

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE AGRONOMIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**CIÊNCIA DO SOLO**

**DISSERTAÇÃO**

**Isolamento, Caracterização e Seleção de  
Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal  
em Genótipos de *Paspalum***

**Mayan Blanc Amaral**

**2017**



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

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE  
RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL EM  
GENÓTIPOS DE *PASPALUM***

**MAYAN BLANC AMARAL**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Vera Lúcia Divan Baldani**

*e Co-orientação do Professor*  
**José Ivo Baldani**

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

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2017

A485i Amaral, Mayan Blanc, 1989-  
Isolamento, Caracterização e Seleção de  
Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal em  
Genótipos de Paspalum / Mayan Blanc Amaral. - 2017.  
43 f.: il.

Orientadora: Vera Lúcia Divan Baldani.  
Coorientador: José Ivo Baldani.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia,  
Agronomia Ciência do Solo, 2017.

1. Diversidade. 2. Promoção de Crescimento Vegetal.  
3. Pastagens tropicais. I. Divan Baldani, Vera Lúcia  
, 1954-, orient. II. Baldani, José Ivo, 1953-,  
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Instituto de Agronomia, Agronomia Ciência do  
Solo. IV. Título.

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

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

**MAYAN BLANC AMARAL**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17/02/2017.

---

Vera Lúcia Divan Baldani. Dr<sup>a</sup>. Embrapa Agrobiologia  
(Orientadora)

---

Adelson Paulo de Araújo. Dr. UFRRJ

---

Silvia Regina Goi. Dr<sup>a</sup>. UFRRJ

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico,*  
Aos meus pais, Emília e Ricardo e a Diego Alves pelo amor incondicional.

## **AGRADECIMENTOS**

A essa energia positiva que todos chamam de Deus.

Aos meus pais, os primeiros grandes professores da minha vida.

Aos meus irmãos, Maya e Sidhartha pelo compartilhamento de bons momentos.

A Diego, pelo amor, cumplicidade, amizade e paciência durante todos esses 11 anos e apoio na coleta dos experimentos desde a iniciação científica.

A Vera, pela amizade, orientação, oportunidade de desenvolver este trabalho e pela iniciação na carreira científica.

A Ivo Baldani pela co-orientação e ensinamentos durante o trabalho.

A Embrapa Agrobiologia pela oportunidade de realizar o trabalho e aos seus funcionários que me acolheram durante os últimos 5 anos, em especial ao Lúcio e ao Wilson pela ajuda na realização do trabalho e por tornarem o laboratório um ambiente tranquilo e descontraído.

Aos colegas do Laboratório de Gramíneas, Esdras, Thamires, Bruna, Camila, em especial ao Danilo, Fabiano, Gabi, Flaviane, Silvana e Sumaya pela amizade, apoio e ensinamentos.

Aos colegas da graduação e pós-graduação, aos companheiros de viagens em congressos com os quais convivi e que se tornaram grandes amigos, em especial à minha irmã carioca Nathália Fortuna, Dani sócia, Áurea, Thiago, Jean, Edevaldo, Priscila, Andrea, Camila Ferreira, Camila Feder e Fernando.

Ao IFBA e à UFRRJ pelo ensino gratuito e de qualidade.

Ao curso de Pós-graduação em Agronomia-Ciência do Solo pela oportunidade da realização do curso.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida para a realização da pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui, muito obrigada!

## **BIOGRAFIA**

MAYAN BLANC AMARAL, filha de Ricardo Santos Amaral e Maria Emília Blanc Amaral, nasceu em 10 de novembro de 1989 na cidade de Teófilo Otoni, MG. Em 2005, cursou o ensino médio concomitante com o curso Técnico em Agropecuária, na Escola Federal Antônio José Teixeira, atual IFBaiano em Guanambi, BA. Graduiu-se em Engenharia Florestal pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no ano de 2014. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica na Embrapa Agrobiologia de Agosto de 2011 a Dezembro de 2014 sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Vera Lúcia Divan Baldani, Dr. Ivo Baldani e da Dr<sup>a</sup>. Veronica Massena Reis na área de Fixação Biológica de Nitrogênio no Laboratório de Gramíneas. Em 2015 ingressou no Mestrado no Curso de Pós-Graduação na área de Agronomia- Ciência do Solo na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob orientação da Dr<sup>a</sup> Vera L. D. Baldani e co-orientação do Dr. José Ivo Baldani.

## RESUMO

AMARAL, Mayan Blanc. **Isolamento, caracterização e seleção de bactérias diazotróficas em genótipos de *Paspalum***. 2017. 43 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

