpe NRB043 (89,6 g/vaso) enquanto que para o N total da planta foi o tratamento inoculado com a estirpe NRB103 (745,4 mg N/vaso) (TABELA 3). Apesar de não diferirem estatisticamente do tratamento controle absoluto, os tratamentos inoculados com as estirpes NRB214, NRB103 e NRB043 apresentaram maiores acúmulos de massa seca total com valores superiores de até 8,5%. Já para o N total acumulado, este fato só foi observado para os tratamentos inoculados com as estirpes NRB043 e NRB103, onde o acúmulo foi 4,7% superior ao tratamento controle (TABELA 3).

**Tabela 3.** Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de *Brachiaria brizantha* cv. Paiaguás cultivada em casa de vegetação

Trat	Espécie	Origem	Massa seca		Inc (%)*		Ntotal		Inc (%)**	
			g/vaso	Controle	mg/vaso	Controle	mg/vaso	Controle	mg/vaso	Controle
C/N	-	-	109,1	a	32,1	792,9	a	11,4		
SP245	<i>A. brasilense</i>	Het	80,5	bc	0	657,6	bc	0		
S/N	-	-	82,6	bc	-	711,7	abc	-		
NRB085	<i>A. lipoferum</i>	Het	79,7	bc	0	633,4	c	0		
NRB214	<i>A. formosense</i>	Het	83,7	bc	1,4	698,3	abc	0		
NRB037	<i>A. oryzae</i>	Het	70,5	c	0	624,3	c	0		
NRB103	<i>A. melinis</i>	Hom	83,3	bc	0,8	745,4	ab	4,7		
NRB043	<i>P. diazotrophicus</i>	Hom	89,6	b	8,5	717,7	abc	0,8		
NRB045	<i>N. amazonense</i>	Hom	79,5	bc	0	704,3	abc	0		
NRB054	<i>N. amazonense</i>	Hom	73,6	c	0	625,1	c	0		
CV (%)			12,5			10,3				

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

Dados de acúmulo de biomassa e Nitrogênio referente aos 3 cortes realizados no período de abril a novembro de 2017

Legenda: Trat.: Tratamentos; Het.: Espécies heteróloga; Hom.: Espécies homólogas; Inc.: Incremento

\* % de incremento da massa seca da planta calculado em relação ao controle absoluto

\*\* % de incremento do Ntotal da planta calculado em relação ao controle absoluto

As análises individualizadas de acúmulo de massas seca e N total da parte aérea e raízes referentes aos cortes no genótipo Paiaguás estão apresentadas no ANEXO N. A avaliação separada de acúmulo de massa seca da parte aérea e da raiz mostrou que os tratamentos inoculados com as estirpes NRB214 (27,3 mg N/vaso), NRB043 (25,5 mg N/vaso) e Sp245 (25,1 mg N/vaso) não diferiram estatisticamente do tratamento nitrogenado (31,1 mg N/vaso) em relação a massa seca da raiz (ANEXO N). Já em relação a massa seca da parte aérea, foi observado que no corte realizado aos 60 DAP, o tratamento inoculado com a estirpe NRB103 (homóloga) apresentou um acúmulo de N (401 mg N/vaso) superior ao tratamento nitrogenado (348,2 mg N/vaso). Nos demais cortes, nenhum tratamento inoculado apresentou valores superiores de massa seca e N acumulado da parte aérea em relação ao tratamento nitrogenado. No entanto, os tratamentos com as estirpes NRB085, NRB103 e NRB043 não diferiram estatisticamente do tratamento com N tanto para a massa seca como para o N acumulado da parte aérea da planta no corte realizado aos 120 DAP (ANEXO N).

### c) Piatã

A análise dos dados do genótipo Piatã mostrou que o tratamento nitrogenado diferiu estatisticamente dos demais tratamentos e acumulou os maiores rendimentos tanto na massa seca total (122,8 g/vaso) como no Ntotal da planta (1032,8 mg N/vaso) (TABELA 4).

Não foi observado nenhum ganho no acúmulo de massa seca e Ntotal das plantas inoculadas com as estirpes (homólogas e heterólogas) em relação ao tratamento controle absoluto (TABELA 4).

**Tabela 4.** Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de *Brachiaria brizantha* cv. Piatã cultivada em casa de vegetação

Trat	Espécie	Origem	Massa seca		Inc (%)*	Ntotal		Inc (%)**
			g/vaso		Controle	mg/vaso	Controle	
C/N	-	-	122,8	a	19,9	1032,8	a	34,7
SP245	<i>A. brasilense</i>	Het	84,8	c	0	694,6	c	0
S/N	-	-	102,4	b	-	766,8	b	-
NRB085	<i>A. lipoferum</i>	Het	93,4	bc	0	699,8	c	0
NRB214	<i>A. formosense</i>	Het	89,7	c	0	731,4	bc	0
NRB074	<i>A. brasilense</i>	Hom	89,4	c	0	695,2	c	0
NRB178	<i>N. amazonense</i>	Hom	85,1	c	0	714,4	bc	0
NRB146	<i>N. amazonense</i>	Hom	88,6	c	0	721,7	bc	0
NRB200	<i>A. brasilense</i>	Het	95,3	bc	0	758,3	bc	0
NRB096	<i>B. safensis</i>	Het	92,3	bc	0	754,6	bc	0
CV (%)			9,3			6,1		

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

Dados de acúmulo de biomassa e Nitrogênio referente aos 3 cortes realizados no período de abril a novembro de 2017

Legenda: Trat.: Tratamentos; Het.: Espécies heteróloga; Hom.: Espécies homólogas; Inc.: Incremento

\* % de incremento da massa seca da planta calculado em relação ao controle absoluto

\*\* % de incremento do Ntotal da planta calculado em relação ao controle absoluto

As análises individualizadas de acúmulo de massas seca e N total da parte aérea e raízes referentes aos cortes no genótipo Piatã estão apresentadas no anexo O. Não foi observado diferença estatística significativa no acúmulo de massa seca do tratamento nitrogenado em relação ao tratamento inoculado com a estirpe NRB096 (19,1 g/vaso) para o segundo corte. Da mesma forma não foi observado diferenças estatísticas nos tratamentos inoculados com as estirpes NRB074 e NRB178 no primeiro corte em relação ao N acumulado da parte aérea (ANEXO O). Mesmo assim, foi observado que tanto no segundo como no terceiro corte, todos os tratamentos inoculados apresentaram rendimentos de massa seca e N acumulado da parte aérea superiores ao tratamento controle absoluto, exceção feita as estirpes Sp245, NRB074 e NRB178.

#### d) Marandu

Assim como o observado para os demais genótipos já analisados, os maiores rendimentos de massa seca e Ntotal da planta no capim Marandu foram obtidos com o adubo nitrogenado, com acúmulos de 116,8 g/vaso de massa seca e 880,5 mg N/vaso. No entanto, o tratamento inoculado com a estirpe NRB142 não diferiu estatisticamente do tratamento nitrogenado em relação ao acúmulo de N na planta, com um acúmulo de 817,6 mg N/vaso (TABELA 5).

Em relação ao Ntotal acumulado nas plantas, somente o tratamento inoculado com a estirpe NRB142 diferiu estatisticamente do tratamento controle, com um acúmulo superior de 20,6% (TABELA 5). Os demais tratamentos inoculados não diferiram estatisticamente do tratamento controle, porém apresentaram acúmulos de N maiores (até 10,6%) que o tratamento controle absoluto, exceção feita a estirpe NRB194 (TABELA 5).

Também não foi observado diferença estatística entre os tratamentos inoculados e o tratamento controle para o acúmulo da massa seca da planta, porém os tratamentos inoculados com a estirpe NRB142 e estirpe NRB085 apresentaram acúmulos superiores de até 7,2% (TABELA5).

**Tabela 5.** Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu cultivada em casa de vegetação.

Trat	Espécie	Origem	Massa seca		Inc (%)*		Ntotal		Inc (%)**	
			g/vaso	Controle	mg/vaso	Controle	mg/vaso	Controle		
C/N	-	-	116,8	a	32,3	880,5	a	29,9		
SP245	<i>A. brasilense</i>	Het	82,8	de	0	701,5	cd	3,5		
S/N	-	-	88,3	bcd	-	677,8	cd	-		
NRB085	<i>A. lipoferum</i>	Het	94,6	b	7,2	727,3	bcd	7,3		
NRB214	<i>A. formosense</i>	Het	87,2	bcd	0	749,4	bc	10,6		
NRB103	<i>A. melinis</i>	Het	88,6	bcd	0,4	717,8	cd	5,9		
NRB092	<i>A. oryzae</i>	Het	85,1	cd	0	739,6	bcd	9,1		
NRB142	<i>P. silvatlantica</i>	Hom	94,5	bc	7,1	817,6	ab	20,6		
NRB194	<i>A. brasilense</i>	Hom	75,3	e	0	648,6	d	0		
NRB197	<i>A. formosense</i>	Hom	85,7	bcd	0	740,8	bcd	9,3		
CV (%)			7,4			9				

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

Dados de acúmulo de biomassa e Nitrogênio referente aos 3 cortes realizados no período de abril a novembro de 2017

Legenda: Trat.: Tratamentos; Het.: Espécies heteróloga; Hom.: Espécies homólogas; Inc.: Incremento

\* % de incremento da massa seca da planta calculado em relação ao controle absoluto

\*\* % de incremento do Ntotal da planta calculado em relação ao controle absoluto

As análises individualizadas de acúmulo de massas seca e N total da parte aérea e raízes referentes aos cortes no genótipo Marandu estão apresentadas no anexo P. Os maiores acúmulos de massa seca e de N acumulado da planta foram observados no tratamento nitrogenado, enquanto que o tratamento inoculado com a estirpe NRB214 apresentou o maior acúmulo de massa seca (19,4 g/vaso) e de N (470,5 mg N/vaso) da parte aérea no corte realizado aos 60 DAP. Neste corte, também foi observado que todos os tratamentos inoculados apresentaram valores superiores ao do tratamento nitrogenado em relação a massa seca da parte aérea enquanto que o N acumulado da parte aérea foi menor para os tratamentos inoculados com as estirpes NRB085 e NRB194 (ANEXO P). Todavia, a inoculação com a estirpe NRB142 (18,2 g/vaso) não diferiu estatisticamente do tratamento com N (21,5 g/vaso) em relação a massa seca da parte aérea no segundo corte realizado aos 120 DAP. Também não foi observado diferença estatística

significativa no N acumulado da raiz entre os tratamentos inoculados com as estirpes NRB085 e NRB142 em relação ao tratamento nitrogenado (ANEXO P).

e) B140

A inoculação com a estirpe NRB088 promoveu os maiores acúmulos de massa seca (149,9 g/vaso) e de Ntotal da planta (1119,6 mg N/vaso) no genótipo B140. No entanto, os tratamentos inoculados com as estirpes Sp245, NRB214 e NRB094 não diferiram estatisticamente do tratamento inoculado com a estirpe NRB088, para ambas as variáveis (TABELA 6). É importante comentar que o tratamento com N foi prejudicado pela não germinação das sementes do genótipo B140 e, portanto, o tratamento foi excluído das análises.

O tratamento inoculado com a estirpe NRB088 diferiu estatisticamente tanto para massa seca como para o N acumulado na planta em relação ao tratamento controle (TABELA 6). Os tratamentos inoculados não diferiram estatisticamente embora tenha sido observado valores superiores de massa seca da planta, com exceção da estirpe NRB142. Estes valores no acúmulo da massa seca variou de 0,5% quando inoculado com a estirpe NRB158 à 56,7% quando inoculado com a estirpe NRB214. Já em relação ao acúmulo de N da planta, esse valores variaram de 1,5 a 33,2% e foram observados para os tratamentos inoculados com as estirpes NRB214, NRB094, NRB087 e Sp245. A inoculação com as estirpes NRB214 e NRB094 apresentaram valores de massa seca e Ntotal da planta superiores ao tratamento com a Sp245, sendo de até 42,3 % para massa seca e de até 24,8 % para N total (TABELA 6).

**Tabela 6.** Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de *Brachiaria brizantha* cv. B140 cultivada em casa de vegetação.

Trat	Espécie	Origem	Massa seca		Inc (%)*		Ntotal		Inc (%)**	
			g/vaso	ab	Controle	mg/vaso	Controle			
SP245	<i>A. brasilense</i>	Het	93,3	ab	10,1	774,4	ab	6,7		
S/N	-	-	84,7	b	-	725,5	b	-		
NRB085	<i>A. lipoferum</i>	Het	90,6	b	7	714,7	b	0		
NRB214	<i>A. formosense</i>	Het	132,8	ab	56,7	966,2	ab	33,2		
NRB088	<i>A. lipoferum</i>	Het	149,9	a	76,9	1119,6	a	54,3		
NRB094	<i>P. kuykendallii</i>	Hom	112,9	ab	33,2	950,8	ab	31		
NRB158	<i>N. amazonense</i>	Hom	85,1	b	0,5	702,6	b	0		
NRB087	<i>A. oryzae</i>	Het	85,6	b	1,0	736,3	b	1,5		
NRB142	<i>P. silvatlantica</i>	Het	80,4	b	0	707,9	b	0		
CV (%)			15,6			20,85				

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

Dados de acúmulo de biomassa e Nitrogênio referente aos 3 cortes realizados no período de abril a novembro de 2017

Legenda: Trat.: Tratamentos; Het.: Espécies heteróloga; Hom.: Espécies homólogas; Inc.: Incremento

\* % de incremento da massa seca da planta calculado em relação ao controle absoluto

\*\* % de incremento do Ntotal da planta calculado em relação ao controle absoluto

As análises individualizadas de acúmulo de massas seca e N total da parte aérea e raízes referentes aos cortes no genótipo B140 estão apresentadas no anexo Q. Foi

observado que o tratamento inoculado com a estirpe NRB142 apresentou um ganho de 4,5% na massa seca e de 42,3% no N acumulado da parte aérea em relação ao controle no segundo corte. O acúmulo de N nas raízes neste tratamento inoculado (102,5 mg N/vaso) também foi superior ao observado no tratamento controle (91,1 mg N/vaso) (ANEXO Q).

### 3.1.2 – Híbridos de *Brachiaria spp.*

#### a) Ipyporã

O tratamento nitrogenado diferiu estatisticamente dos demais tratamentos e apresentou acúmulos de massa seca e N acumulado na planta, 115,8 g/vaso e 900,7 mg N/vaso, respectivamente. Em adição, a inoculação com a estirpe NRB085 também apresentou os maiores acúmulos de massa seca (97,8 g/vaso) e de Ntotal (804,4 mg N/vaso) da planta dentre os tratamentos inoculados (TABELA 7).

**Tabela 7.** Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de *Brachiaria spp* cv. Ipyporã cultivada em casa de vegetação

Trat	Espécie	Origem	Massa seca		Ntotal		Inc (%)**	
			g/vaso	Controle	mg/vaso	Controle		
C/N	-	-	115,8	a	46,2	900,7	a	37,4
SP245	<i>A. brasilense</i>	Het	74,2	c	0	655,1	c	0
S/N	-	-	79,2	c	-	655,7	c	-
NRB085	<i>A. lipoferum</i>	Het	97,8	b	23,5	804,4	b	22,7
NRB214	<i>A. formosense</i>	Het	83,7	bc	5,7	724,8	bc	10,5
NRB088	<i>A. lipoferum</i>	Hom	87,9	bc	11,1	667,3	c	1,8
NRB037	<i>A. oryzae</i>	Hom	74,9	c	0	722,1	bc	10,1
NRB115	<i>N. amazonense</i>	Hom	79,6	c	0,5	694,7	c	6
NRB074	<i>A. brasilense</i>	Het	81,7	bc	3,1	735	bc	12,1
NRB194	<i>A. brasilense</i>	Het	82,6	bc	4,3	711,5	c	8,5
CV (%)			14,28			8,2		

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

Dados de acúmulo de biomassa e Nitrogênio referente aos 3 cortes realizados no período de abril a novembro de 2017

Legenda: Trat.: Tratamentos; Het.: Espécies heteróloga; Hom.: Espécies homólogas; Inc.: Incremento

\* % de incremento da massa seca da planta calculado em relação ao controle absoluto

\*\* % de incremento do Ntotal da planta calculado em relação ao controle absoluto

O tratamento inoculado com a estirpe NRB085 diferiu estatisticamente tanto para massa seca como para o N acumulado na planta do tratamento controle,. A inoculação das demais estirpes apresentaram valores superiores (0,5% estirpe NRB115 e 11,1% estirpe NRB088) no acúmulo de massa seca da planta, apesar de não diferirem estatisticamente. Já em relação ao acúmulo de N da planta, todas as estirpes isoladas dos genótipos de *Brachiaria* apresentaram valores superiores (até 12,1%) em relação ao tratamento controle (TABELA 7).

As análises individualizadas de acúmulo de massas seca e N total da parte aérea e raízes referentes aos cortes no genótipo Ipyporã estão apresentadas no anexo R. O

tratamento nitrogenado apresentou os maiores acúmulos da massa seca e do N acumulado tanto da parte aérea como da raiz, no entanto não apresentou diferença estatística no acúmulo de massa seca em relação ao tratamento inoculado com a estirpe NRB085. Por outro lado, no corte realizado aos 60 DAP o tratamento inoculado com a estirpe NRB074 apresentou o maior acúmulo de massa seca da parte aérea (14,5 g/vaso) enquanto que o maior valor de N acumulado foi obtido com a inoculação da estirpe NRB085 (439,6 mg N/vaso) (ANEXO R).

Também foi observado que todos os tratamentos inoculados, com exceção com a estirpe NRB037, apresentaram acúmulos de massa seca da parte aérea superiores ao tratamento nitrogenado no primeiro corte. Em adição, a inoculação com a estirpe NRB074 também promoveu um maior acúmulo de N da parte aérea em relação ao tratamento com N no primeiro corte. Apesar dos tratamentos inoculados com as estirpes NRB214, NRB037, NRB115 e NRB194 terem apresentado valores inferiores ao do tratamento nitrogenado em relação ao N acumulado da parte aérea no primeiro corte, eles não diferiram estatisticamente entre si. O tratamento inoculado com a estirpe NRB085 também foi o único que não diferiu estatisticamente do tratamento nitrogenado para a massa seca da raiz (ANEXO R).

A análise do efeito da inoculação com a estirpe Sp245 mostrou rendimentos superiores de massa seca e N acumulado da parte aérea em relação a alguns tratamentos inoculados nos cortes realizados aos 60 e 120 DAP. Já em relação a massa seca e ao N acumulado da raiz, o tratamento inoculado com a estirpe Sp245 não foi superior a nenhum dos demais tratamentos (ANEXO R).