O nitrogênio é considerado escasso em solos tropicais e o uso do N-fertilizante pode ocasionar a contaminação dos recursos hídricos, elevar o custo energético da produção, além de contribuir para a geração de gases do efeito estufa que afetam o aquecimento global. Para alcançar a sustentabilidade das culturas torna-se necessário o uso de fontes alternativas de N, como a Fixação Biológica de Nitrogênio. Objetivou-se nesse trabalho isolar, caracterizar e selecionar estirpes eficientes na promoção de crescimento vegetal em genótipos de *Paspalum*. O isolamento foi realizado em solo rizosférico e raízes de 10 genótipos de *Paspalum spp.* oriundos do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. As bactérias foram isoladas nos meios semissólidos livres de Nitrogênio, NFB e LGI e no meio sólido LG. Foi obtido um total de 161 isolados, 127 obtidos em meio LG; 17 em meio NFB e 17 em meio LGI. Os isolados foram caracterizados morfolologicamente e agrupados de acordo com essas características. Desses grupamentos foram selecionados 80 isolados representativos para serem caracterizados geneticamente. Esses isolados tiveram o seu DNA extraído com o uso do Kit Wizard® Genomic DNA purification Kit (Promega®), conforme especificação do fabricante. O DNA dos 80 isolados foi analisado pela técnica de BOX-PCR. Para a construção do dendrograma, as matrizes de similaridade foram calculadas pelo coeficiente de Jaccard e o agrupamento de matrizes de similaridade utilizando o algoritmo UPGMA. Os isolados foram agrupados e representantes foram selecionados para a identificação taxonômica através do sequenciamento do gene 16S rRNA e para a caracterização fisiológica quanto à solubilização de fosfatos, produção de compostos indólicos e produção de sideróforos. Após isto, os isolados dos genótipos BRA 19186, BRA 9610 e BRA 23540 mais promissores na caracterização fisiológica foram testados em 3 experimentos em casa-de-vegetação. As análises de BOX-PCR revelaram uma alta diversidade genotípica, formando 55 isolados agrupados com 70 % de similaridade, sendo obtidos no meio LG, 11 grupos, no meio LGI nenhum grupo similar e no meio NFB apenas 2 isolados similares. Do total de 55 isolados, 73% isolados produziram sideróforos, 25% solubilizaram fosfatos e 9% produziram compostos indólicos. Foram sequenciados 30 isolados, sendo 16 isolados pertencentes ao gênero *Bacillus*, 6 isolados ao gênero *Rhizobium*, 2 ao gênero *Burkholderia*, 2 ao gênero *Pseudomonas*, 1 isolado ao gênero *Dyadobacter*, 1 isolado ao gênero *Acinetobacter*, 1 isolado ao gênero *Microbacterium* e 1 isolado ao gênero *Azospirillum*. Os experimentos mostraram ganhos nas variáveis biométricas e na massa seca da parte aérea de até 56%. Houve variação na resposta a inoculação em relação às coletas, genótipos e isolados testados nos 3 experimentos.

**Palavras-chave:** Diversidade. Promoção de Crescimento Vegetal. Pastagens tropicais.

## ABSTRACT

AMARAL, Mayan Blanc. **Isolation, characterization and selection of diazotrophic bacteria in *Paspalum* genotypes.** 2017. 43 p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Nitrogen is considered scarce in tropical soils and the use of N-fertilizer can lead to water resources contamination, raising the energy cost of production and contributing to the generation of greenhouse gases (GHG) that affects the generation of global warming. To achieve sustainability of crops becomes necessary to use alternative sources of N as the Biological Nitrogen Fixation. This work aimed to isolate, characterize and select efficient strains in the plant growth promotion into 10 genotypes of *Paspalum*. The isolation was performed in roots and rizosphere soil of 10 genotypes of *Paspalum* sp. from the Active Germplasm Bank of Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. The bacteria were isolated in nitrogen-free semi-solid media, NFB and LGI and LG solid medium. A total of 161 isolates were obtained, 127 obtained in LG medium, 17 in NFB medium and 17 in LGI medium. The isolates were morphologically characterized and grouped with this features. From this groups were selected 80 representative isolates to genetic characterization. This isolates had their DNA extracted using the kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega®), according to manufacturer's specification. The DNA of 80 isolates was analyzed by BOX-PCR. For the construction of the dendrogram, the similarity matrices were calculated by Jaccard coefficient and the grouping of similarity matrices using the UPGMA algorithm (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Isolates were grouped and representatives of each group were selected for taxonomic identification by 16S rDNA gene sequencing and for physiological characterization by phosphates solubilization, indole compounds production and siderophores production. After this, the most promising isolates of BRA 19186, BRA 9610 and BRA 23540 genotypes, were tested in 3 greenhouse experiments. The BOX-PCR analysis showed high genotypic diversity, forming 55 isolates grouped with 70% similarity, being obtained 11 groups in the LG medium, none similar group in LGI medium and only 2 similar isolates in NFB medium. Of the 55 isolates tested, 73% of isolates produced siderophores, only 25% solubilized phosphates and 9% produced indolic compounds. We sequenced 30 isolates, 16 isolates belonging to the genus *Bacillus*, 6 isolates to the genus *Rhizobium*, 2 to the genus *Burkholderia*, 2 to *Pseudomonas* genus, 1 isolate to *Dyadobacter*, 1 to the genus *Acinetobacter*, 1 isolated to the genus *Mycobacterium* and 1 isolated to the *Azospirillum* genus. We obtained on the greenhouse experiments, gains on the biometrics variables and on the shoot dry matter up to 56%. There are difference in the inoculation answer in relation to mowing regimes, genotype and isolates tested on the experiments.

**Keywords:** Diversity. Promotion of Plant Growth. Tropical grasslands.

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Genótipos de *Paspalum* oriundos do BAG da Embrapa Pecuária, Sudeste, SP. a) BRA25020; b) BRA12254; c) BRA649; d) BRA19186; e) BRA3824; f) BRA12424; g) BRA11401; h) BRA12700; i) BRA23540; j) BRA9610.....8
- Figura 2.** Vista parcial dos experimentos de inoculação em 3 genótipos de *Paspalum* sp. aos 68 dias após o plantio. ....14
- Figura 3.** Dendrograma de similaridade de 14 isolados oriundos de 10 genótipos de *Paspalum* sp e da estirpe CBAMC (BR 11145- *Azospirillum amazonense*) a partir da caracterização morfofocultural em meio LGI sólido, utilizando análise de agrupamento por médias não ponderadas (UPGMA) e o índice de Jaccard como distância pelo programa estatístico PAST versão 2.17 c. ....16
- Figura 4.** Dendrograma de similaridade de 9 isolados oriundos de 10 genótipos de *Paspalum* sp e da estirpe Sp 245 (BR 11005- *Azospirillum brasilense*) a partir da caracterização morfofocultural em meio NFB sólido, utilizando análise de agrupamento por médias não ponderadas (UPGMA) e o índice de Jaccard como distância pelo programa estatístico PAST versão 2.17 c . ....17
- Figura 5.** Aspecto morfofocultural dos isolados crescidos em Nfb e LGI com 4 dias. a) isolado 1 N; b) isolado 13 N; c) estirpe CBAMC- *A. amazonense*; d) isolado 3 N; e) isolado 13 N; f) 12LI; g) isolado 6N; h) Estirpe SP 245- *A. brasilense* i) isolado 4LI.....17
- Figura 6.** Aspecto morfofocultural de isolados bacterianos crescidos em meio LG por 4 dias. a) isolado 2 LG; b) isolado 13LG; c) isolado 28 LG; d) isolado 38 LG; e) isolado 96 LG; f) isolado 76 LG; g) isolado 84 LG h) isolado 87 LG; i) isolado 122 LG; j) isolado 124LG. ....18
- Figura 7.** Dendrograma de similaridade de 105 isolados provenientes do meio LG isolados oriundos de 10 genótipos de *Paspalum* sp e da estirpe AP 18 (*A. paspali*) a partir da caracterização morfofocultural em meio LG sólido. ....19
- Figura 8.** Reação de Gram dos isolados: a) 87 LG; b) 6 LG; c) 3 N; d) 112 LG; e) 1 N; f) 4 LI; g) 13 LI; h) Estirpe sp7 (BR 11001- *A. brasilense*) e i) 79 LG. ....20
- Figura 9.** Dendrograma de similaridade para o grupamento dos perfis de BOX-PCR dos isolados oriundos de 10 genótipos de *Paspalum* em meio de cultura LG. A estirpe AP18 de *A. paspali* foi incluída no grupamento. A similaridade foi calculada usando o coeficiente de Jaccard e agrupamento UPGMA.....21
- Figura 10.** Dendrograma de similaridade para o grupamento dos perfis de BOX-PCR dos isolados oriundos de 10 genótipos de *Paspalum* em meio de cultura NFB. A estirpe BR11005 de *A. brasilense* foi incluída no grupamento. A similaridade foi calculada usando o coeficiente de Jaccard e agrupamento UPGMA.....22
- Figura 11.** Dendrograma de similaridade para o grupamento dos perfis de BOX-PCR dos isolados oriundos de 10 genótipos de *Paspalum* em meio de cultura LGI. A estirpe BR 11145 de *A. amazonense* foi incluída no grupamento. A similaridade foi calculada usando o coeficiente de Jaccard e agrupamento UPGMA. ....22
- Figura 12.** Capacidade de produção de AIA in vitro pelos isolados de genótipos de *Paspalum* e a estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* crescidas em meio DYGS suplementado

- com 200 µg ml de L-Triptofano-1 após 48h. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Skott-knot à 5% de probabilidade. Média de três repetições.....24
- Figura 13.** Solubilização de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  em meio sólido NBRIP pelas bactérias referência, PAL-5 e AC1 e pelos isolados dos 10 genótipos de *Paspalum*, aos 14 dias após o crescimento.....25
- Figura 14.** Produção de Sideróforos por isolados bacterianos de 10 genótipos de *Paspalum* aos 14 dias após crescimento em meio LG, NFB e LGI, acrescido de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  à 0,1%, sem indicador e CAS, utilizando a estirpe ZAE 94 como controle positivo. a) ZAE 94; b) 3N; c) 96LG; d) 14LI; e)123LG; f)13LG; g) 21LG; h) 105LG; 39LG como não produtora.....25
- Figura 15.** Acúmulo de massa seca de parte aérea de plantas de *P. regnellii* coletadas aos 38 dias após o plantio e inoculadas com os isolados bacterianos 74LG, 5N, 41LG e a estirpe Sp 245. Média de 6 repetições. Letras iguais minúsculas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.....28
- Figura 16.** Acúmulo de massa seca de parte aérea de plantas de *P. regnellii* coletadas aos 68 dias após o plantio e inoculadas com os isolados bacterianos 74LG, 5N, 41LG e a estirpe Sp 245. Média de 6 repetições. Letras iguais minúsculas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.....28
- Figura 17.** Acúmulo de massa seca da parte aérea de plantas de *P. atratum* cv. Pojuca coletadas aos 38 dias após o plantio e inoculadas com os isolados bacterianos 122 LG, 121 LG, 123 LG e a estirpe Sp 245. Média de 6 repetições. Letras iguais minúsculas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. ....29
- Figura 18.** Acúmulo de massa seca da parte aérea de plantas de *P. atratum* cv. Pojuca coletadas aos 68 dias após o plantio e inoculadas com os isolados bacterianos 122LG, 121LG, 123LG e a estirpe Sp 245. Média de 6 repetições. Letras iguais minúsculas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. ....30
- Figura 19.** Acúmulo de massa seca de plantas de *P. malacophyllum* coletadas aos 38 dias após o plantio e inoculadas com os isolados bacterianos 112LG, 18N, 115LG e a estirpe Sp 245. Média de 6 repetições. Letras iguais minúsculas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.....31
- Figura 20.** Acúmulo de massa seca de plantas de *P. malacophyllum* coletadas aos 68 dias após o plantio e inoculadas com os isolados bacterianos 112LG, 18N, 115LG e a estirpe Sp 245. Média de 6 repetições. Letras iguais minúsculas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.....31