#### b) Mulato II

Os resultados obtidos mostram que o tratamento nitrogenado apresentou os maiores acúmulos de massa seca (179,4 g/vaso) e N total da planta (882,5 mg N/vaso) embora os tratamentos inoculados com as estirpes NRB214 (795,1 mg N/vaso), NRB109 (783,9 mg N/vaso) e NRB098 (754,1 mg N/vaso) não diferiram estatisticamente do tratamento nitrogenado para o acúmulo de N na planta (TABELA 8).

A comparação do acúmulo de massa seca da planta dos tratamentos inoculados com o tratamento controle mostrou que a inoculação com as estirpes NRB085, NRB214 e NRB098 foram superiores, porém não diferiram estatisticamente, sendo observado um aumento de 2,8 % em relação ao tratamento controle (TABELA 8). No caso do N acumulado na planta, apesar dos tratamentos inoculados não diferirem estatisticamente do tratamento controle, a inoculação com as estirpes NRB214, NRB109, NRB098, NRB087 e Sp245 promoveu acúmulo de N superiores que variaram de 4,1% à 13,6% (TABELA 8).

**Tabela 8.** Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de *Brachiaria spp* cv. Mulato II cultivada em casa de vegetação.

Trat	Espécie	Origem	Massa seca		Inc (%)*		Ntotal		Inc (%)**	
			g/vaso		Controle		mg/vaso		Controle	
C/N	-	-	179,4	a	28	882,5	a	26		
SP245	<i>A. brasilense</i>	Het	136,9	b	0	728,9	bc	4,1		
S/N	-	-	140,2	b	-	700,2	bc	-		
NRB085	<i>A. lipoferum</i>	Het	140,9	b	0,6	693,5	bc	0		
NRB214	<i>A. formosense</i>	Het	143,6	b	2,4	795,1	ab	13,6		
NRB109	<i>A. brasilense</i>	Het	130,9	b	0	783,9	ab	12		
NRB098	<i>A. lipoferum</i>	Het	144,1	b	2,8	754,1	ab	7,7		
NRB087	<i>A. oryzae</i>	Hom	128,5	b	0	734,1	bc	4,8		
NRB108	<i>B. aryabhatai</i>	Hom	131,9	b	0	689,2	bc	0		
NRB046	<i>N. amazonense</i>	Hom	101,9	c	0	617,1	c	0		
CV (%)			11,14			12,49				

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

Dados de acúmulo de biomassa e Nitrogênio referente aos 3 cortes realizados no período de abril a novembro de 2017

Legenda: Trat.: Tratamentos; Het.: Espécies heteróloga; Hom.: Espécies homólogas; Inc.: Incremento

\* % de incremento da massa seca da planta calculado em relação ao controle absoluto

\*\* % de incremento do Ntotal da planta calculado em relação ao controle absoluto

As análises individualizadas de acúmulo de massas seca e N total da parte aérea e raízes referentes aos cortes no genótipo Mulato II estão apresentadas no anexo S. Foi observado que os tratamentos inoculados com as estirpes NRB214, NRB087 e NRB108 apresentaram valores inferiores de acúmulo de massa seca da parte aérea em relação ao controle no primeiro corte (ANEXO S). Já os tratamentos inoculados com as estirpes NRB085, NRB108 e NRB046 apresentaram acúmulos superiores de 11,1%, 14,7% e 1,5% no N acumulado da parte aérea em relação ao controle no corte realizado aos 60 DAP, respectivamente. Nos cortes ocorridos aos 120 e 180 DAP, somente a inoculação com a estirpe NRB214 promoveu um acúmulo de N da parte aérea, porém não diferiu estatisticamente do tratamento nitrogenado (ANEXO S).

### 3.1.3 – *Brachiaria decumbens*

#### a) Basilisk

A análise dos resultados mostrou que o tratamento nitrogenado proporcionou os maiores acúmulos de massa seca (128,08 g/vaso) e Ntotal (913,3 mg N/vaso) na planta. No entanto, só houve diferença estatística significativa entre os demais tratamentos em relação a massa seca da planta enquanto que o acúmulo de N da planta para os tratamentos inoculados com as estirpes NRB214, NRB081, NRB098 e Sp245 não diferiram estatisticamente do tratamento nitrogenado (TABELA 9). O tratamento inoculado com a estirpe Sp245 foi a que promoveu o maior acúmulo de massa seca e de Ntotal da planta, 98,4 g/vaso e 781,9 mg N/vaso, respectivamente em relação as demais estirpes inoculadas (TABELA 9).

A comparação do efeito da inoculação das diferentes estirpes em relação ao tratamento controle mostrou que a inoculação com a estirpe NRB214 (heteróloga) apresentou acúmulos maiores (9,4%) tanto na massa seca como no Ntotal da planta em relação ao controle. Por outro lado, as estirpes NRB085 e NRB148 apresentaram os menores acúmulos da massa seca e no N acumulado da planta, respectivamente (TABELA 9).

**Tabela 9.** Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de *Brachiaria decumbens* cv Basilisk cultivada em casa de vegetação.

Trat	Espécie	Origem	Massa seca		Inc (%)*		Ntotal		Inc (%)**	
			g/vaso		Controle		mg/vaso		Controle	
C/N	-	-	128,1	a	44,6		913,3	a	28,7	
SP245	<i>A. brasilense</i>	Het	98,4	b	11,1		781,9	ab	10,2	
S/N	-	-	88,6	b	-		709,5	b	-	
NRB085	<i>A. lipoferum</i>	Het	89,1	b	0,7		750,1	b	5,7	
NRB214	<i>A. formosense</i>	Het	96,9	b	9,4		776,3	ab	9,4	
NRB148	<i>N. amazonense</i>	Het	93,3	b	5,3		729,3	b	2,8	
NRB081	<i>S. maltophilia</i>	Het	91,6	b	3,5		769,9	ab	8,5	
NRB098	<i>A. lipoferum</i>	Hom	85,5	b	0		756,8	ab	6,7	
NRB092	<i>A. oryzae</i>	Hom	82,6	b	0		706,1	b	0	
NRB200	<i>A. brasilense</i>	Hom	83	b	0		687,3	b	0	
CV (%)			17,7				14,9			

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

Dados de acúmulo de biomassa e Nitrogênio referente aos 3 cortes realizados no período de abril a novembro de 2017

Legenda: Trat.: Tratamentos; Het.: Espécies heteróloga; Hom.: Espécies homólogas; Inc.: Incremento

\* % de incremento da massa seca da planta calculado em relação ao controle absoluto

\*\* % de incremento do Ntotal da planta calculado em relação ao controle absoluto

As análises individualizadas de acúmulo de massas seca e N total da parte aérea e raízes referentes aos cortes no genótipo Basilisk estão apresentadas no anexo T. O tratamento nitrogenado apresentou os maiores acúmulos da massa seca e do N acumulado da parte aérea e da raiz. Por outro lado, no corte realizado aos 60 DAP o tratamento inoculado com a estirpe NRB214 apresentou o maior rendimento de massa seca da parte aérea (20,6 g/vaso) enquanto o maior valor de N acumulado da parte aérea foi observado para o tratamento inoculado com a estirpe NRB085 (435,2 mg N/vaso) (ANEXO T). Os demais tratamentos inoculados também apresentaram acúmulos de massa seca da parte aérea superiores ao tratamento nitrogenado, com valores que variaram de 13,3% à 24,1% quando inoculado com as estirpes NRB081 e NRB085, respectivamente. Já em relação ao acúmulo de N da parte aérea no primeiro corte, os tratamentos inoculados com as estirpes NRB214, NRB081, NRB098 e NRB092 apresentaram acúmulo superiores ao tratamento nitrogenado. Os tratamentos inoculados com as estirpes Sp245 e NRB200 não diferiram estatisticamente do tratamento nitrogenado em relação ao N acumulado da parte aérea no primeiro corte (ANEXO T). No corte realizado aos 120 DAP, somente os tratamentos inoculados com as estirpes Sp245 (21 g/vaso), NRB214 (12,8 g/vaso) e

NRB098 (20,9 g/vaso) não diferiram estatisticamente do tratamento nitrogenado (25,2 g/vaso) em relação a massa seca da parte aérea. Neste mesmo corte e no realizado aos 180 DAP, somente o tratamento inoculado com a estirpe Sp245 não diferiu estatisticamente do tratamento nitrogenado em relação ao acúmulo de N da parte aérea (ANEXO T).

### 3.1.4 – *Brachiaria humidicola*

#### a) Tupi

Diferentemente dos demais genótipos de *Brachiaria*, a adubação nitrogenada não proporcionou os maiores rendimentos de acúmulo de massa seca e de Ntotal na planta. Em relação a massa seca, o tratamento inoculado com a estirpe NRB046 promoveu o maior acúmulo de massa seca (129,2 g/vaso) enquanto que a inoculação com a estirpe NRB096 promoveu o maior acumulado de N (842 mg N/vaso) (TABELA 10). Estas estirpes apresentaram acúmulos superiores de 9,1% na massa seca e de 11,1 % no acúmulo de N da planta em relação ao tratamento nitrogenado (100 Kg N/ha). Os tratamentos inoculados com as estirpes NRB021 e NRB096 também apresentaram valores superiores a adubação nitrogenada no acúmulo de massa seca da planta e variaram de 2,3% a 7,2%, respectivamente. Já em relação ao N acumulado da planta somente a inoculação com as estirpes NRB021, NRB178 e NR046 foram superiores e variaram de 18,9 à 23,6 mg N/vaso (TABELA 10).

**Tabela 10.** Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de *Brachiaria humidicola* cv. Tupi cultivada em casa de vegetação.

Trat	Espécie	Origem	Massa seca		Inc (%)*		Ntotal		Inc (%)**	
			g/vaso	Controle	mg/vaso	Controle	mg/vaso	Controle		
C/N	-	-	118,4	abc	3,7	757,4	ab	0,6		
SP245	<i>A. brasilense</i>	Het	104,6	bc	0	697,5	b	0		
S/N	-	-	114,2	abc	-	752,8	ab	-		
NRB085	<i>A. lipoferum</i>	Het	103,7	bc	0	702,9	ab	0		
NRB214	<i>A. formosense</i>	Het	97,4	c	0	715,1	ab	0		
NRB021	<i>P. nitritireducens</i>	Het	121,9	ab	6,8	781,5	ab	3,8		
NRB178	<i>N. amazonense</i>	Het	115,5	abc	1,1	776,9	ab	3,2		
NRB096	<i>B. safensis</i>	Hom	127	ab	11,3	842	a	11,9		
NRB140	<i>N. amazonense</i>	Hom	107,8	abc	0	736,3	ab	0		
NRB046	<i>N. amazonense</i>	Het	129,2	a	13,2	781,3	ab	3,8		
CV (%)			14,9			13,1				

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

Dados de acúmulo de biomassa e Nitrogênio referente aos 3 cortes realizados no período de abril a novembro de 2017

Legenda: Trat.: Tratamentos; Het.: Espécies heteróloga; Hom.: Espécies homólogas; Inc.: Incremento

\* % de incremento da massa seca da planta calculado em relação ao controle absoluto

\*\* % de incremento do Ntotal da planta calculado em relação ao controle absoluto

A comparação dos rendimentos de massa seca e N total da planta dos tratamentos inoculados com o tratamento controle absoluto, mostrou que a inoculação com as estirpes NRB021, NRB178, NRB096 e NRB46 apresentaram acúmulos maiores do que a testemunha apesar de não diferirem estatisticamente. O acúmulo de massa seca observado variou de 1,1% à 13,2% enquanto que o acúmulo de N foi de 3,2% à 11,9% (TABELA 10). Os tratamentos inoculados com as estirpes Sp245, NRB085 e NRB140 apresentarem acúmulos de massa seca da planta menores do que o tratamento controle (TABELA 10), porém apresentaram valores maiores de massa seca e N acumulado da parte aérea em relação ao controle absoluto (ANEXO U).

As análises individualizadas de acúmulo de massas seca e N total da parte aérea e raízes referentes aos cortes no genótipo Tupi estão apresentadas no anexo U. Em relação a massa seca da parte aérea não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos para a primeira e terceira coleta. No entanto, na primeira coleta a maior produção de biomassa foi obtido com a inoculação da estirpe NRB085 e na terceira coleta pela inoculação da estirpe NRB021. Já no segundo corte, foi observado que os tratamentos inoculados com as bactérias Sp245, NRB021, NRB096, NRB140 e NRB046 não diferiram do tratamento nitrogenado e do controle embora a estirpe NRB021 promoveu um maior de biomassa seca em relação ao tratamento nitrogenado.

O acúmulo de N nos tecidos mostrou que pelo menos um dos tratamentos inoculados apresentou um acúmulo de N superior ao tratamento nitrogenado nos três cortes realizados. No primeiro corte, este fato foi observado nos tratamentos inoculados com as estirpes NRB085; NRB214; NRB096; NRB140; e NRB046, já no segundo corte foram com as estirpes NRB021; NRB178; NRB096; e NRB046, e no terceiro corte com a estirpe NRB096 (ANEXO U).

#### b) Humidícula comum

O tratamento nitrogenado apresentou os maiores acúmulos de massa seca (112,5 g/vaso) e de N acumulado (998,9 mg N/vaso) da planta e diferiu estatisticamente dos demais tratamentos (TABELA 11). Dentre os tratamentos inoculados, a inoculação com a estirpe NRB041 foi o que proporcionou os maiores acúmulos de massa de seca (89,7 g/vaso) e no Ntotal (782,3 mg N/vaso) na planta.

Nenhum tratamento inoculado diferiu estatisticamente do tratamento controle tanto para massa seca como para o N acumulado na planta (TABELA 11). Porém, foi observado um maior acúmulo na massa seca da planta para todos os tratamentos inoculados, com exceção da estirpe NRB109. Este acúmulo na massa seca foi de 4,1% quando inoculado com a estirpe NRB224 e de 13,3% quando inoculado com a estirpe NRB041. Já em relação ao teor de N da planta, os valores variaram de 6,8% quando inoculado com a estirpe NRB109 à 19,6% quando inoculado com a estirpe NRB041 (TABELA 11).

**Tabela 11.** Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de *Brachiaria humidicula* cv. comum cultivada em casa de vegetação.

Trat	Espécie	Origem	Massa seca		Inc (%)*	Ntotal	Inc (%)**	
			g/vaso		Controle	mg/vaso	Controle	
C/N	-	-	112,5	a	41,9	998,9	a	52,8
SP245	<i>A. brasilense</i>	Het	88,9	b	12,3	751,2	b	14,9
S/N	-	-	79,2	b	-	653,9	b	-
NRB085	<i>A. lipoferum</i>	Hom	87,8	b	10,8	733,2	b	12,1
NRB214	<i>A. formosense</i>	Het	85,4	b	7,8	702,7	b	7,5
NRB109	<i>A. brasilense</i>	Hom	78,5	b	0	698,5	b	6,8
NRB021	<i>P. nitritireducens</i>	Hom	88,5	b	11,7	729,1	b	11,5
NRB041	<i>N. amazonense</i>	Hom	89,7	b	13,3	782,3	b	19,6
NRB224	<i>A. lipoferum</i>	Het	82,4	b	4,1	734,4	b	12,3
NRB043	<i>P. diazotrophicus</i>	Het	83,1	b	4,8	637	b	0
CV (%)			11,8			17,7		

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

Dados de acúmulo de biomassa e Nitrogênio referente aos 3 cortes realizados no período de abril a novembro de 2017

Legenda: Trat.: Tratamentos; Het.: Espécies heteróloga; Hom.: Espécies homólogas; Inc.: Incremento

\* % de incremento da massa seca da planta calculado em relação ao controle absoluto

\*\* % de incremento do Ntotal da planta calculado em relação ao controle absoluto

As análises individualizadas de acúmulo de massas seca e N total da parte aérea e raízes referentes aos cortes no genótipo humidícula comum estão apresentadas no anexo V. O tratamento nitrogenado apresentou os maiores acúmulos de massa seca e do N acumulado da parte aérea. Entretanto, o tratamento inoculado com a estirpe NRB041 apresentou o maior acúmulo de massa seca da parte aérea (30,3 g/vaso) no corte realizado aos 120 DAP (ANEXO V). Em relação a massa seca da raiz, somente o tratamento inoculado com a estirpe NRB085 (28,5 g/vaso) apresentou uma produção superior ao tratamento nitrogenado (24,8 g/vaso). Já em relação ao N acumulado na raiz, este efeito foi observado para os tratamentos inoculados com as estirpes NRB085 (105,5 mg N/vaso) e NRB043 (102,1 mg N/vaso). Todavia, todos os demais tratamentos não diferiram estatisticamente do tratamento nitrogenado para ambas as variáveis (ANEXO V).

### c) Llanero

Assim como observado para o genótipo Humidícula comum, o tratamento nitrogenado também apresentou os maiores acúmulos de massa seca (169,9 g/vaso) e de teor de N (951,3 mg N/vaso) na planta e, diferiu estatisticamente dos demais tratamentos (TABELA 12). Em adição, nenhum tratamento inoculado apresentou produção de massa seca e N total da planta superior ao tratamento controle absoluto (TABELA 12).

**Tabela 12.** Efeito da inoculação com bactérias diazotrófica associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de *Brachiaria humidicula* cv. Llanero cultivada em casa de vegetação.