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Lista dos genótipos de <i>Paspalum</i> e características de um Latossolo Vermelho Amarelo que foram utilizados no isolamento de bactérias diazotróficas associados à raiz e ao solo rizosférico. ....	7
<b>Tabela 2.</b> Análise química do horizonte A de um planossolo, série Itaguaí, utilizado no experimento. ....	13
<b>Tabela 3.</b> Contagem de bactérias associados à raiz e ao solo rizosférico em 10 genótipos de <i>Paspalum</i> sp. pelo método do número mais provável (NMP) e pelo número de unidades formadoras de colônia (UFC). Valores médios de 3 repetições. ....	15
<b>Tabela 4.</b> Análise de similaridade do seqüenciamento parcial do gene 16S rDNA entre os isolados bacterianos representativos e as seqüências depositadas no banco de dados NCBI. ....	23
<b>Tabela 5.</b> Índice de Solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ pelas estirpes referência e pelos isolados bacterianos oriundos de genótipos de <i>Paspalum</i> em meio de cultura sólido NBRIP, avaliação aos 7 e 14 dias de incubação. ....	24
<b>Tabela 6.</b> Produção de Sideróforos por isolados bacterianos oriundos de 10 genótipos de <i>Paspalum</i> aos 8 dias após crescimento em meio sólido LG, NFB e LGI, acrescido de $\text{NH}_4\text{Cl}$ à 0,1%, sem indicador e CAS, utilizando a estirpe ZAE 94 como controle positivo. ....	26
<b>Tabela 7.</b> Efeito da inoculação de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal em plantas de <i>P. regnellii</i> aos 38 dias após o plantio e aos 68 dias após o plantio (DAP) no número de perfilhos (Perf), altura até a lígula da folha mais jovem (Altc), número de folhas da touceira do perfilho principal (Perf), o produto do comprimento pela largura da folha mais jovem (CxLf) e altura total aos 68 DAP (Altt). Dados médios de 6 repetições. ....	27
<b>Tabela 8.</b> Efeito da inoculação de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal em plantas de <i>P. atratum</i> cv. Pojuca aos 38 dias após o plantio e aos 68 dias após o plantio (DAP) no número de perfilhos (NF), altura até a lígula da folha mais jovem (Altc), número de folhas da touceira do perfilho principal (NF), o produto do comprimento pela largura da folha mais jovem (CxLf) e altura aos 68 DAP (Altt). Dados médios de 6 repetições. ....	29
<b>Tabela 9.</b> Efeito da inoculação de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal em plantas de <i>P. malacophyllum</i> aos 38 dias após o plantio (38DAP) e aos 68 dias após o plantio (68 DAP) no número de perfilhos (Perf), altura até a lígula da folha mais jovem (Altc), número de folhas da touceira do perfilho principal (NF), o produto do comprimento pela largura da folha mais jovem (CxLf) e altura aos 68 DAP (Altt). Dados médios de 6 repetições. ....	30
<b>Tabela 10.</b> Lista da origem dos isolados de bactérias diazotróficas obtidas dos 10 genótipos de <i>Paspalum</i> sp. ....	40

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1. Pastagens Tropicais.....	2
2.2. O gênero <i>Paspalum</i> .....	3
2.3. Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCP) .....	4
2.3.1. Fixação biológica do nitrogênio.....	4
2.3.2. Produção de compostos indólicos .....	5
2.3.3. Solubilização de fosfatos inorgânicos .....	5
2.3.4. Produção de sideróforos .....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
3.1. Contagem e Isolamento de Bactérias Diazotróficas Associadas aos Genótipos de <i>Paspalum</i> .....	7
3.2. Estocagem dos Isolados .....	8
3.3. Caracterização Fenotípica de Bactérias Diazotróficas Isoladas de <i>Paspalum</i> sp. ....	9
3.3.1. Morfologia de colônia .....	9
3.3.2. Reação de Gram .....	9
3.4. Caracterização Molecular .....	9
3.4.1. Extração de DNA .....	9
3.4.2. BOX-PCR .....	10
3.4.3. Amplificação do gene 16S RNAr .....	10
3.4.4. Sequenciamento dos fragmentos de 16S DNAr.....	11
3.4.5. Análise de Similaridade e Filogenia .....	11
3.5. Avaliação da Capacidade Funcional dos Isolados Obtidos de Genótipos de <i>Paspalum</i> ...	11
3.5.1. Solubilização de fosfatos.....	11
3.5.2. Produção de ácido-3-indolacético .....	11
3.5.3. Produção de sideróforos .....	12
3.6. Experimento de Inoculação em Casa de Vegetação .....	12
3.6.1. Preparo do inoculante e inoculação.....	12
3.6.2. Substrato.....	13
3.6.3. Genótipos utilizados.....	13

3.6.4. Delineamento experimental .....	13
3.6.5. Variáveis analisadas .....	13
3.6.6. Experimento 1 .....	13
3.6.7. Experimento 2 .....	14
3.6.8. Experimento 3 .....	14
3.6.9. Análise estatística.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	15
4.1. Contagem e Isolamento de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio.....	15
4.2. Caracterização Fenotípica dos Isolados Bacterianos Associados à 10 Genótipos de <i>Paspalum</i> .....	15
4.2.1. Caracterização em meio de cultura LGI dos isolados.....	15
4.2.2. Caracterização em meio de cultura NFB .....	16
4.2.3. Caracterização em meio de cultura LG .....	17
4.2.4. Reação coloração de Gram.....	20
4.3. Caracterização Molecular dos Isolados Associados à 10 Genótipos de <i>Paspalum</i> .....	20
4.3.1. Extração de DNA .....	20
4.3.2. BOX-PCR .....	20
4.3.3. Sequenciamento .....	22
4.4. Caracterização Fisiológica dos Isolados Associados à 10 Genótipos de <i>Paspalum</i> .....	23
4.4.1. Avaliação da produção de compostos indólicos (AIA).....	23
4.4.2. Solubilização de fosfatos.....	24
4.4.3. Produção de sideróforos.....	25
4.4.4. Capacidade de promoção de crescimento vegetal dos isolados.....	26
4.5. Experimentos de Inoculação .....	27
4.5.1. Experimento 1: Efeito da inoculação em <i>Paspalum regnellii</i> .....	27
4.5.2. Experimento 2: Efeito da Inoculação em <i>Paspalum atratum</i> cv. Pojuca.....	28
4.5.3. Experimento 3: Efeito da inoculação em <i>P. malacophyllum</i> .....	30
5. CONCLUSÃO.....	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	33
7. ANEXOS .....	40

## 1. INTRODUÇÃO

A pecuária é um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro e consequentemente da economia nacional. O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, é o maior exportador de carne bovina, segundo maior produtor de carne e sexto maior produtor de leite (USDA, 2015).

Dos cerca de 173 milhões de hectares de pastagens no Brasil, 117 milhões de hectares são de pastagens cultivadas, com uma lotação média de 1 animal. ha<sup>-1</sup>. A degradação das pastagens ocasiona uma queda acentuada na produtividade da carne, além de ocasionar danos ambientais, com efeitos nos recursos hídricos e agravamento dos gases de efeito estufa (GEE). (MACEDO et al., 2013).

O manejo da fertilidade do solo em pastagens deve ser feito de forma eficiente, de modo que os nutrientes que foram retirados para a alimentação animal possam ser reinseridos no solo. Entre os nutrientes que são mais exportados para os animais está o nitrogênio, que promove diversas alterações fisiológicas em gramíneas forrageiras, como o número, tamanho, massa e taxa de aparecimento de perfilho e folhas, e alongamento do colmo, que são fatores importantes na produção de massa seca e valor nutritivo da planta forrageira, resultando na elevação de índices zootécnicos (CORSI, 1993).

Atualmente, a crescente preocupação com a poluição dos recursos hídricos e atmosférica pelo uso de N-fertilizante, associado ao elevado custo energético para sua obtenção, tem estimulado a busca de alternativas que possibilitem maior eficiência da adubação nitrogenada (AMADO et al., 2002).

O nitrogênio é um dos elementos minerais mais importantes para a produção das culturas. Embora presente em abundância na atmosfera (78%) na forma de N<sub>2</sub>, este elemento não está prontamente disponível para as plantas, uma vez que a ligação tripla e covalente desta molécula não pode ser rompida pelas plantas (HUNGRIA et al., 2000).

Diversos organismos do solo desempenham papel importante na ciclagem de nutrientes. Um desses processos é a fixação biológica de nitrogênio atmosférico, que é realizada por microrganismos procarióticos conhecidos como diazotróficos. Os diazotróficos podem ser de vida livre, estar associados a espécies vegetais ou estabelecer simbiose com leguminosas. Os estudos com bactérias diazotróficas são de grande importância, devido à contribuição destas para o fornecimento de nitrogênio a diversos ecossistemas, naturais ou manejados. (MOREIRA et al., 2010).

Além de fixar o nitrogênio atmosférico, estas bactérias são descritas por ser capazes de produzir substâncias reguladoras de crescimento vegetal, solubilizar fosfato, atuar como antagonistas a espécies patogênicas, além de influenciarem no metabolismo nitrogenado da planta, sendo consideradas também como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas - RPCP (BALDANI & BALDANI, 2005; MOREIRA et al., 2010, HUNGRIA, 2011; JAMES & BALDANI, 2012;). Dentre as substâncias reguladoras de crescimento vegetal produzidas pelas RPCP, destaca-se a síntese de ácido indol acético e de outros compostos indólicos (BHATTACHARYYA & JHA, 2012).

É preciso avançar nos estudos iniciados por Döbereiner e realizar novos estudos em genótipos de *Paspalum* visando encontrar espécies de bactérias diazotróficas com a mesma relação ecológica descrita anteriormente em *Paspalum notatum* que aumentem a sustentabilidade das pastagens tropicais e consequentemente aumente a produtividade destas. Este trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar estirpes eficientes do solo rizosférico e das raízes na promoção de crescimento vegetal em 10 genótipos de *Paspalum*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Pastagens Tropicais

A pecuária é um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro e consequentemente da economia nacional. O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, é o maior exportador de carne bovina, segundo maior produtor de carne e sexto maior produtor de leite (USDA, 2015).