Trat	Espécie	Origem	Massa seca		Inc (%)*		Ntotal		Inc (%)**	
			g/vaso		Controle		mg/vaso		Controle	
C/N	-	-	169,9	a	30,7		951,3	a	29	
SP245	<i>A. brasilense</i>	Het	109,6	b	0		641,8	bc	0	
S/N	-	-	129,9	b	-		737,2	b	-	
NRB085	<i>A. lipoferum</i>	Het	117,1	b	0		673,5	bc	0	
NRB214	<i>A. formosense</i>	Het	107,2	b	0		631,4	bc	0	
NRB153	<i>N. amazonense</i>	Het	122,9	b	0		649,6	bc	0	
NRB045	<i>N. amazonense</i>	Het	116,6	b	0		721,7	b	0	
NRB158	<i>N. amazonense</i>	Het	119,9	b	0		699,7	bc	0	
NRB108	<i>B. aryabhatai</i>	Het	97,2	b	0		599,3	c	0	
NRB197	<i>A. formosense</i>	Het	108,6	b	0		630,1	bc	0	
CV (%)			23,5				12			

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

Dados de acúmulo de biomassa e Nitrogênio referente aos 3 cortes realizados no período de abril a novembro de 2017

Legenda: Trat.: Tratamentos; Het.: Espécies heteróloga; Hom.: Espécies homólogas; Inc.: Incremento

\* % de incremento da massa seca da planta calculado em relação ao controle absoluto

\*\* % de incremento do Ntotal da planta calculado em relação ao controle absoluto

As análises individualizadas de acúmulo de massas seca e N total da parte aérea e raízes referentes aos cortes no genótipo Llanero estão apresentadas no anexo W. O tratamento nitrogenado proporcionou os maiores acúmulos da massa seca e do teor de N tanto da parte aérea como da raiz. Entretanto, os tratamentos inoculados com as estirpes NRB214 (12,7 g/vaso) e NRB045 (12,6 g/vaso) apresentaram acúmulos de massa seca da parte aérea superiores ao do tratamento nitrogenado (11,4 g/vaso) no primeiro corte. Já em relação ao N acumulado da parte aérea neste corte, somente o tratamento inoculado com a estirpe NRB045 (296,7 mg N/vaso) foi superior ao tratamento nitrogenado (290,5 mg N/vaso). Também foi observado que os demais tratamentos inoculados, não diferiram estatisticamente do tratamento nitrogenado (ANEXO W). No segundo corte, não foi observado diferença estatística entre os tratamentos apesar da inoculação com as estirpes NRB085, NRB153 e NRB158 apresentarem produção de massa seca da parte aérea inferiores ao tratamento nitrogenado. Por outro lado, o acúmulo de N da parte aérea mostrou que o tratamento inoculado com a estirpe NRB158 foi o único que não diferiu estatisticamente do tratamento com 100 kg N.ha<sup>-1</sup>. Em relação ao acúmulo de massa seca da raiz, foi observado que todos os tratamentos, com exceção aos inoculados com as estirpes NRB214 e NRB108, não diferiram estatisticamente do tratamento nitrogenado (ANEXO W).

#### d) H47

O maior acúmulo de massa seca e Ntotal da planta no genótipo H47 também foi observado para o tratamento nitrogenado, sendo estes valores de 127,5 g/vaso e 892,2 mg N/vaso, respectivamente. Apesar de apresentar o maior acúmulo de massa seca, o

tratamento nitrogenado não diferiu estatisticamente dos tratamentos inoculados com as estirpes Sp245, NRB085, NRB146, NRB054, NRB094 (TABELA 13). De maneira similar, a inoculação dessas estirpes (Sp245, NRB085, NRB214, NRB146, NRB054 e NRB094) promoveram maiores acúmulo de massa seca (até 21,1%) em relação ao tratamento controle. Já em relação ao Ntotal da planta, os maiores acúmulos (de 3,2% à 13,9%) foram observados para as estirpes Sp245, NRB085, NRB214, NRB054 e NRB094 em relação ao tratamento controle (TABELA 13).

**Tabela 13.** Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas associativas no acúmulo de Massa seca e N total nos tecidos da planta de *Brachiaria humidicula* cv. H47 cultivada em casa de vegetação.

Trat	Espécie	Origem	Massa seca		Ntotal		Inc (%)**	
			g/vaso	Controle	mg/vaso	Controle		
C/N	-	-	127,5	a	26,6	892,2	a	37,1
SP245	<i>A. brasilense</i>	Het	121,9	ab	21,1	705,6	bc	8,5
S/N	-	-	100,7	bc	-	650,5	bcd	-
NRB085	<i>A. lipoferum</i>	Het	117,7	ab	16,9	741,01	b	13,9
NRB214	<i>A. formosense</i>	Het	104,3	bc	3,5	671,6	bcd	3,2
NRB115	<i>N. amazonense</i>	Het	92,9	c	0	579,1	cd	0
NRB146	<i>N. amazonense</i>	Het	106,5	abc	5,8	611,6	bcd	0
NRB054	<i>N. amazonense</i>	Het	113,7	abc	12,9	709	bc	9
NRB094	<i>P. kuykendallii</i>	Het	110,2	abc	9,5	675,9	bcd	3,9
NRB140	<i>N. amazonense</i>	Het	94,9	c	0	571,2	d	0
CV (%)			14,3		13,7			

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

Dados de acúmulo de biomassa e Nitrogênio referente aos 3 cortes realizados no período de abril a novembro de 2017

Legenda: Trat.: Tratamentos; Het.: Espécies heteróloga; Hom.: Espécies homólogas; Inc.: Incremento

\* % de incremento da massa seca da planta calculado em relação ao controle absoluto

\*\* % de incremento do Ntotal da planta calculado em relação ao controle absoluto

Dentre os tratamentos com inoculação, o tratamento inoculado com a estirpe Sp245 apresentou o maior acúmulo de massa seca da planta (121,9 g/vaso) e o terceiro maior em relação ao Ntotal na planta (705,6 mg N/vaso), porém foi inferior ao tratamento inoculado com a estirpe NRB085 (741 mg N/vaso) e NRB054 (709 mg N/vaso) (TABELA 13).

As análises individualizadas de acúmulo de massas seca e N total da parte aérea e raízes referentes aos cortes no genótipo H47 estão apresentadas no anexo X. O tratamento nitrogenado proporcionou os maiores acúmulos na massa seca e do N acumulado da parte aérea. Entretanto, os tratamentos inoculados com as estirpes NRB214 (9,6 g/vaso), NRB146 (8,4 g/vaso), NRB140 (8,7 g/vaso) e Sp245 (8,7 g/vaso) apresentaram acúmulos de massa seca da parte aérea superiores ao do tratamento nitrogenado (8 g/vaso) no primeiro corte. Já em relação ao N acumulado da parte aérea este fato só foi observado para os tratamentos inoculados com as estirpes NRB214 e Sp245. No segundo e terceiro cortes o tratamento nitrogenado também apresentou os maiores acúmulos de massa seca e N acumulado da parte aérea, no entanto, o mesmo não diferiu estatisticamente dos

tratamentos inoculados com as estirpes NRB085 e NRB094 para o segundo corte (ANEXO X). No terceiro corte não foi observado diferença estatística significativa dos tratamentos inoculados em relação ao tratamento controle, porém os tratamentos inoculados com as estirpes NRB085, NRB054, NRB094 apresentaram acúmulos de massa seca de 24,6%; 23,7%; e 23,7%, e de 21,2%; 23,6%; e 17,6% no N acumulado, respectivamente, superiores ao tratamento controle.

### 3.2. Experimento em casa de vegetação II – Inoculação por aspersão foliar

A inoculação da estirpe NRB085 (promissora na avaliação do 1º corte após inoculação na semente) promoveu um acúmulo de 227 g/vaso na massa seca fresca total da parte aérea da *B. decumbens* cv. Basilisk, diferindo estatisticamente da inoculação com a estirpe Sp245 (controle positivo) e também apresentou um acúmulo de 12,2 g/vaso superior ao tratamento controle, porém não significativo (TABELA 14). No genótipo *B. brizantha* cv. Marandu também foi observado um maior acúmulo de massa fresca da parte aérea com a inoculação da estirpe NRB214 (considerada promissora para esta cultivar). Este acúmulo de 226,2 g/vaso de biomassa foi superior (16,5 g/vaso) ao tratamento controle absoluto porém menor (9,7 g/vaso) quando comparado com o tratamento inoculado com a estirpe Sp245 (TABELA 14).

**Tabela 14.** Rendimento de massa fresca, massa seca e N total na massa seca de parte aérea, de *Brachiaria decumbens* cv Basilisk e *Brachiaria brizantha* cv. Marandu inoculadas com bactérias diazotróficas via aspersão foliar - casa de vegetação

<i>Brachiaria decumbens</i> cv. Basilisk						
Tratamentos	M. Fresca		M. Seca		N Total	
	g/vaso		g/vaso		(mg de N / vaso)	
S/N	214,7	ab	72,3	ns	933,3	a
Sp245	201,3	b	67,1	ns	849,2	ab
NRB085	227,0	a	66,1	ns	795,7	b
CV (%)	5,5		7,3		9,2	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu						
Tratamentos	M. Fresca		M. Seca		N Total	
	g/vaso		g/vaso		(mg de N / vaso)	
S/N	209,7	b	68,5	ns	886,8	ns
Sp245	216,5	ab	70,1	ns	978,3	ns
NRB214	226,2	a	63,2	ns	871,8	ns
CV (%)	3,1		7,9		8,3	

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

Por outro lado, o capim Marandu não mostrou diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos tanto na variável massa seca total e acúmulo de Ntotal da parte aérea. No entanto, o tratamento inoculado com a estirpe Sp245 (controle positivo) apresentou valores superiores ao tratamento controle. No caso do capim Basilisk o tratamento controle absoluto apresentou valores superiores de massa seca e N total, porém não diferiu estatisticamente da estirpe SP245 (TABELA 14).

## 4 - DISCUSSÃO

A análise dos resultados obtidos pela inoculação das estirpes NRB085, NRB214 e Sp245 nos doze genótipos de *Brachiaria* alvos do presente estudo mostra que os genótipos responderam de forma diferenciada à inoculação dessas estirpes no Experimento de casa de vegetação I – inoculação por sementes. Por exemplo, a estirpe NRB085 proporcionou o maior acúmulo de N na planta em relação aos demais tratamentos inoculados somente nos genótipos Ipyporã e H47. Por outro lado, as estirpes NRB214 e Sp245 foram superiores no desenvolvimento dos genótipos Mulato II e Basilisk, respectivamente. Baseado nesses resultados, é plausível sugerir que a resposta à inoculação pode estar relacionada a interação do genótipo com a estirpe inoculada, sendo bastante variável entre genótipos, refletindo possivelmente a especificidade da interação planta-bactéria conforme discutido por SALA *et al.* (2005).

Dentre os doze genótipos de *Brachiaria* em estudo que incluem cinco de *B. brizantha* (Xaraés, Paiaguás, Piatã, Marandu e B140), dois de híbridos de *B. spp.* (Ipyporã e Mulato II), um de *B. decumbens* (Basilisk) e quatro de *B. humidicula* (Tupi, Comum, Llanero e H47), foi observado um acréscimo no acúmulo de massa seca da parte aérea ao longo dos cortes e em contrapartida houve uma diminuição no N total acumulado na parte aérea da planta. O decréscimo observado do N acumulado pode estar relacionado a disponibilidade do N no solo, ao avanço no estágio fisiológico (CANO *et al.*, 2004) e a maturidade das plantas (SOARES FILHO *et al.*, 2002), uma vez que as maiores mudanças que ocorrem na composição química das plantas forrageiras são aquelas que acompanham sua maturação. Bosa *et al.* (2016) também observaram uma redução do N acumulado ao longo do tempo, verificando assim uma redução nos teores de proteína bruta ao longo dos cortes realizados.

No geral, a adubação nitrogenada (100 kg de N ha<sup>-1</sup>) promoveu os maiores acúmulos de massa seca e N acumulado da planta, exceção feita ao genótipo Tupi. Diversos trabalhos desenvolvidos com o gênero *Brachiaria* mostraram elevada resposta dessas forrageiras à adubação nitrogenada (40 à 400 kg de N ha<sup>-1</sup>) em relação à produção de massa seca (ALEXANDRINO *et al.*, 2003; BATISTA E MONTEIRO, 2006; BONFIM-SILVA E MONTEIRO, 2006; CARVALHO *et al.*, 2006; YDOYAGA *et al.*, 2006; BENETT *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2008; MARTUSCELLO *et al.*, 2009).

O fracionamento na aplicação do adubo nitrogenado ao longo dos cortes também pode ter contribuído para a diferença observada, já que as estirpes não foram reinoculadas após os cortes ao longo do experimento. Uma evidência que corrobora esta hipótese, ocorreu no primeiro corte quando foi observado que pelo menos um tratamento inoculado apresentou acúmulos superiores de massa seca e N da parte aérea em relação ao tratamento nitrogenado para a maioria dos genótipos, exceção feita a *B. brizantha* cv. Piatã e *B. humidicula* cv comum.

Em todos os genótipos estudados, com exceção do Tupi, após o primeiro corte, observou-se que todos os tratamentos inoculados e a testemunha apresentaram produção inferior à adubação nitrogenada em relação a massa seca e ao N acumulado da parte aérea. Esta menor produção nesses tratamentos pode estar relacionada ao menor acúmulo de nitrogênio na fase inicial, ou seja, a planta extraiu menos nitrogênio no segundo e terceiro cortes quando comparado ao corte anterior. Como o nitrogênio é um dos nutrientes mais importantes na produção das gramíneas forrageiras, por compor compostos orgânicos essenciais, como aminoácidos e proteínas, ácidos nucléicos, hormônios e clorofila (LAVRES JUNIOR E MONTEIRO, 2003; FRANÇA *et al.*, 2007), as plantas desses

tratamentos não acompanharam a produção de biomassa e acúmulo de N do tratamento com a adubação nitrogenada.

A resposta a inoculação com microrganismos diazotróficos associativos nem sempre mostram diferenças significativas entre os tratamentos inoculados quando comparados com as aplicações de fertilizantes nitrogenados. Entretanto, alguns trabalhos com arroz (ciclo curto) têm apresentado resultados bastante promissores (FERREIRA *et al.*, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2010), corroborando assim com o resultado observado no presente estudo para o genótipo Tupi. Este genótipo foi o único em que a inoculação apresentou acúmulos de massa seca e N acumulado da planta superior ao tratamento nitrogenado. O maior acúmulo de massa seca da planta foi obtido com a inoculação da *Nitrospirillum amazonense* estirpe NRB046 enquanto que o maior acúmulo de N na planta ocorreu com a inoculação de *Bacillus safensis* estirpe NRB096 (ANEXO Y.I), ambas consideradas estirpes promissoras para este genótipo. Entretanto, a análise de somente a parte aérea da planta do capim Tupi mostrou que os maiores rendimentos de massa seca de N acumulado foram obtidos com a *B. safensis* estirpe NRB096. Esse efeito, entretanto, não foi observado no genótipo Piatã, onde esta mesma estirpe foi inoculada. É possível que este efeito seja devido a estirpe NRB096 ser homóloga em relação ao genótipo Tupi, mostrando assim uma aparente especificidade bactéria vs planta (BALDANI E DÖBEREINER, 1980). Em estudos realizados por Araujo *et al.* (2012), a inoculação de *Bacillus sp.* estirpe 6A proporcionou uma maior produção de massa seca na parte aérea na média dos cortes efetuados em *B. brizantha*. Estes resultados confirmam o potencial de promoção de crescimento de plantas por *Bacillus sp.*, uma bactéria já encontrada associada a diferentes culturas (COELHO *et al.*, 2007; ARAUJO E GUERREIRO, 2010; FIGUEIREDO *et al.*, 2010).

A aparente especificidade bactéria vs planta observada no genótipo Tupi, também foi observada nos genótipos Xaraés, Paiaguás, Marandu e Humidicula comum onde o tratamento inoculado com uma estirpe homóloga proporcionou os maiores acúmulos de massa seca e acúmulo de N da planta. Baldani *et al.* (1983), também observaram uma resposta positiva de plantas de trigo quando inoculadas com bactérias isoladas da própria cultura (denominadas homólogas).

No caso do genótipo Marandu, a estirpe *P. silvatlantica* NRB142 (homóloga), isolada de raiz não desinfestada, proporcionou o maior acúmulo de massa seca e N na planta dentre os tratamentos inoculados (ANEXO Y.D). Esta mesma estirpe foi inoculada no genótipo B140, porém, não promoveu a produção de massa seca e de N na planta superior ao tratamento controle absoluto, corroborando assim com o possível papel da especificidade na interação estirpe *versus* genótipo.

Na literatura, não há relatos de estudos de inoculação de *Paraburkholderia spp* em *Brachiaria*; no entanto, Baldani *et al.* (2000) ao avaliarem a capacidade de resposta de arroz (cultivar Guarani) à inoculação com duas estirpes de *Paraburkholderia spp.* (M130 e M209) também encontraram resultados positivos na inoculação. Foi observado uma variação de 6,9 à 27,3 % na massa seca e de 2,6 à 47 % no nitrogênio acumulado da parte aérea da planta em relação a testemunha absoluta, atribuindo-se esta variação à especificidade entre estirpes bacterianas e as cultivares utilizadas. Guimarães e colaboradores (2010) também observaram um incremento de até 42% no N acumulado da parte aérea de plantas de arroz (cultivares IR42 e IAC4440) quando inoculado com *Paraburkholderia spp* estirpe M130. Entretanto, no estudo realizado por Ferreira *et al.* (2010) com esta mesma estirpe e com os mesmos cultivares de arroz, os autores observaram que a inoculação proporcionou um incremento de 24,6% na massa seca dos

grãos e de 21,9% no Ntotal dos grãos em relação ao controle absoluto somente na cultivar IAC4440..

No genótipo Xaraés, a inoculação da *A. lipoferum* estirpe NRB224 (homóloga) isolada de solo rizosférico, proporcionou o maior acúmulo de massa seca e N acumulado na planta dentre os tratamentos inoculados (ANEXO Y.A), sugerindo a estirpe como promissora para este genótipo. Já no capim Paiaguás, a estirpe *Phytobacter diazotrophicus* NRB043 proporcionou o maior acúmulo de massa seca na planta, enquanto que a inoculação da estirpe *A. melinis* NRB103 proporcionou o maior acúmulo de N na planta dentre os tratamentos inoculados (ANEXO Y.B). O genótipo Humidícula comum também apresentou essa aparente interação específica entre genótipo vs a estirpe NRB041 (*N. amazonense*) que proporcionou o maior acúmulo de massa seca e N acumulado na planta dentre os tratamentos inoculados (ANEXO Y.J). Nos demais genótipos (Piatã, B140, Ipyporã, Mulato II, Basilisk, Llanero e H47) não foi observado uma aparente interação específica bactéria vs planta, uma vez que os melhores acúmulos de massa seca e acúmulo de N da planta foram obtidos com estirpes isoladas de outro genótipo, denominadas de estirpes heterólogas conforme sugerido por Baldani e Döbereiner (1980). No genótipo Piatã, a inoculação da *A. brasilense* estirpe NRB200 (heteróloga), isolada de solo rizosférico do genótipo Basilisk, proporcionou o maior acúmulo de massa seca e N acumulado na planta dentre os tratamentos inoculados (ANEXO Y.C). No genótipo Llanero, as estirpes NRB153 e NRB045 de *N. amazonense* proporcionaram os maiores acúmulos de massa seca e N acumulado na planta, respectivamente, dentre os tratamentos inoculados (ANEXO Y.K).