O rebanho bovino brasileiro proporciona o desenvolvimento de dois segmentos lucrativos. As cadeias produtivas da carne e leite. O valor bruto da produção desses dois segmentos, estimado em R\$ 67 bilhões, aliado a presença da atividade em todos os estados brasileiros, evidenciam a importância econômica e social da bovinocultura em nosso país. As pastagens são o principal suprimento alimentar da pecuária brasileira e compõem a maior parte da dieta dos animais de nosso rebanho (MISTURA et al., 2006).

As gramíneas forrageiras cultivadas mais importantes foram introduzidas da África e pertencem, em sua maioria, aos gêneros *Brachiaria*, *Panicum* e *Andropogon* (ANDRADE, 1994; MACEDO, 1997).

Dos cerca de 173 milhões de hectares de pastagens no Brasil, 117 milhões de hectares são de pastagens cultivadas, com uma lotação média de 1,0 animal. ha<sup>-1</sup>.

Estima-se que mais de 70% das pastagens cultivadas encontra-se em algum estágio de degradação. A grande área de pastagem recoberta, quase em monocultivo, são cultivadas em solos de baixa fertilidade aliado ao manejo inapropriado causando grande risco à Pecuária brasileira. A degradação das pastagens ocasiona uma queda acentuada na produtividade da carne. Por exemplo, em uma pastagem degradada a produtividade é de aproximadamente 2 arrobas.ha<sup>-1</sup>.ano<sup>-1</sup>, enquanto que em uma pastagem recuperada e bem manejada pode-se atingir em média 12 arrobas.ha<sup>-1</sup>.ano.

Além disto, a degradação das pastagens ocasiona danos ambientais, com efeitos nos recursos hídricos e agravamento dos gases de efeito estufa (GEE) (MACEDO et al., 2013).

O Plano Setorial de Mitigação e de Adaptação às Mudanças Climáticas para a Consolidação de uma Economia de Baixa Emissão de Carbono na Agricultura (Plano ABC) é um dos planos setoriais elaborados de acordo com o artigo 3º do Decreto nº 7.390/2010 e tem por finalidade a organização e o planejamento das ações a serem realizadas para a adoção das tecnologias de produção sustentáveis, selecionadas com o objetivo de responder aos compromissos de redução de emissão de Gases de Efeito Estufa (GEE) no setor agropecuário assumidos pelo país durante a 15ª Conferência das Partes – COP15 ocorrida em Copenhague, no ano de 2009. Como ações mitigadoras dos GEE inseridos no plano ABC que visam a redução entre 36,1% e 38,9% até 2020 estão a recuperação de 15 milhões de hectares de pastagens degradadas e ampliar o uso da fixação biológica de Nitrogênio em 5,5 milhões de hectares (MAPA, 2015).

O manejo da fertilidade do solo em pastagens deve ser feito de forma eficiente, de modo que os nutrientes que foram retirados para a alimentação animal possam ser reinseridos no solo. Entre os nutrientes que são mais exportados para os animais está o nitrogênio, que promove diversas alterações fisiológicas em gramíneas forrageiras, como o número, tamanho, massa e taxa de aparecimento de perfilho e folhas, e alongamento do colmo, que são fatores importantes na produção de massa seca e valor nutritivo da planta forrageira, resultando na elevação de índices zootécnicos (CORSI, 1993). Atualmente, a crescente preocupação com a poluição dos recursos hídricos e atmosférica pelo uso de N-fertilizante, associado ao elevado custo energético

para sua obtenção, tem estimulado a busca de alternativas que possibilitem maior eficiência da adubação nitrogenada (AMADO et al., 2002).

## 2.2. O gênero *Paspalum*

Aproximadamente 75% das espécies de *Paspalum* conhecidas, ocorrem no Brasil, fazendo parte das mais variadas formações vegetais em diferentes condições ecológicas. Assim, são conhecidas espécies tipicamente hidromórficas nos grandes rios da Amazônia; espécies xerófilas nas condições de “Cerrado” do Centro-Oeste e do Nordeste; espécies esciófilas, fazendo parte dos estratos inferiores das formações selváticas; espécies caracteristicamente heliófilas comuns nos “campos” de todo o país; espécies psamófilas como componentes das primeiras etapas de sucessão vegetal litorânea e espécies casmófilas como representantes da xerosere.

Praticamente não se consegue identificar uma formação vegetal brasileira sem que haja uma espécie de *Paspalum* fazendo parte dos seus componentes (BARRETO, 1974; BATISTA & NETO, 2000).

O gênero *Paspalum* é um dos mais importantes gêneros na tribo paniceae devido ao elevado número de espécies que apresenta e à sua ampla distribuição geográfica habitando principalmente as regiões de clima tropical e subtropical da América, com poucas espécies na África e Ásia (ALISCIONI, 2002). Possui aproximadamente 330 espécies (ZANOTTI et al., 2010).

No Brasil o gênero é representado por aproximadamente 210 espécies (VALLS & OLIVEIRA, 2015), ocupando um lugar de destaque por englobar o maior número de espécies nativas e por apresentar potencial forrageiro. (ALLEM & VALLS, 1987).