No caso do híbrido Ipyporã como da *B. humidicula* H47, a inoculação da *A. lipoferum* estirpe NRB085 (heteróloga), isolada de raiz não desinfestada do capim Humidícula comum, proporcionou o maior acúmulo de massa seca e N dentre os tratamentos inoculados (ANEXO Y.F e ANEXO Y.L). Da mesma forma, no genótipo B140 foi uma estirpe heteróloga de *A. lipoferum* que apresentou os maiores acúmulos de massa seca e N na planta (ANEXO Y.E). No capim Mulato II, o maior rendimento de massa seca da planta dentre os tratamentos inoculados também foi obtido por uma estirpe de *A. lipoferum*, a NRB098 (heteróloga) enquanto que em relação ao acúmulo de Ntotal da planta, a *A. formosense* estirpe NRB214, também heteróloga, foi a que proporcionou o maior acúmulo (ANEXO Y.G). A inoculação de *A. formosense* estirpe NRB214, também proporcionou o maior acúmulo de massa seca e N acumulado na planta de *B. decumbens* cv. Basilisk (ANEXO Y.H).

Os resultados observados no presente estudo, destacam o potencial do gênero *Azospirillum* e *Nitrospirillum* no crescimento vegetal. Este potencial também foi observado por Oliveira *et al.* (2007), que mostraram que a inoculação com *A. brasilense* estirpe AZO39 promoveu um acúmulo de matéria seca anual de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu superior ao tratamento não inoculado e não adubado com nitrogênio. Os autores observaram que a inoculação proporcionou um aumento prolongado na área de pastejo com o aumento do perfilhamento nos estágios iniciais da forrageira, sem necessidade de recorrer a altas taxas de fertilizantes nitrogenados. Brasil e colaboradores (2005) também observaram aumento na produção de massa seca, principalmente do sistema radicular, de plantas de *B. humidicula* (capim Braquiária) inoculadas tanto com uma mistura (*A. brasilense*, *A. lipoferum* e *N. amazonense*) ou somente com a estirpe *N. amazonense* em relação aos tratamentos não inoculados nas coletas realizadas aos 60 e 90 dias após o plantio em experimento realizado em casa-de-vegetação. No entanto, os autores observaram que a inoculação com a mistura de bactérias apresentou os maiores rendimentos.

Guimarães *et al.* (2011) ao avaliarem o efeito da inoculação de estirpes de *Azospirillum spp.* no capim Marandu, observaram que a adubação nitrogenada foi o tratamento que mais se destacou no parâmetro número de folhas. Por outro lado, quando os tratamentos de inoculação foram comparados à testemunha absoluta, observou-se que a estirpe AZ04 proporcionou um aumento de 8% no número de folhas, e de até 7% no número de perfilhos.

Mais recentemente, Hungria *et al.* (2016) avaliaram a produção de biomassa das forrageiras *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *B. ruziziensis* cv. comum inoculadas com o produto comercial *A. brasilense* estirpes Ab-v5 e Ab-v6 em três locais diferentes. Os autores não observaram uma diferença estatística na produção de biomassa entre o tratamento nitrogenado e o tratamento sem adição de N-fertilizante. Em contraste, a inoculação em associação com a adubação nitrogenada (40 kg de N ha<sup>-1</sup>) proporcionou um aumento na produção de 24,7%, 29,6% e 24,5% em *B. brizantha*, e de 23,3%, 13,0% e 17,4% em *B. ruziziensis* cultivadas na região de Londrina, Ponta Grossa e Três Lagoas, respectivamente, quando comparado ao tratamento controle absoluto. Em *B. decumbens* a inoculação das sementes com o mesmo produto comercial também contribuiu de forma positiva no desenvolvimento e produção da forrageira, com aumento na altura de plantas, número de perfilhos, produção de matéria seca da parte aérea e matéria seca de raiz quando associado com nitrogênio até a dose de 100 kg de N ha<sup>-1</sup> (FERNANDES, 2016). Já Gomes (2017) ao avaliar a produção de biomassa de 14 genótipos das forrageiras *Brachiaria brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruziziensis*, *B. humidicula* e híbridos de *Brachiaria spp.* observou que a inoculação de *A. brasilense* estirpe Sp245 proporcionou um aumento de biomassa de alguns genótipos, sendo de até 14% na *B. brizantha* e na *B. humidicula* e de até 26 % nos híbridos de *B. spp* em relação ao tratamento controle.

Em revisão realizada na década de 90, Okon e Labandera-Gonzales (1994) relataram um aumento na massa seca em *Penisetum americanum*, *P. purpureum*, *Panicum maximum* e *Digitaria decumbens* quando inoculado com a bactéria diazotrófica *A. brasilense* estirpe Cd. Bouton e Zuberer (1979) também observaram que a inoculação de *Panicum maximum* com *A. brasilense* (estirpe 13t) promoveu uma maior quantidade de massa seca (4,2 g planta<sup>-1</sup>) em relação ao tratamento controle (3,0 g planta<sup>-1</sup>). Amaral (2017) ao avaliar o efeito da inoculação de *A. brasilense* (Sp245) em *Paspalum regnellii*, *P. atratum* cv. Pojuca e *P. malacophyllum* observou que a inoculação desta estirpe só proporcionou um incremento de biomassa no genótipo *Paspalum regnellii* em relação ao tratamento controle.

Ficagna e Gai (2012) avaliaram o uso de diferentes doses de inoculação com *A. brasilense* em pastagens de Tifton 85 (*Cynodon spp.*) submetidos a diferentes épocas de corte. Os autores observaram que não houve diferença significativa no acúmulo de massa seca das plantas inoculadas em relação ao tratamento nitrogenado, sugerindo que o uso da bactéria pode ser uma alternativa para a substituição do fertilizante nitrogenado em busca de redução dos custos.

Além dos resultados promissores observados com a inoculação do gênero *Azospirillum* em pastagens, a inoculação com bactérias deste gênero tem promovido resultados positivos em gramíneas produtoras de grãos. Por exemplo em cultivares arroz, foi observado que o tratamento inoculado com *A. brasilense* estirpes Abv5 e Abv6 proporcionou um incremento de até 22% nos grãos em relação ao controle absoluto (FERREIRA *et al.* 2015; RODRIGUES *et al.*, 2015; GARCIA *et al.*, 2016). Já a inoculação dessas estirpes em cultivares de milho proporcionou um incremento de até 30% na produtividade e de até 20% na massa seca em relação ao controle absoluto (Hungria *et al.*, 2010; Braccini *et al.*, 2012); MAZZUCHELLI *et al.*, 2014; MUMBACH

*et al.*, 2017). Para a cultura do trigo, a inoculação com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 resultou no incremento da produtividade de até 31% e de até 49,5% na massa seca em comparação com o controle (HUNGRIA *et al.*, 2010; FUKAMI *et al.*, 2016; MUMBACH *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos no Experimento em casa de vegetação II (Inoculação por aspersão foliar) mostraram que a inoculação por aspersão foliar não foi muito eficiente para ambos os genótipos. O genótipo Marandu inoculado na semente com a estirpe NRB214 apresentou acúmulos superiores de massa seca e N da parte aérea do que o tratamento controle enquanto que inoculação por aspersão foliar desta estirpe promoveu redução de biomassa e N em relação ao controle absoluto. Assim como no presente estudo, Galindo *et al.* (2015) observaram que a inoculação via foliar com *Azospirillum brasilense* não afetou a altura de planta, comprimento de espiga, números de espiguetas por espiga e de grãos chochos, massa de 100 grãos, número de espigas por metro e a produtividade de grãos de trigo irrigado. Já no estudo realizado com híbridos de milho foi observado que a inoculação de *A. brasiliense* estirpe Abv5 por aspersão foliar apresentou incremento de 36 % na produção de grãos em relação ao controle, porém a inoculação desta estirpe na semente obteve um maior incremento (42%) (MARTINS *et al.*, 2012). O estudo comparativo realizado por Costa *et al.* (2015) de inoculação com *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6) via sementes e aspersão foliar na cultura de milho híbrido 30S31 (Pioneer) cultivado no Cerrado mostrou que a inoculação via semente promoveu uma maior produção de massa seca do colmo e da raiz, altura de inserção da espiga, peso de mil grãos e produtividade de grãos em relação a inoculação via aspersão foliar. Baseado nesses resultados e no presente estudo é possível afirmar que a inoculação via semente é mais eficiente do que a inoculação via aspersão foliar. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados com estas estirpes e genótipos visando avaliar o efeito de doses de inoculo, épocas de aplicação, etc.

É possível que muitos dos efeitos observados por essas bactérias diazotróficas nas forrageiras, gramíneas produtoras de grãos e nos genótipos de *Brachiaria* do presente estudo sejam atribuídos às atividades funcionais das estirpes tais como à produção, pela bactéria, de sideróforos, de fitormônios, solubilização de fosfato inorgânico e óxido de zinco, capacidade celulolítica, e ao processo de fixação biológica de N conforme citado por diversos autores (CAVALLET *et al.*, 2000; VERMA *et al.*, 2001; VESSEY, 2003; PEDRAZA, *et al.*, 2004; REIS JUNIOR *et al.*, 2004; PEDRINHO *et al.*, 2010; VIDEIRA *et al.*, 2012; ESTRADA *et al.*, 2013; JI *et al.*, 2014).

Um resumo das capacidades funcionais da estirpe com melhor desempenho em associação com cada genótipo de *Brachiaria* é apresentado na TABELA 15. Todas estas estirpes consideradas promissoras apresentaram tanto a capacidade de produção de sideróforos como a capacidade celulolítica, exceto as estirpes NRB043, NRB200, NRB142, NRB153 e NRB045 que apresentaram somente uma delas (TABELA 15). Bactérias com estas capacidades podem beneficiar seu hospedeiro impedindo a proliferação de patógenos ao redor das raízes, por meio da captação de ferro no ambiente rizosférico (VESSEY, 2003) ou pela degradação das células da parede celular com a ação de enzimas tais como  $\beta$ -1,4 glucanases, levando a lise da parede celular e consequentemente a morte do patógeno (DOBBELAERE *et al.*, 2003). Além destas duas capacidades funcionais, as estirpes NRB085, NRB214 e NRB088 também apresentaram as capacidades de solubilização de fosfato inorgânico e óxido de zinco. A estirpe NRB043 também apresentou estas duas capacidades funcionais, já as estirpes NRB224, NRB103

**Tabela 15.** Características funcionais das estirpes diazotróficas isoladas que apresentaram a melhor interação com os genótipos na produção de massa seca total da planta e N total acumulado na planta em experimento conduzido em casa de vegetação e, o percentual de incremento em relação ao tratamento controle absoluto.

Genótipo	Estirpe	Origem	Similaridade do 16S rRNA com as espécies do GenBank	Capacidade funcional						(% ) Incremento em relação ao Controle	
				Sid	Pi	Zn	CMC	AIA	<i>nifH</i>	Massa seca	N total
Xaraés	NRB224	Homóloga	<i>Azospirillum lipoferum</i>	+	+	-	+	-	+	15,3	37,8
Paiaguás	NRB043	Homóloga	<i>Phytobacter diazotrophicus</i>	+	+	+	-	-	+	8,5	-
	NRB103	Homóloga	<i>Azospirillum melinis</i>	+	+	-	+	+	+	-	4,7
Piatã	NRB200	Heteróloga	<i>Azospirillum brasilense</i>	-	-	-	+	-	+	0	0
Marandu	NRB142	Homóloga	<i>Paraburkholderia silvatlantica</i>	+	+	-	-	-	+	7,1	20,6
B140	NRB088	Heteróloga	<i>Azospirillum lipoferum</i>	+	+	+	+	+	+	76,9	54,3
Ipyporã	NRB085	Heteróloga	<i>Azospirillum lipoferum</i>	+	+	+	+	+	+	23,5	22,7
Mulato II	NRB098	Heteróloga	<i>Azospirillum lipoferum</i>	+	+	-	+	-	+	2,8	-
	NRB214	Heteróloga	<i>Azospirillum formosense</i>	+	+	+	+	-	+	-	13,6
Basilisk	NRB214	Heteróloga	<i>Azospirillum formosense</i>	+	+	+	+	-	+	9,4	9,4
Tupi	NRB046	Heteróloga	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	+	-	-	+	-	+	13,2	-
	NRB096	Homóloga	<i>Bacillus safensis</i>	+	-	+	+	-	+	-	11,9
H. comum	NRB041	Homóloga	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	+	-	-	+	-	+	13,3	19,6
Llanero	NRB153	Heteróloga	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	+	-	-	-	-	+	-5,4	-
	NRB045	Heteróloga	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	+	-	+	-	-	+	-	-2,1
H47	NRB085	Heteróloga	<i>Azospirillum lipoferum</i>	+	+	+	+	+	+	16,9	13,9

(+) positivo e (-) negativo para as características funcionais.

e NRB153 só possuem a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico, e as estirpes NRB096 e NRB045 somente solubilizam óxido de zinco.

Levando em consideração que o fósforo e o zinco são alguns dos nutrientes mais limitantes do crescimento vegetal, e que em solos tropicais a sua disponibilidade é muito baixa (SOUCHIE *et al.*, 2007), e grande parte do fósforo e zinco aplicados no solo por meio de fertilizantes, acabam se tornando indisponíveis para as plantas, por serem rapidamente imobilizados por íons de ferro e alumínio em solos ácidos e por íons de cálcio em solos alcalinos (MOREIRA *et al.*, 2010), estirpes bacterianas com estas capacidades se tornam interessantes para composição de um inoculante

Em relação a produção de ácido indol acético (AIA), somente as estirpes promissoras NRB085, NRB088 e NRB103 apresentaram esta capacidade (TABELA 15). Já é sabido que estirpes capazes de produzir AIA podem promover o crescimento vegetal aumentando o comprimento das raízes, número de pêlos radiculares, proliferação das raízes secundárias, e também estimulam a germinação das sementes (GLICK, 2012). Além disso, tem papel importante no controle de doenças (KAZAN E MANNERS 2009; TIAN *et al.*, 2017), uma vez que as auxinas podem atuar na sinalização do processo de defesa da planta (SHIGENAGA E ARGUESO, 2016).

A análise dos ganhos obtidos para algumas estirpes consideradas promissoras para cada genótipo de *Brachiaria* em relação ao controle absoluto mostrou valores de até 76,9 % no acúmulo de massa seca e de até 54,3 % no N acumulado nos tecidos da planta (TABELA 15). Esses valores % correspondem a uma dose aproximada equivalente a 70 kg N ha<sup>-1</sup> quando estimados em relação ao tratamento nitrogenado (100 kg N ha<sup>-1</sup>). Estes valores são superiores aos encontrados por Hungria *et al.* (2016), onde a inoculação junto com a adubação nitrogenada (40 kg N ha<sup>-1</sup>) proporcionou um ganho de até 29,6 % na massa seca e de até 15,9% de N acumulado em relação ao controle absoluto. Estes autores, sugerem ainda, que o tratamento com inoculação pode substituir uma dose de 40 kg N ha<sup>-1</sup>. É importante lembrar que os valores estimados acima são baseados em experimento realizado em casa-de-vegetação cujas condições de manejo são bem mais controladas do que a campo. Por outro lado, foi observado genótipos que não apresentaram resposta a inoculação para algumas estirpes seja no acúmulo de biomassa ou de N total. Reis Junior *et al.* (2008) também observaram efeito negativo da inoculação de *N. amazonense* estirpe LIV 205 em dois híbridos de milho.

Apesar de não ter sido avaliado a contribuição da FBN devido a inoculação no presente estudo, sabe-se que naturalmente esta taxa varia de 15–25 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de N nas pastagens de gramíneas (BODDEY e VICTORIA, 1986; MIRANDA *et al.*, 1990). Apesar de ser considerada baixa, é de suma importância, uma vez que uma unidade animal de um bovino (450 kg peso vivo) acumula em média 10 kg N, e dependendo do manejo empregado na pastagem, é possível que a quantidade de N fixada seja suficiente, inclusive para repor as perdas de N das excretas dos animais, aumentando a longevidade do sistema produtivo, desde que seja feita a reposição dos outros nutrientes, como P e K (URQUIAGA *et al.*, 2010). Portanto, os incrementos observados acima para alguns genótipos podem suprir parte do N necessário para manter a longevidade das pastagens e a produção bovina.

Em resumo, os resultados sugerem que a utilização de inoculantes contendo essas bactérias pode ser uma alternativa na redução do fertilizante nitrogenado na busca de diminuição dos custos em pastagens com *Brachiaria*. Além disso, é uma tecnologia limpa, que contribui para a sustentabilidade das atividades agropecuárias no Brasil, sem comprometer o meio ambiente e consequentemente ajudará o país a atingir seus

compromissos mundiais na redução de emissão de gases de efeito estufa e as mudanças climáticas globais conforme assumido na COP15 (PLANO, A. B. C.; 2012).

## 5 - CONCLUSÃO

Alguns genótipos de *Brachiaria* estudados apresentaram resposta positiva a inoculação com as bactérias diazotróficas em relação ao controle absoluto;

Todos os genótipos adubados com N mineral apresentaram rendimento de produção de biomassa e N total superiores aos tratamentos inoculados, exceto o genótipo Tupi.

A *B. brizantha* cv B140 foi a que apresentou o maior acúmulo de massa seca e Ntotal da planta quando inoculada com *Azospirillum lipoferum* estirpe NRB088 em relação ao controle absoluto.

A inoculação com estirpes consideradas homólogas (isoladas do próprio genótipo de *Brachiaria*), proporcionou um acúmulo de massa seca e Ntotal da planta superior ao do tratamento inoculado com a estirpe controle Sp245, exceção feita aos genótipos *B. decumbens* cv Basilisk e *B. humidicula* cv H47.

Foi observada uma aparente especificidade na interação planta-bactéria nos genótipos Tupi, Humidicula comum, Xaraés, Paiaguás e Marandu.

A inoculação via foliar da estirpe NRB085 no genótipo Basilisk e da estirpe NRB214 no genótipo Marandu não foram eficientes

A inoculação de bactérias diazotróficas em genótipos de *Brachiaria*, podem ser apontadas como uma alternativa sustentável e economicamente viável para a substituição parcial das adubações nitrogenadas.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIEC 2018- Associação Brasileira da Indústria Exportadora de Carnes. Exportações de carne bovina do Brasil. Disponível em: <http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>. Acesso em: 27 jul. 2018.
- ALEXANDRINO, E. et al. Produção de massa seca e vigor de rebrotação de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu submetida a diferentes doses de nitrogênio e frequência de cortes. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 2, p. 141-147, 2003.
- ALVES, B. J. R. et al. Biological nitrogen fixation by two tropical forage legumes assessed from relative ureide abundance of stem solutes <sup>15</sup>N calibration of the technique in sand culture. **Nutr. Cycl. Agroecosys.**, v. 56, p. 165-176, 2000.
- AMARAL, M. B. **Isolamento, caracterização e seleção de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal em genótipos de *Paspalum***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2017.
- ARAÚJO, F.F.; GUERREIRO, R. T. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, p.837-844, 2010.
- ARAÚJO, F. F.; GUABERTO, L. M.; SILVA, I. F. Bioprospection of plant growth promoter rhizobacteria in *Brachiaria brizantha*. **Rev. Bras. Zootec.** v.41, p. 521–527, 2012.
- BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum spp.* **Soil Biol. Bioch.**, v.12, p.433-439, 1980
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 284-299, 1983.
- BALDANI, V.L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia spp.* **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, n. 5-6, p. 485-491, 2000.
- BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 36, n. 9, p. 591-608, 1990.
- BATISTA, K. E; MONTEIRO, F. A. Respostas morfológicas e produtivas do capim marandu adubado com doses combinadas de nitrogênio e enxofre. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1281-1288, 2006.
- BENNETT, C. G. S. et al. Produtividade e composição bromatológica do capim-marandú a fontes e doses de nitrogênio. **Ciência e agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1629-1636, 2008
- BODDEY, R. M. et al. Potential of carbon sequestration in soils of the Atlantic Forest region of Brazil. **Carbon Sequestration in Soil of Latin America**. (Eds R. Lal, CC Cerri, M. Bernoux, J. Etchevers, and E. Cerri.) pp, p. 305-348, 2006.
- BODDEY, R. M.; VICTORIA, R. L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using <sup>15</sup>N – labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**, v. 90, p. 265-292, 1986.
- BODDEY, R. M. et al. Brazilian agriculture: the transition to sustainability. **Journal of Crop Production**, v. 9, p. 593-621, 2003.
- BONFIM-SILVA, E. M.; MONTEIRO, F. A. Nitrogênio e enxofre em características produtivas do capim-braquiária proveniente de área de pastagem em degradação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1289-1297, 2006.

- BONFIM-SILVA, E. M.; MONTEIRO, F. A.; SILVA, T. J. A. Nitrogênio e enxofre na produção e no uso de água pelo capim-braquiária em degradação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.309-317, 2007
- BOSA, C. K. et al. Características produtivas e nutricionais do capim-xaraés inoculado com bactérias diazotróficas associativas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 68, n. 5, p.1360-1368, 2016.
- BOUTON, J. H.; ZUBERER, D. A. Response of *Panicum maximum* Jacq. to inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v. 52, n. 1, p. 585–590, 1979.
- BRACCINI, L. A. et al. Seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, associate with the use of bioregulators in maize. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 2, p. 58-64, 2012.
- 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.
- BRAZ, S. P. et al. Soil carbon stocks under productive and degraded Brachiaria pastures in the Brazilian Cerrado. **Soil Science Society of America Journal**, v. 77, n. 3, p. 914-928, 2013.
- CANO, C. C. P. et al. Valor nutritivo do capim-Tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia-1) pastejado em diferentes alturas. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.33, n.2, p.1959-1968, 2004.
- CAVALLET, L. E. et al. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum spp*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, p. 129-132, 2000.
- CARVALHO, F. G. et al. Produção de matéria seca e concentração de macronutrientes em “*Brachiaria decumbens*” sob diferentes sistemas de manejo na zona da mata de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 36, n. 2, p. 101-106, 2006.
- COELHO, L. F. et al. Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus spp*. com a rizosfera de diferentes plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1413-1420, 2007.
- COSTA, R. R. G. F et al. Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of secondharvest maize. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 3, p. 304-311. 2015.
- CUNHA, F. N. et al. Efeito da *Azospirillum brasilense* na produtividade de milho no Sudoeste Goiano. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo (Online)**, v. 13, p. 261-272, 2014.
- DIAS-FILHO, M. B. **Degradação de pastagens: processos, causas e estratégias de recuperação**. Embrapa Amazônia Oriental, 2011.
- 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.
- DOBEREINER, J.; DUQUE, F.F. Contribuição da pesquisa em FBN para o desenvolvimento do Brasil. **Revista de Economia Rural**, v. 18, n. 3, p. 447-460, 1980.
- ESTRADA, G. A. et al. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and soil**, v. 369, n.1-2, p.115-129, 2013.
- FAGUNDES, J. L. et al. Avaliações das características estruturais do capim-braquiária em pastagens adubadas com nitrogênio nas quatro estações do ano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.1, p.30-37, 2006.
- FERNANDES, J. S. ***Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada na *Brachiaria decumbens***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Grande Dourados, 2016.

FERREIRA, J. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 1, p. 179-185, 2010.

FICAGNA, T.; GAI, T. Adubação nitrogenada e inoculante de gramínea em tifton 85. **Cultivando o Saber**, v. 5, n. 2, p.113-119, 2012.

FIGUEIREDO, M. V. B. et al. Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. In: MAHESHWARI, D.K. (Ed.) **Plant growth and health promoting bacteria**.1.ed. Berlin: Springer-Verlag. v.18, p.45-68, 2010.

FRANÇA, A. F. S. et al. Parâmetros nutricionais do capim-tanzânia sob doses crescentes de nitrogênio em diferentes idades de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 4, p. 695-703, 2007.

FUKAMI, J. et al. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, p. 1-13, 2016.

GALINDO, F. S et al. Épocas de inoculação com *Azospirillum brasilense* via foliar afetando a produtividade da cultura do trigo irrigado. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 9, p. 43-48, 2015.

GARCIA, N. F. S. et al. Doses and application methods of *Azospirillum brasilense* in irrigated upland rice. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 11, p. 990-995, 2016.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012.

GOMES, L. B. E. **Inoculação da estirpe Sp245 de *Azospirillum brasilense* em diferentes genótipos de *Brachiaria***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2017.

GUIMARÃES, S. L. et al. Produção de capim-marandu inoculado com *Azospirillum spp.* **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia**, v. 7, n. 13, p. 819-825, 2011.

GUIMARÃES, S. L. et al. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em cultivares de arroz. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 4, p. 32-39, 2010.

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p. 413-425, 2010.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Inoculation of *Brachiaria spp.* with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: an environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 221, p. 125-131, 2016.

JI, S. H.; GURURANI, M. A.; CHUN, S. C. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiol Res**, v.169, n.1, p.83-98, 2014.

KAZAN, K.; MANNERS, J. M. Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. **Trends in plant science**, v. 14, n. 7, p. 373-382, 2009.

LAVRES JUNIOR, J.; MONTEIRO, F. A. Diagnose nutricional de nitrogênio no capim aruana em condições controladas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n.5, p.829-837, 2006.

LIMA, E. S.; DEMINICIS, B. B. Produção e composição química de cultivares de capim-elefante. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 2, n. 14, 2008.

MARTUSCELLO, J. A. et al. Adubação nitrogenada e participação de massa em plantas de *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés e *Panicum maximim* x *Panicum infestum* cv. Massai. **Ciênc. Agrotec.**, v.33, p.663-667, 2009.

- MAZZUCHELLI, R. C. L.; SOSSAI, B. F.; ARAUJO, F. F. Inoculação de *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Colloquium Agrariae**, v. 10, n.2, p.40-47, 2014.
- MIRANDA, C. H. B.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Selection of ecotypes of *Panicum maximum* for associated biological nitrogen fixation using the <sup>15</sup>N isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 22, p. 657-663, 1990.
- MOREIRA, F. M. de S. *et al.* Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74, 2010.
- MUMBACH, G. L. *et al.* Resposta da inoculação com *Azospirillum brasilense* nas culturas de trigo e de milho safrinha. **Scientia Agraria**, v. 18, n. 2, p. 97-103, 2017.
- NGUYEN, H. T. *et al.* The positive yield response of field-grown rice to inoculation with a multi-strain biofertiliser in the Hanoi Area, Vietnam. **Symbiosis**, v. 35, p. 231-245, 2003.
- NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. **Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos**. EMBRAPA-CPPSE, 2005.
- OLIVEIRA, O. C. *et al.* **A baixa disponibilidade de nutrientes do solo como uma causa potencial da degradação de pastagens no cerrado brasileiro**. SOBRADE/UFV/DPS/DEF, 1997.
- OLIVEIRA, P. P. A.; OLIVEIRA, W. S.; BARIONI, W. J.; Produção de forragem e qualidade de *B. brizantha* cv. Marandu com *Azospirillum brasilense* e fertilizada com nitrogênio. **Embrapa Pecuária Sudeste-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2007.
- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biol. Biochem**, v. 12, n. 26, p. 1591-1601, 1994.
- PEDRAZA, R. O. *et al.* Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic production by associative nitrogenfixing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**. v.233, p.15-21, 2004.
- PEDRINHO, E. A. N. *et al.* Identification and evaluation of bacteria isolated from roots of maize. **Bragantia**, v.69, p.905–911, 2010.
- PICCININ, G. G. *et al.* Yield and agronomic performance of wheat in management with *Azospirillum brasilense*. **Revista Agrarian**, v.6, n.22, p.393-401, 2013.
- PLANO, A. B. C. Plano Setorial de Mitigação e de Adaptação às Mudanças Climáticas para a Consolidação de uma Economia de Baixa Emissão de Carbono na Agricultura. 2012.
- QUADROS, P. D. *et al.* Field agronomic performance of maize hybrids inoculated with *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 209-218, 2014.
- REIS JUNIOR, F. B. *et al.* Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 32, n. 3, 2008.
- REIS JUNIOR, F. B. *et al.* Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria spp.*, em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, n. 1, p.103-113, 2004.
- REIS, V.M. Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas. **Embrapa Agrobiologia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2007.
- REIS, V. M.; PEREIRA, W.; HIPÓLITO, G. de S. Métodos de inoculação de bactérias diazotróficas em cana-planta para avaliação de eficiência agrônômica. **Embrapa Agrobiologia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2009.

RODRIGUES, M. et al. Inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada em cultivares de arroz de terras altas irrigados por spersão. **Enciclopédia Biosfera**, v.11, p.1234-1241, 2015

RODRIGUES, R. C. et al. Produção de massa seca, relação folha/colmo e alguns índices de crescimento do *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés cultivado com a combinação de doses de nitrogênio e potássio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.394-400, 2008.

SALA, V. M. R. et al. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.6, p.833-842. 2007.

SALA, V. M. R. et al. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 3 p. 345-352, 2005.

SHIGENAGA, A. M.; ARGUESO, C. T. No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2016. p. 174-189.

SILVA, L. L. G. G. et al. Fixação biológica de nitrogênio em pastagens com diferentes intensidades de corte. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, p. 21-30, 2010.

SILVA, V. N. et al. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, p. 16-21, 2007.

SOARES FILHO, C. V.; RODRIGUES, L. R. A.; PERRI, S. H. V. Produção e valor nutritivo de dez gramíneas forrageiras na região noroeste do estado de São Paulo. **Acta Sci.**, v.24, p.1377-1384, 2002.

SOUCHIE, E. L.; DE SOUZA ABBOUD, A. C.; CAPRONI, A. L.. Solubilização de fosfato in vitro por microorganismos rizosféricos de guandu. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 2, 2007.

TIAN, B. et al. Beneficial traits of bacterial endophytes belonging to the core communities of the tomato root microbiome. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 247, p. 149-156, 2017.

URQUIAGA S.; JANTAGLIA, C. P.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Variações nos estoques de carbono e emissão de gases de efeito estufa em solos das regiões tropicais e subtropicais do Brasil: uma análise crítica. **Informações Agronômicas**, v. 130, p. 12-21, 2010.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **J.Biotechnol**, v. 91, p. 127-141, 2001.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

VIDEIRA, S. S. et al. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant Soil**. n.356, p.51-66, 2012.

ZANETTI, J. B. **Identificação de Genótipos de Capim-Elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.) de Alta Produção de Biomassa com Qualidade para Fins Energéticos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2010.

YATES, R. J. et al. Root – nodule bacterian from indigenous legumes in the north-west of Western Australia and their interaction with exotic legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 8, p. 1319-1329, 2004.

YDOYAGA, D. F. et al. Métodos de recuperação de pastagens *Brachiaria decumbens* Stapf. no Agreste Pernambucano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 69-70, 2006.

# ANEXOS

**Anexo A. Solução salina para diluição seriada**

---

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	sol.10% .....	1ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	sol.10% .....	0,5ml
NaCl.....	sol.10% .....	0,5ml
FeEDTA.....	sol.1,64% .....	1ml
Sol. de micronutrientes para meio de cultura.....		0,5ml
Ajustar o pH para 6,5 com solução de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 5 %, Completar para 1000ml com água destilada		

---

**Anexo B. Meio NFB**

---

Ácido Málico.....	5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....sol.10%.....	5ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....sol.10%.....	2ml
NaCl.....sol.10%.....	1ml
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....sol.1%.....	2ml
Azul de bromotimol sol. 0,5% em 0,2N de KOH.....	2ml
FeEDTA.....sol.1,64%.....	4ml
Sol. de micronutrientes para meio de cultura.....	2ml
Vitamina para meio de cultura.....	1ml
KOH.....	4,5g
Extrato de levedura (p/ meio sólido).....	50mg

Ajustar o pH para 6,5;

Completar para 1000ml com água destilada;

Adicionar o Agar:

Meio sólido.....15g/L

Meio semi-sólido.....1,5g/L

---

### Anexo C. Meio LGI

---

Açúcar cristal.....	5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....sol.10%.....	2ml
KHPO <sub>4</sub> .....sol.10%.....	6ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....sol.10%.....	2ml
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....sol.1%.....	2ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....sol.0,1%.....	2ml
Azul de bromotimol sol. 0,5% em 0,2N de KOH.....	5ml
FeEDTA.....sol.1,64%.....	4ml
Vitamina para meio de cultura.....	1ml
Extrato de levedura (p/ meio sólido).....	20mg

Ajustar o pH para 6,0 – 6,2 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sol.5%;

Completar para 1000ml com água destilada;

Adicionar o Agar:

Meio sólido.....15g/L

Meio semi-sólido.....1,5g/L

---

#### **Anexo D. Meio Batata**

---

Batata cozida .....200g

Ácido Málico.....2,5g

Açúcar cristal.....2,5g

Sol. de micronutrientes para meio de cultura.....2ml

Vitamina para meio de cultura.....1ml

Pesar os 200 g de batata e cozinhar em água destilada durante 30 minutos.

Paralelamente o açúcar cristal, o micronutriente e a vitamina em 50 ml de água destilada

com 2 gotas de azul de bromotimol sol. 0,5% em 0,2 N de KOH. Filtrar a batata em

algodão e juntar a solução preparada anteriormente ao filtrado. Completar o volume

para 1000 ml. Adicionar e ajustar o pH com ácido acético até atingir pH 5,5.

Adicionar 15g L<sup>-1</sup> de agar para sólido.

---

**Anexo E.** Análise de similaridade de isolados de *Brachiaria* baseado no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Isolado	Cultivar	Tecido	16S rDNA (maior % sim.)	Acesso	% sim
NRB001	X009	SR	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	99
NRB002	X009	SR	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	99
NRB003	X009	SR	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	99
NRB004	X009	RND	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	99
NRB005	X009	RND	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	99
NRB006	X009	RND	<i>Rhizobium pusense</i>	NR_116874.1	99
NRB007	X009	RND	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	NR_118008.1	99
NRB008	H31	RND	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	NR_118008.1	99
NRB009	X009	RND	<i>Rhizobium pusense</i>	NR_116874.1	99
NRB010	X009	RND	<i>Rhizobium pusense</i>	NR_116874.1	99
NRB011	X009	RND	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	98
NRB012	X009	RD	<i>Rhizobium pusense</i>	NR_116874.1	99
NRB013	D24/27	RND	<i>Stenotrophomonas panacihumi</i>	NR_117406.1	99
NRB014	A-2	RND	<i>Kosakonia sacchari</i>	NR_118333.1	99
NRB015	D24/45	SR	<i>Pseudomonas knackmussii</i>	NR_121733.1	99
NRB016	A-2	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB017	D24/45	SR	<i>Rhizobium pusense</i>	NR_116874.1	99
NRB018	D24/45	SR	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	99
NRB019	X009	RND	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	98
NRB020	X009	SR	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	99
NRB021	Humid. Comum	SR	<i>Pseudomonas nitritireducens</i>	NR_113601.1	99
NRB022	D24/27	RND	<i>Azospirillum melinis</i>	NR_043483.1	98
NRB023	D24/27	RD	<i>Rhizobium pusense</i>	NR_116874.1	99
NRB024	D24/27	SR	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_117481.1	99

NRB025	A-2	SR	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_117481.1	99
NRB026	Humid. Comum	SR	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_117481.1	98
NRB027	Humid. Comum	RND	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_116846.1	98
NRB028	B001	SR	<i>Bacillus aerius</i>	NR_118439.1	99
NRB029	D24/27	SR	<i>Bacillus aerius</i>	NR_118439.1	99
NRB030	X009	SR	<i>Bacillus aerius</i>	NR_118439.1	99
NRB031	Ipyporã	RND	<i>Bacillus aerius</i>	NR_118439.1	99
NRB032	D24/45	RD	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NR_041577.1	99
NRB033	H31	RND	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_114058.1	99
NRB034	H31	RND	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_117481.1	99
NRB035	Paiaguás	RND	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_114058.1	98
NRB036 A	A-2	RD	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_117481.1	99
NRB036 B	A-2	RD	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_117481.1	99
NRB037	Ipyporã	RD	<i>Azospirillum oryzae</i>	NR_117482.1	98
NRB038	Piatã	RD	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_116846.1	98
NRB039	X009	RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB040	Paiaguás	SR	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	98
NRB041	Humid. Comum	SR	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB042	X009	RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB043	Paiaguás	RND	<i>Phytobacter diazotrophicus</i>	NR_115869.1	99
NRB044	X009	RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB045	Paiaguás	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB046	Mulato II	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB047	Humid. Comum	SR	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB048	H31	SR	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB049	79-10	SR	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99