A importância das espécies de *Paspalum* como pastagens cultivadas vem sendo evidenciada por vários autores, os quais, na sua maioria, se referem à grande variabilidade inter e intraespecífica, o que sugere ser a América do Sul o centro de origem e diversificação genética das espécies deste gênero (CHASE, 1937; BURTON, 1945; MANNETJE, 1961; BURTON, 1962; BURTON, 1967; BATISTA e GODOY, 1997; BATISTA e NETO, 2000; MEIRELLES et al., 2012).

Estas espécies, sendo nativas de nossos ecossistemas, apresentam menor risco de provocar algum desequilíbrio ecológico, quando comparadas com espécies exóticas. A grande variabilidade genética disponível favorece projetos de melhoramento, visando à obtenção de cultivares mais adaptadas a determinados nichos ecológicos. (BATISTA & NETO, 2000).

A Embrapa Pecuária Sudeste mantém banco ativo de germoplasma de espécies do gênero *Paspalum*, com 320 acessos de 37 espécies coletadas em várias regiões do Brasil e tem desenvolvido um programa de obtenção de novas cultivares com base na variabilidade genética deste material (BATISTA & GODOY, 2000).

A espécie de *Paspalum regnellii*, descrita por Mez (1917), pertence ao grupo botânico Virgata, apresenta plantas perenes, de hábito cespitoso. Sua distribuição está concentrada nas regiões subtropicais do Brasil, do Paraguai e da Argentina, embora plantas desta espécie também tenham sido encontradas nas regiões tropicais do Brasil, principalmente nos Estados de São Paulo e Minas Gerais.

Dentre os acessos, o BRA-19186 de *P. regnellii*, apresenta resultados promissores quanto à produção de forragem (Batista e Godoy, 2000) como, também, resultados satisfatórios quanto ao ganho de peso em bovinos, submetidos ao manejo intensivo (CRUZ et al., 2006). O acesso BRA-019186 foi coletado em região montanhosa no município de Rio Claro, Estado de São Paulo, nas coordenadas 21°24' latitude sul e 47°54' longitude oeste, à altitude aproximada de 500 m. São plantas vigorosas, com altura das touceiras sem inflorescência, variando de 0,80 a 1,20 m, em solos de fertilidade média.

A espécie *Paspalum atratum* cv. Pojuca descrita por Swallen, é uma gramínea forrageira perene, popularmente conhecida como capim-pojuca, adaptada à solos ácidos e de baixa fertilidade, indicada para áreas úmidas de baixada sujeitas à alagamentos temporários. Nativa da América do Sul, na Bolívia e no Brasil, nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais e naturalizada da Austrália, EUA e América do Sul. Possui alta aceitabilidade pelos animais, boa composição química, bom valor forrageiro, teores de proteína bruta superiores à *B. humidícola* e digestibilidade elevada. O acesso BRA 9610 foi coletado em 1986 em local próximo ao pantanal matogrossense, em Terenos, MS, nas coordenadas 20°30' S e 54° 49' W, à altitude aproximada de 530m. A sua cultivar foi lançada em 1999 pela Embrapa Cerrados.

O acesso BRA 23540 da espécie *Paspalum malacophyllum* descrita por Trinius (1836), foi coletada em Japorã, MS nas coordenadas 23°53'28'' S e 54°24'15'' W, possui hábito perene e nativa do Brasil. Ainda não existem informações sobre características forrageiras do genótipo.

### **2.3. Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCP)**

O termo rizobactérias refere-se ao fato de que o número de bactérias encontradas na rizosfera ser mais elevado do que no solo, isto é, a faixa estreita de solo que envolve a raiz (HILTNER, 1904, SMALLA et al., 2006, VAN LOON, 2007; SPAEPEN & VARDERLEYDEN, 2014).

Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCP) são bactérias do solo que causam benefícios na propriedade do solo, no crescimento vegetal e no meio-ambiente, podendo colonizar a rizosfera, a superfície das raízes das plantas ou os espaços intercelulares destas.

Muitos gêneros de bactérias são classificados como RPCP, dentre estas as bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, dentre outras. Entre as funções das RPCP estão: (i) a produção de diferentes enzimas que afetam o crescimento vegetal, a solubilização de nutrientes e conseqüentemente a sua disponibilidade (ii) a produção de diferentes fitohormônios e outros metabólitos, como o sidéforo que possuem atividade antagônica à patógenos e (iii) atenuam estresses e elevam a produtividade das culturas (MIRANSARI, 2014).

#### **2.3.1. Fixação biológica do nitrogênio**

O nitrogênio é um dos elementos minerais mais importantes para a produção das culturas. Embora presente em abundância na atmosfera (78%) na forma de N<sub>2</sub>, este elemento não está prontamente disponível para as plantas uma vez que a ligação tripla e covalente desta molécula não pode ser rompida pelas plantas (HUNGRIA et al., 2000).

Diversos organismos do solo desempenham papel importante na ciclagem de nutrientes. Um desses processos é a fixação biológica de nitrogênio que é realizada por microrganismos procarióticos conhecidos como diazotróficos. Os diazotróficos podem ser de vida livre, estar associados a espécies vegetais ou ainda estabelecer simbiose com leguminosas. Os estudos com bactérias diazotróficas são de grande importância, devido à contribuição destas para o fornecimento de nitrogênio a diversos ecossistemas naturais ou manejados. (MOREIRA et al., 2010).