NRB050	A-2	RD	<i>Bacillus aerius</i>	NR_118439.1	99
NRB051	Mulato II	RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB053	X009	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB054	Paiaguás	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB055	H31	RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB058	D24/27	RD	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i>	NR_113855.1	99
NRB059	79-10	RND	<i>Bacillus aerius</i>	NR_118439.1	99
NRB060	H31	SR	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	NR_112569.1	99
NRB061	D24/27	SR	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB062A	A-2	SR	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB062B	A-2	SR	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB063	A-2	SR	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB064	D24/45	SR	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB065	D24/27	SR	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB066	X009	RD	<i>Stenotrophomonas panacihumi</i>	NR_117406.1	99
NRB067	X009	RND	<i>Rhizobium pusense</i>	NR_116874.1	99
NRB068	D24/27	RND	<i>Stenotrophomonas panacihumi</i>	NR_117406.1	99
NRB069A	H31	RD	<i>Rhizobium endolithicum</i>	NR_133842.1	97
NRB069B	H31	RD	<i>Bacillus aerius</i>	NR_118439.1	99
NRB070	X009	SR	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	99
NRB071	Mulato II	RD	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	99
NRB072	D24/45	SR	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NR_041577.1	99
NRB073A	D24/45	RND	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	99
NRB073B	D24/45	RND	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	99
NRB074	Piatã	RND	<i>Azospirillum brasilense</i>	NR_042845.1	98
NRB075	79-10	RND	<i>Pseudomonas nitritireducens</i>	NR_133020.1	99

NRB076	Ipyporã	RND	<i>Bosea thiooxidans</i>	NR_114668.1	99
NRB077	79-10	SR	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_117481.1	98
NRB078	D24/45	RD	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NR_041577.1	99
NRB079	Mulato II	RND	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>	NR_024709.1	99
NRB080	D24/27	SR	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_114058.1	99
NRB081	Xaraés	RND	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NR_041577.1	99
NRB082	79-10	SR	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	99
NRB084	X009	SR	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	99
NRB085	Humid. Comum	RND	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_116846.1	98
NRB086	Ipyporã	SR	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_116846.1	98
NRB087	Mulato II	RD	<i>Azospirillum oryzae</i>	NR_114059.1	99
NRB088	Ipyporã	RND	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_117481.1	98
NRB089	H47	RND	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	99
NRB090	B001	SR	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_117481.1	98
NRB091	B140	SR	<i>Azospirillum oryzae</i>	NR_114059.1	99
NRB092	Basilisk	RND	<i>Azospirillum oryzae</i>	NR_114059.1	99
NRB093	Tupi	RD	<i>Pseudomonas geniculata</i>	NR_024708.1	99
NRB094	B140	RD	<i>Pseudomonas kuykendallii</i>	NR_118155.1	99
NRB095	Tupi	RD	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	NR_113730.1	99
NRB096	Tupi	RD	<i>Bacillus safensis</i>	NR_113945.1	99
NRB097	R134	RD	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_117481.1	98
NRB098	Basilisk	RD	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_114058.1	99
NRB099	Basilisk	RND	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_117481.1	99
NRB100	B001	RND	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_116846.1	98
NRB101	D24/45	SR	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NR_041577.1	99
NRB102	D24/27	RND	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NR_041577.1	99

NRB103	Paiaguás	RND	<i>Azospirillum melinis</i>	NR_043483.1	98
NRB104	79-10	RND	<i>Pseudomonas nitritireducens</i>	NR_133020.1	99
NRB105	79-10	RND	<i>Bacillus safensis</i>	NR_113945.1	99
NRB106	79-10	RND	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_117481.1	99
NRB107	Mulato II	SR	<i>Bacillus safensis</i>	NR_113945.1	99
NRB108	Mulato II	SR	<i>Bacillus aryabhatai</i>	NR_115953.1	99
NRB109	Humid. Comum	RND	<i>Azospirillum brasilense</i>	NR_042845.1	98
NRB111	Ipyporã	SR	<i>Paraburkholderia silvatlantica</i>	NR_043306.1	99
NRB113	79-10	SR	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB114	H31	SR	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1	99
NRB115		RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB116	Piatã	SR	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB119	B140	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB120	B140	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB121	Basilisk	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB122	Basilisk	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB123	Basilisk	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB124	B140	RD	<i>Paraburkholderia silvatlantica</i>	NR_043306.1	99
NRB125	H47	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB126	D24/2	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB127	D24/27	SR	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	NR_114142.1	99
NRB128	D24/27	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB129	D24/27	SR	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB130	A-2	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB131	A-2	RND	<i>Rhizobium pusense</i>	NR_116874.1	99
NRB132	D24/27	RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99

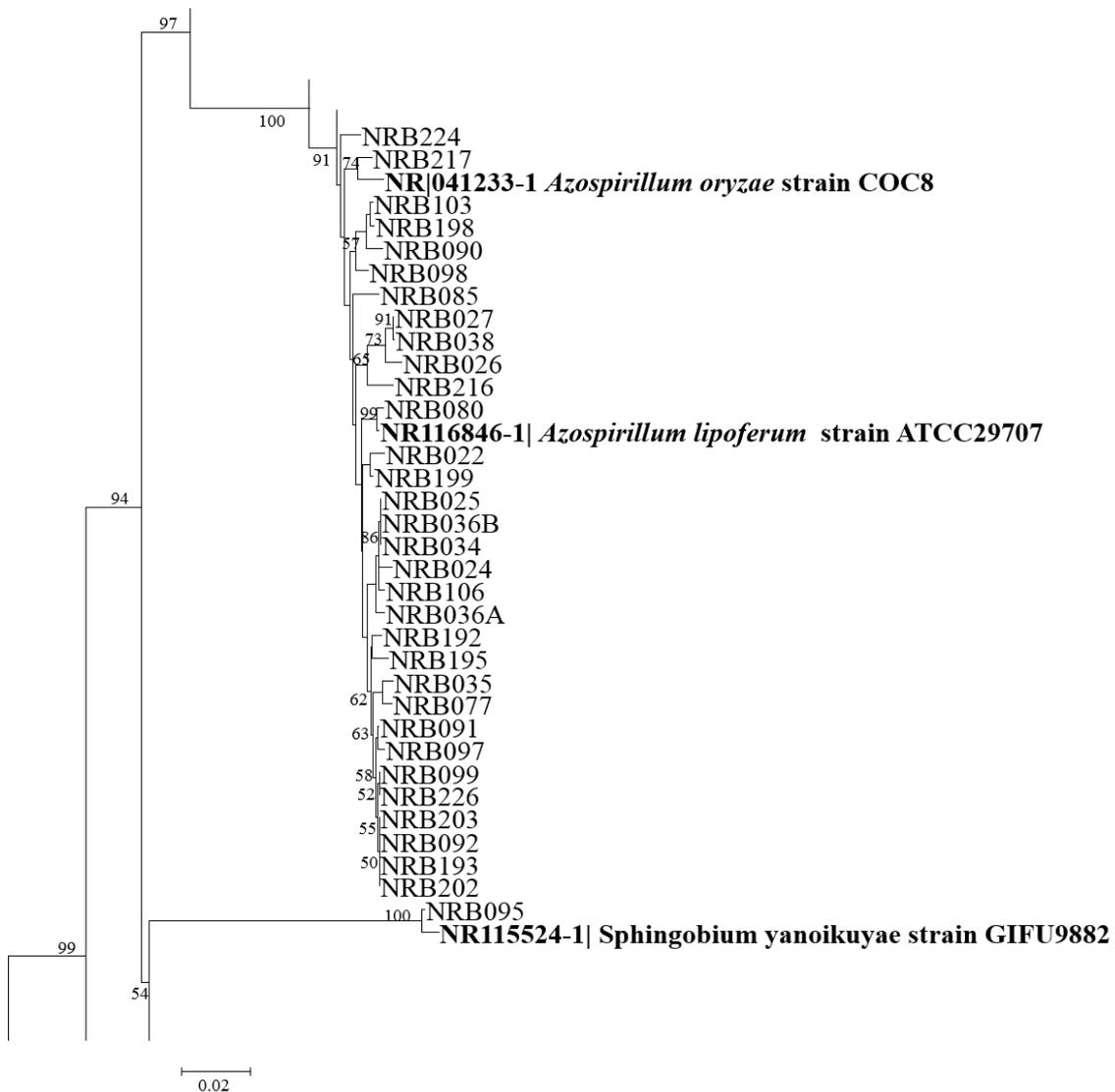
NRB133	D24/45	SR	<i>Pseudomonas knackmussii</i>	NR_121733.1	99
NRB134	H47	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB135	B001	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB137	H47	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB138	D24/27	RND	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	NR_074284.1	99
NRB139	Basilisk	RND	<i>Kosakonia sacchari</i>	NR_118333.1	99
NRB140	Tupi	SR	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB141	B001	RD	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1	99
NRB142	Marandu	RND	<i>Paraburkholderia silvatlantica</i>	NR_043306.1	99
NRB143	B001	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB144 A	H47	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB144 B	H47	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB145	B001	RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB146	Piatã	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_117477.1	99
NRB147	Paiaguás	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB148	Ipyporã	RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_117477.1	99
NRB149	Humid. Comum	RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB150	79-10	RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB151	79-10	RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB152	H31	RD	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	NR_074284.1	99
NRB153	Xaraés	RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB154	Ipyporã	RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB155	79-10	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB156	X009	RD	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	NR_042191.1	99
NRB157	Xaraés	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB158	B140	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99

NRB159	D24/45	RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB160	Ipyporã	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB161	Xaraés	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB162	D24/45	RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB163	D24/45	RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB166	D24/45	RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB167	D24/27	RD	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	99
NRB168	X009	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB169	Paiaguás	RND	<i>Zoogloea oryzae</i>	NR_114069.1	98
NRB170	H31	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB171	D24/27	SR	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB172	D24/27	SR	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB173	Mulato II	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB174	79-10	SR	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB175	79-10	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_117477.1	99
NRB176	79-10	RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_117477.1	99
NRB177	Paiaguás	SR	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB178	Piatã	RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB179	H31	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB180	A-2	RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB181	Ipyporã	RD	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB182	Ipyporã	RD	<i>Rhizobium tropici</i>	NR_102511.1	99
NRB183	X009	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB184	Piatã	SR	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB185	Paiaguás	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB186	A-2	RND	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99

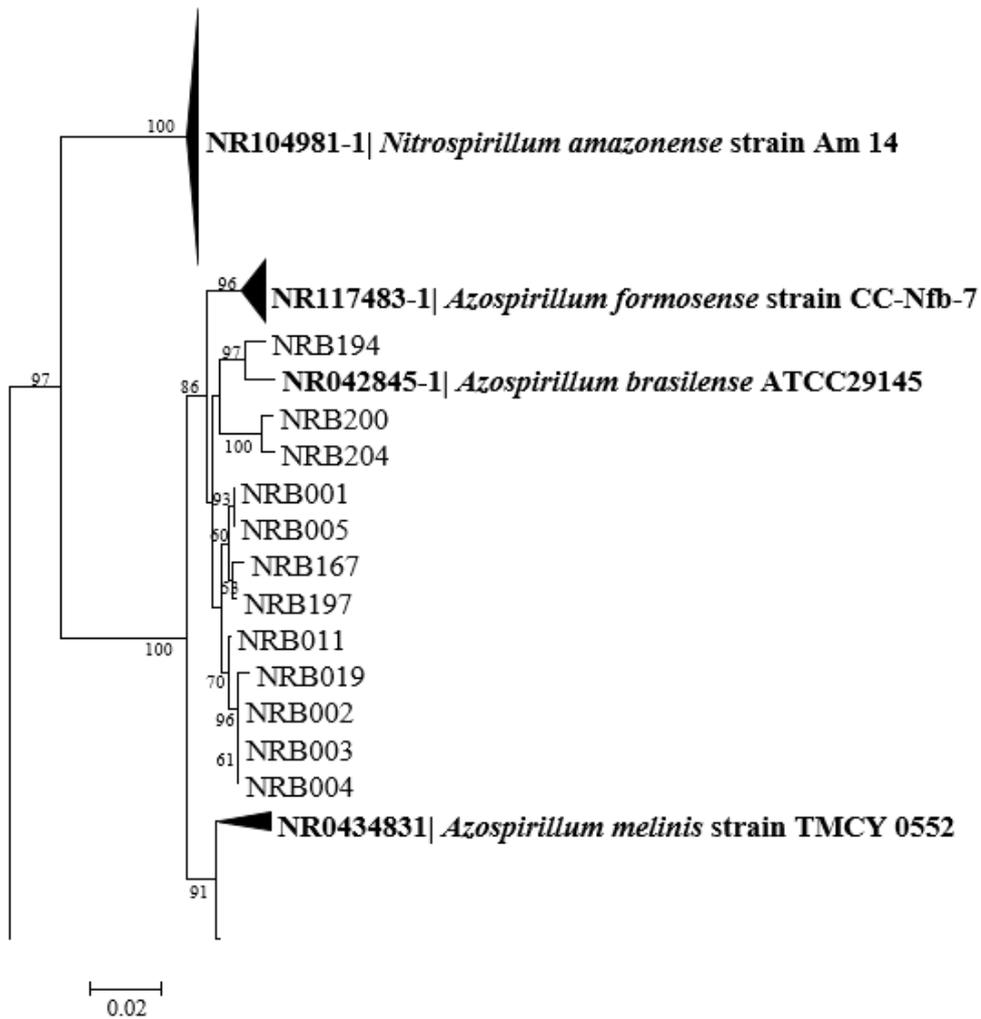
NRB187	Mulato II	SR	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NR_104981.1	99
NRB188	Xaraés	SR	<i>Zoogloea oryzae</i>	NR_114069.1	98
NRB189	B140	RND	<i>Paraburkholderia tropica</i>	NR_028965.1	99
NRB190	D24/2	RND	<i>Paraburkholderia tropica</i>	NR_028965.1	99
NRB192	79-10	RND	<i>Azospirillum oryzae</i>	NR_117482.1	98
NRB193	B140	SR	<i>Azospirillum oryzae</i>	NR_114059.1	99
NRB194	Marandu	SR	<i>Azospirillum brasilense</i>	NR_042845.1	98
NRB195	Marandu	RND	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_114058.1	99
NRB196	D24/2	RND	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	NR_074243.1	99
NRB197	Marandu	RND	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	99
NRB198	Marandu	RD	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_117481.1	99
NRB199	B140	RND	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_114058.1	99
NRB200	Basilisk	SR	<i>Azospirillum brasilense</i>	NR_042845.1	97
NRB201	D24/2	RD	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_116846.1	95
NRB202	B140	SR	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_117481.1	99
NRB203	B140	SR	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_117481.1	99
NRB204			<i>Azospirillum brasilense</i>	NR_042845.1	97
NRB205	Marandu	SR	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	99
NRB206	Marandu	SR	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	99
NRB207	Basilisk	SR	<i>Azospirillum brasilense</i>	NR_114057.1	97
NRB208	79-10	RND	<i>Azospirillum brasilense</i>	NR_042845.1	98
NRB209	Piatã	RND	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	98
NRB210	79-10	RND	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	98
NRB211	Xaraés	RD	<i>Pseudomonas kuykendallii</i>	NR_118155.1	99
NRB214	D24/27	SR	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	99
NRB215	X009	SR	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	NR_114207.1	97

NRB217			<i>Azospirillum oryzae</i>	NR_114059.1	99
NRB218	Xaraés	SR	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NR_041577.1	99
NRB219	79-10	RD	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NR_041577.1	99
NRB220	Ipyporã	RND	<i>Bosea thiooxidans</i>	NR_041994.1	99
NRB222	D24/45	SR	<i>Azospirillum brasilense</i>	NR_042845.1	98
NRB224	Xaraés	SR	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_117481.1	99
NRB225	Piatã	SR	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NR_041577.1	99
NRB226	Xaraés	RND	<i>Azospirillum melinis</i>	NR_043483.1	98
NRB227	Paiaguás	RND	<i>Bacillus subtilis</i>	NR_113265.1	99
NRB228	Xaraés	RD	<i>Azospirillum lipoferum</i>	NR_114058.1	98
NRB230	D24/45	SR	<i>Azospirillum formosense</i>	NR_117483.1	99

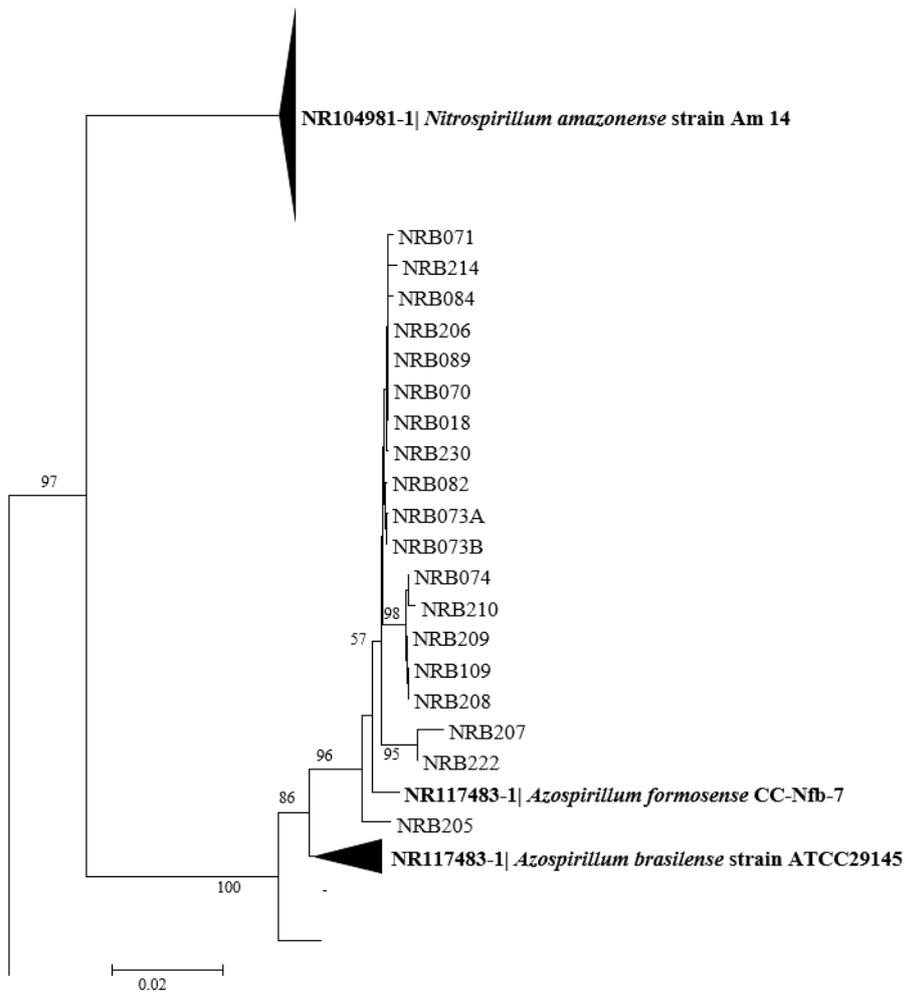
As abreviações representam: sim.: similaridade; SR: solo rizosférico; RND: raiz não desinfestada; RD: raiz desinfestada



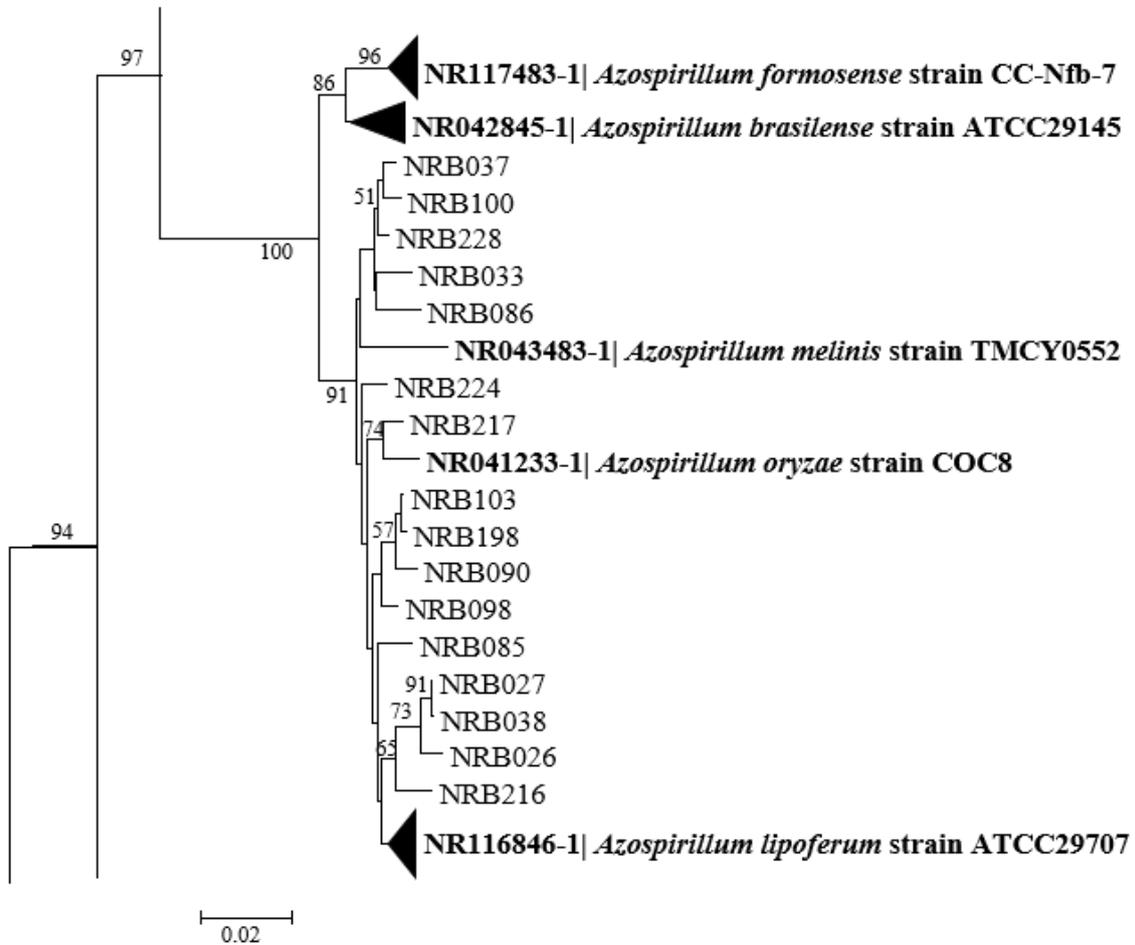
**Anexo F** Cluster de *Azospirillum lipoferum* detalhado da **Figura 5**. Árvore filogenética baseada em sequências do gene 16S rRNA (~1.450bp). A filogenia foi baseada no agrupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e modelo Kimura utilizando o programa MEGA6.1. Números localizados nos ramos indicam a porcentagem de 1.000 subamostragens (bootstrap). A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. A sequência do gene 16S rRNA de *Frankia alni* foi utilizada para o enraizamento da árvore



**Anexo G.** Cluster de *Azospirillum brasilense* detalhado da **Figura 5**. Árvore filogenética baseada em sequências do gene 16S rRNA (~1.450bp). A filogenia foi baseada no agrupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e modelo Kimura utilizando o programa MEGA6.1. Números localizados nos ramos indicam a porcentagem de 1.000 subamostragens (bootstrap). A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. A sequência do gene 16S rRNA de *Frankia alni* foi utilizada para o enraizamento da árvore.



**Anexo H.** Cluster de *Azospirillum formosense* detalhado da **Figura 5**. Árvore filogenética baseada em sequências do gene 16S rRNA (~1.450bp). A filogenia foi baseada no agrupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e modelo Kimura utilizando o programa MEGA6.1. Números localizados nos ramos indicam a porcentagem de 1.000 subamostragens (bootstrap). A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. A sequência do gene 16S rRNA de *Frankia alni* foi utilizada para o enraizamento da árvore.



**Anexo I.** Cluster de *Azospirillum melinis* detalhado da **Figura 5**. Árvore filogenética baseada em seqüências do gene 16S rRNA (~1.450bp). A filogenia foi baseada no agrupamento das seqüências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e modelo Kimura utilizando o programa MEGA6.1. Números localizados nos ramos indicam a porcentagem de 1.000 subamostragens (bootstrap). A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. A seqüência do gene 16S rRNA de *Frankia alni* foi utilizada para o enraizamento da árvore.



**Anexo J.** Cluster de *Nitrospirillum amazonense* detalhado da **Figura 5**. Árvore filogenética baseada em sequências do gene 16S rRNA (~1.450bp). A filogenia foi baseada no agrupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e modelo Kimura utilizando o programa MEGA6.1. Números localizados nos ramos indicam a porcentagem de 1.000 subamostragens (bootstrap). A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. A sequência do gene 16S rRNA de *Frankia alni* foi utilizada para o enraizamento da árvore.

**Anexo K.** Análise de similaridade de isolados de *Brachiaria*, selecionados para experimento de casa de vegetação, baseado no sequenciamento parcial do gene *nifH*

ISOLADO	<i>nifH</i>	% sim	Acesso
	(maior % sim.)		
NRB037	<i>Azospirillum lipoferum</i>	99	DQ787334.1
NRB041	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	97	CP022110.1
NRB043	<i>Phytobacter sp.</i>	99	CP027225.1
NRB046	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	94	CP022110.1
NRB074	<i>Azospirillum brasilense</i>	99	FR669134.1
NRB081	<i>Azospirillum brasilense</i>	98	GU216631.1
NRB085	<i>Azospirillum lipoferum</i>	97	DQ787334.1
NRB087	<i>Azospirillum oryzae</i>	95	AB185395.1
NRB088	<i>Azospirillum lipoferum</i>	96	DQ787334.1
NRB092	<i>Azospirillum lipoferum</i>	99	DQ787334.1
NRB094	<i>Pseudomonas oryzae</i>	89	LT629751.1
NRB096	<i>Azospirillum lipoferum</i>	96	DQ787334.1
NRB098	<i>Azospirillum lipoferum</i>	97	DQ787334.1
NRB103	<i>Azospirillum melinis</i>	97	GU256450.1
NRB109	<i>Azospirillum lipoferum</i>	99	DQ787334.1
NRB115	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	96	CP022110.1
NRB140	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	96	CP022110.1
NRB142	<i>Burkholderia silvatlantica</i>	95	EF158807.1
NRB146	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	97	CP022110.1
NRB148	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	97	CP022110.1
NRB153	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	93	GU256445.1
NRB158	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	96	CP022110.1
NRB178	<i>Nitrospirillum amazonense</i>	97	CP022110.1
NRB194	<i>Azospirillum brasilense</i>	99	FR745920.1
NRB197	<i>Azospirillum brasilense</i>	98	GQ161226.1
NRB200	<i>Azospirillum brasilense</i>	99	FR669134.1
NRB214	<i>Azospirillum formosense</i>	95	HM193519.1
NRB224	<i>Azospirillum lipoferum</i>	99	DQ787334.1

**Anexo L.** Identificação de gene *nifH* em isolados de *Brachiaria* .

Isolado	<i>nifH</i>	Isolado	<i>nifH</i>	isolado	<i>nifH</i>	Isolado	<i>nifH</i>	Isolado	<i>nifH</i>	Isolado	<i>nifH</i>
NRB001	+	NRB037	+	NRB073B	+	NRB113	+	NRB152	+	NRB192	+
NRB002	+	NRB038	+	NRB074	+	NRB114	-	NRB153	+	NRB193	+
NRB003	+	NRB039	+	NRB075	-	NRB115	+	NRB154	+	NRB194	+
NRB004	+	NRB040	+	NRB076	-	NRB116	+	NRB155	+	NRB195	+
NRB005	+	NRB041	+	NRB077	+	NRB119	+	NRB156	+	NRB196	+
NRB006	-	NRB042	+	NRB078	+	NRB120	+	NRB157	+	NRB197	+
NRB007	-	NRB043	+	NRB079	+	NRB121	+	NRB158	+	NRB198	+
NRB008	+	NRB044	+	NRB080	+	NRB122	+	NRB159	+	NRB199	+
NRB009	+	NRB045	+	NRB081	+	NRB123	+	NRB160	+	NRB200	+
NRB010	-	NRB046	+	NRB082	+	NRB124	+	NRB161	+	NRB201	+
NRB011	+	NRB047	+	NRB084	+	NRB125	+	NRB162	+	NRB202	+
NRB012	+	NRB048	+	NRB085	+	NRB126	+	NRB163	+	NRB203	+
NRB013	-	NRB049	+	NRB086	+	NRB127	+	NRB166	+	NRB204	+
NRB014	+	NRB050	-	NRB087	+	NRB128	+	NRB167	+	NRB205	+
NRB015	+	NRB051	+	NRB088	+	NRB129	+	NRB168	+	NRB206	+
NRB016	+	NRB052	-	NRB089	+	NRB130	+	NRB169	+	NRB207	+
NRB017	-	NRB053	+	NRB090	+	NRB131	+	NRB170	+	NRB208	+
NRB018	+	NRB054	+	NRB091	+	NRB132	+	NRB171	+	NRB209	+
NRB019	+	NRB055	-	NRB092	+	NRB133	-	NRB172	+	NRB210	+
NRB020	+	NRB058	-	NRB093	-	NRB134	+	NRB173	+	NRB211	+
NRB021	-	NRB059	-	NRB094	+	NRB135	+	NRB174	+	NRB212	+
NRB022	+	NRB060	-	NRB095	-	NRB137	+	NRB175	+	NRB213	+
NRB023	+	NRB061	+	NRB096	+	NRB138	+	NRB176	+	NRB214	+
NRB024	+	NRB062A	+	NRB097	+	NRB139	+	NRB177	+	NRB215	+
NRB025	+	NRB062B	+	NRB098	+	NRB140	+	NRB178	+	NRB216	+
NRB026	+	NRB063	+	NRB099	+	NRB141	+	NRB179	+	NRB217	+
NRB027	+	NRB064	+	NRB100	+	NRB142	+	NRB180	+	NRB218	-
NRB028	-	NRB065	+	NRB101	+	NRB143	+	NRB181	+	NRB219	-
NRB029	-	NRB066	-	NRB102	-	NRB144 A	+	NRB182	+	NRB220	-
NRB030	-	NRB067	-	NRB103	+	NRB144 B	+	NRB183	+	NRB221	+
NRB031	+	NRB068	-	NRB104	+	NRB145	+	NRB184	+	NRB222	+
NRB032	+	NRB069A	-	NRB105	-	NRB146	+	NRB185	+	NRB224	+
NRB033	+	NRB069B	-	NRB106	+	NRB147	+	NRB186	+	NRB225	+
NRB034	+	NRB070	+	NRB107	+	NRB148	+	NRB187	+	NRB226	+
NRB035	+	NRB071	+	NRB108	-	NRB149	+	NRB188	+	NRB227	+
NRB036 A	+	NRB072	-	NRB109	+	NRB150	+	NRB189	+	NRB228	+
NRB036 B	+	NRB073A	+	NRB111	+	NRB151	+	NRB190	+	NRB230	+

Legenda: +: foi observado a amplificação do gene *nifH*, -: ausência da amplificação do gene *nifH*

**Anexo M.** Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação

Tratamentos	Massa seca parte aérea								N acumulado da parte aérea								Massa seca da raiz	N acumulado da raiz		
	Corte				TOTAL	Corte				TOTAL	g/vaso	mg N/vaso								
	1°	2°	3°			1°	2°	3°												
C/N	16,2	ns	27,1	a	44,4	a	87,6	a	368,6	abc	215,4	a	202,5	a	156,0	a	68,4	a	194,6	a
SP245	12,9	ns	16,8	d	24,7	cd	54,3	cd	316,5	bc	115,4	d	109,9	bc	92,1	d	37,8	bc	119,2	b
S/N	12,1	ns	19,6	cd	26,1	cd	57,8	cd	228,4	d	155,5	bcd	115,2	bc	100,7	bcd	43,0	bc	112,9	b
NRB085	14,2	ns	23,4	abc	30,1	bc	67,6	bc	342,9	abc	188,5	abc	151,0	b	107,6	bcd	40,0	bc	134,1	ab
NRB214	14,0	ns	21,7	bcd	26,4	cd	62,1	cd	310,1	c	139,8	cd	116,5	bc	116,1	bc	54,0	ab	162,3	ab
NRB041	12,7	ns	21,6	bcd	28,2	bcd	62,5	bcd	310,9	c	161,6	abcd	114,5	bc	96,0	cd	33,5	c	105,9	b
NRB148	16,0	ns	18,8	cd	23,3	d	58,0	cd	359,2	abc	116,0	d	95,0	c	101,6	bcd	43,6	bc	117,6	b
NRB081	16,3	ns	20,1	bcd	27,1	cd	63,5	bcd	395,4	a	126,5	d	116,0	bc	108,1	bcd	44,6	bc	137,0	ab
NRB224	16,0	ns	25,0	ab	34,0	b	74,9	b	389,3	ab	200,6	ab	137,9	bc	119,7	b	44,7	bc	115,2	b
NRB153	15,6	ns	23,0	abc	28,9	bcd	67,4	bc	364,6	abc	158,0	abcd	125,5	bc	111,8	bcd	44,4	bc	123,3	b

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

**Anexo N.** Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de *Brachiaria brizantha* cv. Paiaguás inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação

Tratamentos	Massa seca parte aérea								N acumulado da parte aérea								Massa seca da raiz	N acumulado da raiz		
	Corte				TOTAL	Corte				TOTAL	g/vaso	mg N/vaso								
	1°	2°	3°			1°	2°	3°												
g / vaso				mg / vaso																
<b>C/N</b>	14,9	ns	23,3	a	39,8	a	78,0	A	348,2	ns	175,0	a	154,7	a	677,9	a	31,1	a	115,0	a
<b>SP245</b>	15,2	ns	16,8	c	23,5	bc	55,5	B	362,5	ns	123,2	bc	92,3	bcde	578,0	bc	25,1	abc	79,6	bc
<b>S/N</b>	17,0	ns	16,9	c	23,5	bc	57,4	B	391,4	ns	126,3	abc	100,1	bcde	617,7	abc	25,2	abc	94,0	ab
<b>NRB085</b>	14,5	ns	19,0	abc	23,9	bc	57,4	B	339,8	ns	140,5	abc	86,8	de	567,1	bc	22,4	bc	66,3	bc
<b>NRB214</b>	15,9	ns	17,6	bc	22,9	bc	56,4	B	381,9	ns	138,5	abc	90,8	cde	611,2	abc	27,3	ab	87,2	abc
<b>NRB037</b>	13,8	ns	17,6	bc	19,6	c	51,0	B	343,1	ns	130,8	abc	80,4	e	554,3	c	19,6	c	70,0	bc
<b>NRB103</b>	14,8	ns	21,6	ab	24,6	bc	60,9	B	401,0	ns	160,5	abc	109,9	bcd	671,3	a	22,3	bc	74,0	bc
<b>NRB043</b>	13,6	ns	22,7	a	27,8	b	64,2	B	355,7	ns	167,4	ab	110,9	bc	634,1	ab	25,5	abc	83,6	bc
<b>NRB045</b>	16,0	ns	18,0	bc	24,8	bc	58,8	B	380,8	ns	137,5	abc	114,4	b	632,7	ab	20,7	bc	71,6	bc
<b>NRB054</b>	15,1	ns	17,4	bc	21,1	c	53,6	B	361,9	ns	114,8	c	86,8	e	563,5	bc	19,9	c	61,7	c

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

**Anexo O.** Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de *Brachiaria brizantha* cv. Piatã inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação

Tratamentos	Massa seca parte aérea							N acumulado da parte aérea							Massa seca da raiz	N acumulado da raiz				
	Corte			TOTAL	Corte			TOTAL	g/vaso	mg N/vaso										
	1°	2°	3°		1°	2°	3°													
C/N	15,9	ns	24,0	a	40,5	a	80,4	a	440,8	a	249,6	a	182,9	a	873,2	a	42,4	ab	159,6	a
SP245	14,4	ns	15,6	b	24,5	bc	54,4	b	359,0	b	114,2	d	117,2	bc	590,4	b	30,4	c	104,2	b
S/N	16,0	ns	17,3	b	22,5	bc	55,8	b	387,6	ab	127,1	cd	96,1	bc	610,7	b	46,6	a	156,1	a
NRB085	14,9	ns	18,8	b	23,3	bc	57,0	b	360,4	b	134,7	bcd	98,4	bc	593,4	b	36,5	abc	106,4	b
NRB214	15,3	ns	17,5	b	27,3	b	60,1	b	376,1	b	145,2	bcd	122,4	b	643,6	b	29,7	c	87,8	b
NRB074	15,7	ns	15,0	b	20,2	c	50,9	b	395,4	ab	113,9	d	85,8	c	595,1	b	38,5	abc	100,1	b
NRB178	15,3	ns	16,7	b	21,8	bc	53,8	b	390,9	ab	126,5	cd	94,6	bc	612,0	b	31,3	c	102,4	b
NRB146	14,9	ns	17,7	b	24,2	bc	56,8	b	355,7	b	153,7	bcd	106,9	bc	616,2	b	31,9	c	105,5	b
NRB200	14,6	ns	19,0	b	26,5	bc	60,0	b	354,5	b	175,8	b	115,5	bc	645,7	b	35,3	bc	112,5	b
NRB096	13,9	ns	19,1	ab	25,5	bc	58,5	b	371,8	b	171,1	bc	99,2	bc	642,0	b	33,8	bc	112,6	b

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

**Anexo P.** Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação

Tratamentos	Massa seca parte aérea								N acumulado da parte aérea								Massa seca da raiz	N acumulado da raiz		
	Corte				TOTAL	Corte				TOTAL	g/vaso	mg N/vaso								
	1°	2°	3°			1°	2°	3°												
g / vaso				mg / vaso																
C/N	16,8	ns	21,5	a	30,5	a	68,8	A	410,7	abc	187,7	a	133,2	a	731,6	a	48,0	a	149,0	a
SP245	17,8	ns	14,9	bc	18,5	bc	51,1	b	415,7	abc	112,4	bc	77,0	bc	605,2	bc	31,6	c	96,4	b
S/N	17,3	ns	17,5	ab	19,7	bc	54,5	b	370,5	c	128,4	bc	87,0	b	585,9	bc	33,7	bc	91,9	b
NRB085	17,2	ns	16,5	bc	21,3	b	55,1	b	386,8	bc	128,5	bc	86,9	b	602,2	bc	39,5	b	125,0	a
NRB214	19,4	ns	15,8	bc	18,1	cd	53,3	b	470,5	a	107,3	c	79,3	bc	657,2	abc	33,9	bc	92,2	b
NRB103	18,4	ns	14,8	bc	17,3	cd	50,5	b	426,0	abc	111,4	bc	84,4	bc	621,8	abc	38,1	b	96,0	b
NRB092	18,5	ns	14,5	bc	18,2	cd	51,2	b	447,9	abc	116,3	bc	78,0	bc	642,3	abc	34,0	bc	97,4	b
NRB142	17,1	ns	18,2	ab	20,2	bc	55,5	b	449,5	abc	148,4	b	91,3	b	689,2	ab	39,0	b	128,4	a
NRB194	17,3	ns	12,9	c	15,4	d	45,6	b	386,3	c	98,4	c	71,9	c	556,6	c	29,7	c	92,0	b
NRB197	18,9	ns	15,2	bc	18,2	cd	52,2	b	467,2	ab	97,4	c	84,6	bc	649,2	abc	33,5	bc	91,6	b

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

**Anexo Q.** Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de *Brachiaria brizantha* cv. B140 inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação

Tratamentos	Massa seca parte aérea								N acumulado da parte aérea								Massa seca da raiz	N acumulado da raiz		
	Corte				TOTAL	Corte				TOTAL	g/vaso	mg N/vaso								
	1°	2°	3°			1°	2°	3°												
SP245	11,7	ns	19,2	ab	21,2	abc	52,0	b	394,6	ns	149,0	bc	104,8	abc	648,4	b	41,3	ab	126,0	ab
S/N	12,4	ns	18,8	ab	19,0	bc	50,2	b	424,8	ns	121,9	c	87,9	bc	634,5	b	34,5	b	91,1	b
NRB085	11,8	ns	17,9	ab	22,9	abc	52,5	b	345,5	ns	153,8	bc	96,8	abc	596,1	b	38,2	ab	118,6	ab
NRB214	12,5	ns	31,5	ab	32,0	ab	76,0	a	410,8	ns	237,9	abc	147,3	ab	796,0	ab	56,8	ab	170,3	ab
NRB088	13,6	ns	34,7	a	33,2	a	81,5	a	457,0	ns	312,5	a	148,2	ab	917,7	a	68,4	a	201,9	a
NRB094	11,9	ns	27,9	abc	29,5	abc	69,4	a	390,3	ns	284,2	ab	150,5	a	825,0	a	43,5	ab	125,8	ab
NRB158	12,0	ns	19,3	ab	19,2	bc	50,5	b	367,6	ns	140,2	bc	89,9	abc	597,8	b	34,6	b	104,9	b
NRB087	14,0	ns	16,1	c	18,9	c	49,1	b	422,1	ns	124,4	c	86,0	c	632,4	b	36,5	b	103,9	b
NRB142	11,9	ns	19,6	ab	17,5	c	49,0	b	348,7	ns	173,4	abc	83,4	c	605,4	b	31,4	b	102,5	b

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

**Anexo R.** Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de *Brachiaria spp.* cv. Ipyporã inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação

Tratamentos	Massa seca parte aérea								N acumulado da parte aérea								Massa seca da raiz	N acumulado da raiz		
	Corte				TOTAL	Corte				TOTAL										
	1°	2°	3°			1°	2°	3°												
g / vaso				mg / vaso				g/vaso		mg N/vaso										
C/N	12,6	ns	14,2	a	26,8	a	53,6	A	418,5	ab	152,7	a	161,8	a	733,0	a	62,2	a	167,7	a
SP245	13,2	ns	11,7	b	15,8	bc	40,6	B	371,8	bc	110,1	bc	85,8	c	567,7	cde	33,6	c	87,4	c
S/N	13,8	ns	11,8	b	15,2	c	40,8	B	371,6	bc	98,8	c	84,8	c	555,2	de	38,5	bc	100,5	bc
NRB085	14,0	ns	12,8	ab	19,8	b	46,6	Ab	439,6	a	124,3	b	113,8	b	677,7	ab	51,2	ab	126,7	b
NRB214	13,9	ns	11,6	b	16,9	bc	42,4	B	406,3	ab	107,4	bc	98,3	bc	612,0	bcde	41,3	bc	112,9	bc
NRB088	13,6	ns	11,5	b	18,2	bc	43,2	B	341,2	c	108,6	bc	97,6	bc	547,4	e	44,7	bc	119,9	bc
NRB037	12,5	ns	11,2	b	17,5	bc	41,2	B	408,7	ab	110,1	bc	104,5	bc	623,2	bcd	33,8	c	98,9	bc
NRB115	12,8	ns	12,1	b	18,7	bc	43,5	B	385,0	abc	115,8	bc	100,4	bc	601,2	cde	36,1	c	93,5	bc
NRB074	14,5	ns	12,2	b	16,8	bc	43,5	B	431,1	ab	104,7	bc	99,0	bc	634,8	bc	38,2	bc	100,2	bc
NRB194	13,9	ns	12,2	b	17,1	bc	43,1	B	388,8	abc	121,6	bc	92,8	bc	603,1	cde	39,5	bc	108,4	bc

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

**Anexo S.** Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de *Brachiaria spp.* cv. Mulato II inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação

Tratamentos	Massa seca parte aérea								N acumulado da parte aérea								Massa seca da raiz	N acumulado da raiz		
	Corte				TOTAL	Corte				TOTAL										
	1°	2°	3°			1°	2°	3°												
g / vaso				mg / vaso				g/vaso		mg N/vaso										
C/N	16,7	a	20,2	a	30,2	a	67,2	a	413,4	ab	176,5	a	146,1	a	736,0	a	50,5	a	146,5	a
SP245	15,4	ab	15,5	bc	19,6	bc	50,5	bc	373,0	b	128,1	bc	105,7	bc	606,7	b	37,4	b	122,3	ab
S/N	13,7	b	16,2	bc	19,7	bc	49,6	bc	335,9	b	120,1	c	95,4	bc	551,4	b	43,4	ab	148,8	a
NRB085	14,0	ab	15,9	bc	18,7	bc	48,6	bc	373,1	b	125,9	bc	87,9	c	587,0	b	38,2	b	106,6	bc
NRB214	13,2	b	18,6	ab	23,9	b	55,8	b	370,9	b	164,3	ab	125,9	ab	661,1	ab	40,3	b	134,1	ab
NRB109	15,6	ab	13,2	c	14,6	c	43,4	c	485,7	a	98,4	c	75,5	c	659,5	ab	38,9	b	124,4	ab
NRB098	15,5	ab	16,3	bc	19,6	bc	51,4	bc	396,3	b	119,2	c	100,5	bc	616,0	ab	43,2	ab	138,1	ab
NRB087	13,5	b	15,7	bc	18,2	bc	47,4	bc	409,0	ab	124,3	bc	83,9	c	617,2	ab	37,8	b	116,9	ab
NRB108	13,1	b	13,2	c	16,6	c	42,9	c	385,2	b	109,0	c	80,6	c	574,8	b	40,6	b	114,4	ab
NRB046	14,6	ab	15,4	bc	18,2	bc	48,2	bc	341,0	b	119,3	c	87,5	c	547,7	b	25,8	c	69,3	c

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

**Anexo T.** Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação

Tratamentos	Massa seca parte aérea								N acumulado da parte aérea								Massa seca da raiz	N acumulado da raiz		
	Corte				TOTAL	Corte				TOTAL										
	1°	2°	3°			1°	2°	3°												
g / vaso				mg / vaso				g/vaso		mg N/vaso										
C/N	15,5	c	25,8	a	46,3	a	87,6	a	399,0	abc	230,4	a	171,4	a	800,8	a	40,5	a	112,6	a
SP245	18,3	abc	21,0	abc	28,2	b	67,6	b	381,6	abc	181,1	ab	126,3	ab	689,0	ab	30,9	ab	93,0	abc
S/N	15,8	bc	17,4	cd	26,6	b	59,8	b	348,5	c	158,3	b	118,6	b	625,4	b	28,7	b	84,1	abc
NRB085	19,2	a	19,9	bcd	24,0	b	63,1	b	435,2	a	135,2	b	103,3	b	673,6	b	26,1	b	76,5	bc
NRB214	20,6	a	23,3	ab	26,4	b	70,2	ab	433,9	a	160,9	b	102,6	b	697,4	ab	26,6	b	79,0	abc
NRB148	18,6	abc	19,6	bcd	26,2	b	64,4	b	364,2	bc	154,7	b	114,4	b	633,2	b	28,9	b	96,0	abc
NRB081	17,5	abc	15,5	d	26,0	b	59,1	b	430,1	a	130,2	b	108,0	b	668,3	b	32,6	ab	101,6	ab
NRB098	17,7	abc	20,9	abcd	21,3	b	59,8	b	427,0	a	155,1	b	98,5	b	680,6	b	25,7	b	76,2	bc
NRB092	18,1	abc	17,6	cd	22,8	b	58,5	b	412,1	ab	122,2	b	103,4	b	637,6	b	24,1	b	68,5	bc
NRB200	18,8	ab	17,1	cd	22,4	b	58,4	b	398,8	abc	122,3	b	100,1	b	621,2	b	24,7	b	66,1	c

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

**Anexo U.** Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de *Brachiaria humidicula* cv. Tupi inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação.

Tratamentos	Massa seca parte aérea								N acumulado da parte aérea								Massa seca da raiz	N acumulado da raiz		
	Corte				TOTAL	Corte				TOTAL	g/vaso	mg N/vaso								
	1°	2°	3°			1°	2°	3°												
g / vaso				mg / vaso																
C/N	9,1	ns	28,0	ab	44,8	ns	81,9	a	228,5	ab	274,1	abc	136,6	a	639,2	ns	36,5	ab	118,2	ab
SP245	8,5	ns	29,7	ab	34,7	ns	72,9	ab	262,2	a	266,2	abc	73,7	b	602,1	ns	31,7	b	95,4	b
S/N	7,9	ns	25,2	ab	34,0	ns	67,1	ab	223,4	ab	252,6	abc	123,6	ab	599,5	ns	47,1	ab	153,3	a
NRB085	9,7	ns	25,3	ab	35,8	ns	70,8	ab	263,8	a	200,5	c	128,9	ab	593,2	ns	32,9	b	109,7	ab
NRB214	9,2	ns	20,8	b	34,2	ns	64,3	b	271,6	a	226,2	bc	121,2	ab	619,0	ns	33,2	b	96,1	b
NRB021	6,7	ns	30,8	a	45,1	ns	82,6	a	182,9	b	328,3	a	142,7	a	654,0	ns	39,3	ab	127,6	ab
NRB178	7,6	ns	25,9	ab	37,5	ns	70,9	ab	214,2	ab	294,6	abc	130,1	ab	638,8	ns	44,5	ab	138,1	ab
NRB096	8,6	ns	30,3	a	43,8	ns	82,7	a	245,9	ab	319,4	abc	138,4	a	703,7	ns	44,3	ab	138,4	ab
NRB140	9,0	ns	25,3	ab	33,8	ns	68,0	b	258,1	ab	237,6	abc	118,3	ab	614,1	ns	39,8	ab	122,2	ab
NRB046	8,2	ns	31,3	a	36,9	ns	76,5	ab	229,2	ab	290,4	abc	109,1	ab	628,6	ns	52,8	a	152,7	a

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

**Anexo V.** Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de *Brachiaria humidicula* cv. comum inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação.

Tratamentos	Massa seca parte aérea							N acumulado da parte aérea							Massa seca da raiz	N acumulado da raiz				
	Corte						TOTAL	Corte						TOTAL						
	1°	2°	3°					1°	2°	3°										
g / vaso							mg / vaso							g/vaso	mg N/vaso					
C/N	13,1	a	29,4	ns	45,2	a	87,7	a	420,2	a	316,3	ns	167,9	a	904,4	a	24,8	ab	94,5	abc
SP245	8,0	c	28,7	ns	29,5	b	66,2	b	213,3	c	302,9	ns	156,7	a	672,9	bc	22,8	ab	78,3	abc
S/N	10,4	abc	23,9	ns	22,7	b	57,0	b	286,8	bc	184,0	ns	100,0	b	570,8	bc	22,2	ab	83,1	abc
NRB085	11,0	abc	25,1	ns	23,3	b	59,3	b	301,0	bc	213,0	ns	113,7	b	627,7	bc	28,5	a	105,5	a
NRB214	9,2	bc	29,3	ns	26,2	b	64,7	b	258,5	bc	261,0	ns	112,7	b	632,1	bc	20,7	ab	70,6	bc
NRB109	9,9	abc	26,7	ns	24,4	b	61,0	b	289,0	bc	233,4	ns	111,9	b	634,2	bc	17,4	b	64,3	c
NRB021	8,5	c	28,2	ns	28,1	b	64,8	b	273,3	bc	279,9	ns	104,4	b	657,6	bc	23,7	ab	71,5	bc
NRB041	12,0	ab	30,3	ns	24,9	b	67,2	b	339,3	ab	259,1	ns	106,1	b	704,4	b	22,5	ab	77,9	abc
NRB224	8,4	c	28,0	ns	23,9	b	60,2	b	266,8	bc	282,5	ns	102,8	b	652,1	bc	22,2	ab	82,3	abc
NRB043	8,2	c	22,7	ns	25,1	b	56,0	b	229,8	c	205,4	ns	99,7	b	534,9	c	27,0	a	102,1	ab

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

**Anexo W.** Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de *Brachiaria humidicula* cv. Llanero inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação.

Tratamentos	Massa seca parte aérea								N acumulado da parte aérea								Massa seca da raiz	N acumulado da raiz		
	Corte				TOTAL	Corte				TOTAL	g/vaso	mg N/vaso								
	1°	2°	3°			1°	2°	3°												
g / vaso				mg / vaso																
C/N	11,4	ab	21,7	a	50,8	a	83,9	a	290,5	ns	199,0	a	199,7	a	689,3	a	86,0	a	262,1	a
SP245	8,6	b	15,1	cd	25,6	b	49,4	b	230,1	ns	131,4	bcd	110,8	b	472,3	c	60,2	ab	169,5	bc
S/N	9,6	ab	19,8	ab	29,2	b	58,5	b	260,3	ns	157,1	bc	116,7	b	534,0	bc	71,5	ab	203,2	ab
NRB085	10,1	ab	18,4	abc	26,4	b	54,9	b	277,2	ns	138,3	bcd	104,8	b	520,3	bc	62,1	ab	153,2	bc
NRB214	12,7	a	15,7	bcd	25,0	b	53,4	b	287,8	ns	120,2	cd	104,0	b	512,0	bc	53,7	b	119,4	c
NRB153	10,1	Ab	18,7	abc	29,2	b	58,0	b	235,7	ns	146,8	bc	110,8	b	493,2	bc	64,9	ab	156,4	bc
NRB045	12,6	A	16,3	bcd	26,6	b	55,4	b	296,7	ns	142,5	bc	119,2	b	558,4	b	61,2	ab	163,4	bc
NRB158	9,8	Ab	18,5	abc	25,7	b	54,0	b	246,7	ns	167,5	ab	110,5	b	524,7	bc	65,9	ab	175,0	bc
NRB108	10,7	Ab	12,3	d	21,8	b	44,9	b	257,8	ns	97,9	d	97,1	b	452,9	c	52,3	b	146,4	bc
NRB197	9,9	Ab	13,3	d	22,8	b	46,0	b	250,7	ns	120,4	cd	92,4	b	463,5	c	62,6	ab	166,6	bc

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância

**Anexo X.** Massa seca da parte aérea, N acumulado da parte aérea, massa seca da raiz e N acumulado da raiz de *Brachiaria humidicula* cv. H47 inoculada com bactérias diazotróficas e submetida a três cortes - casa de vegetação.

Tratamentos	Massa seca parte aérea								N acumulado da parte aérea								Massa seca da raiz	N acumulado da raiz		
	Corte				TOTAL	Corte				TOTAL	g/vaso	mg N/vaso								
	1°	2°	3°			1°	2°	3°												
g / vaso				mg / vaso																
C/N	8,1	ns	24,0	a	51,0	a	83,1	a	220,5	b	270,7	a	246,4	A	737,6	a	44,3	bc	154,6	ab
SP245	8,7	ns	18,8	cde	30,6	bc	58,1	b	231,9	b	163,1	bc	129,1	Bc	524,1	b	63,9	a	181,5	a
S/N	9,4	ns	19,4	bcde	27,8	bc	56,6	b	231,9	b	169,2	bc	121,8	Bc	522,9	b	44,1	bc	127,6	b
NRB085	8,0	ns	22,8	ab	34,7	b	65,5	ab	215,6	b	225,7	ab	147,7	B	589,0	ab	52,2	abc	152,0	ab
NRB214	9,6	ns	15,6	e	22,7	c	47,8	b	296,3	a	131,2	c	91,0	C	518,6	b	56,4	ab	153,0	ab
NRB115	7,2	ns	17,1	de	29,5	bc	53,8	b	194,2	b	156,0	bc	125,3	Bc	475,5	b	39,0	c	103,6	b
NRB146	8,4	ns	20,9	abcd	30,8	bc	60,2	b	201,8	b	146,7	bc	127,5	Bc	476,0	b	46,3	bc	135,7	ab
NRB054	7,3	ns	19,1	bcde	34,4	b	60,9	b	198,3	b	204,8	abc	150,6	B	553,7	b	52,9	abc	155,3	ab
NRB094	7,4	ns	21,9	abc	34,4	b	63,8	b	192,6	b	208,8	abc	143,3	B	544,8	b	46,5	bc	131,2	ab
NRB140	8,7	ns	18,9	bcde	27,7	bc	55,3	b	206,5	b	136,2	c	121,2	Bc	463,9	b	39,6	bc	107,3	b

Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS à 0,1 de significância



Continuação do Anexo Y