No Brasil, o estudo de bactérias diazotróficas em espécies não-leguminosas foi intensificado devido ao estudo pioneiro realizado por Döbereiner (1966) em que descreve uma associação bastante específica entre *Paspalum notatum* cv. batatais e a espécie *Azorhizopilus* (syn. *Azotobacter*) *paspali* (THOMPSON & SKERMAN, 1981) estando presente em 98% das amostras de *Paspalum notatum*. A autora classificou esta relação como uma associação intermediária entre a simbiose, do gênero *Rhizobium* e as bactérias associativas.

Boddey e colaboradores em 1983, através da técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ , puderam quantificar que cerca de 20 kg de N acumulado.  $\text{ha}^{-1}.\text{Ano}^{-1}$  é oriunda da associação de *A. paspali* com esta gramínea.

A contribuição da FBN associativa à nutrição vegetal não é tão significativa como as simbioses, entretanto, se for considerada a grande extensão de terras recobertas por gramíneas e cereais, esta se torna importante, em termos globais (MOREIRA et al., 2010).

### 2.3.2. Produção de compostos indólicos

Hormônios vegetais são moléculas bioquímicas que regulam diferentes atividades das plantas. As RPCP são capazes de sintetizar diversos fitohormônios como citocininas, giberelinas, ácido abscísico e auxina. A Auxina é a denominação de um conjunto de substâncias responsáveis pela expansão e divisão das células vegetais que podem atuar a partir da sinalização ou em conjunto com outros hormônios vegetais.

O ácido 3 indole acético (AIA) é a molécula de auxina mais abundante e ativa em sistemas biológicos, sendo produzida por diversos organismos incluindo bactérias. Estima-se que 80% das bactérias isoladas da rizosfera produzem compostos indólicos. A sua síntese pode ocorrer por múltiplas rotas até mesmo em um único indivíduo, no entanto o triptofano é o seu principal precursor (COSTACURTA & VANDERLEYDEN 1995; PATTEN & GLICK 1996;).

São relatados aumentos na produção de AIA em função do crescimento de células bacterianas em meio de cultivo suplementado com triptofano (PATTEN & GLICK 1996; KHALID et al., 2004; SPAEPEN & VANDERLEYDEN, 2014).

Após a inoculação com RPCP há uma modificação na arquitetura da raiz da planta que ocasiona o aumento de pêlos radiculares e raízes laterais e encurvamento do comprimento das raízes, havendo um aumento da superfície radicular total que proporciona uma maior absorção de nutrientes do solo e de exsudação radicular, estimulando ainda mais a colonização pelas rizobactérias (XIE et al. 1996; DOBBELAERE et al. 1999; DOBBELAERE et al. 2003; SPAEPEN & VANDERLEYDEN, 2014).

### 2.3.3. Solubilização de fosfatos inorgânicos

O Fósforo (P) é um dos nutrientes mais requeridos no crescimento das plantas, sendo um componente estrutural de muitas coenzimas, fosfo-proteínas, fosfolipídeos, do ácido desoxirribonucléico (ADN) de todos os organismos vivos e é responsável pela transferência e armazenamento de energia que é usada para o crescimento e reprodução. O fósforo é importante em vários processos fisiológicos das plantas, especialmente na fotossíntese, metabolismo de carbono e formação de membrana (GYANESHWAR et al, 2002; ANAND et al., 2016).

Apesar disto, cerca de 95 a 99% do fósforo presente no solos encontra-se indisponível para as plantas devido a fixação de P que encontra-se adsorvido nas partículas minerais do solo ou precipitado pelos íons  $\text{Al}^{+3}$  e  $\text{Fe}^{+3}$  na solução do solo ( WU, 2005; SHARMA et al., 2013; ANAND et al., 2016).

Os microrganismos do solo desempenham um papel fundamental na dinâmica de P no solo e subsequente da disponibilidade deste para as plantas. Microrganismos Solubilizadores de Fosfatos (MSP), especialmente as bactérias, aumentam a solubilização de compostos de fósforo insolúveis através da liberação de ácidos e enzimas fosfatase e fitase que estão presentes em vários microrganismos do solo (VASSILEVA et al, 2000; ANAND et al., 2016).

Gêneros de bactérias como, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus* e *Flavobacterium* e de fungos como, *Penicillium*, *Sclerotium*, *Aspergillus* são descritos como solubilizadores de fósforo. Durante o processo de conversão, uma molécula de Fósforo é

assimilada pelos microrganismos e parte deste P é disponibilizada para as plantas (SHARMA et al., 2013; ANAND et al., 2016).

#### 2.3.4. Produção de sideróforos

O ferro é o quarto elemento mais abundante na crosta terrestre (HUBER, 2005; GAMIT & TANK, 2014) e atua em vários processos metabólicos, como o ciclo do ácido tricarboxílico, na cadeia de transporte de elétrons, na fosforilação e na fotossíntese (MESSAGEIRO & BARCLAY, 1983; FARDEAU et al., 2011). Também regula a biossíntese de porfirinas, vitaminas, antibióticos, toxinas, citocromos, sideróforos, pigmentos e compostos aromáticos e síntese de ácidos nucleicos (MESSENGER & BARCLAY, 1983). Além disso, é responsável pela formação de biofilme microbiano à medida que regula a motilidade superficial de microrganismos (GLICK et al., 2010, CAI et al., 2010).

Sideróforos (*Sideros*, ferro e *pheros*, portador) são moléculas orgânicas com baixo peso molecular sintetizadas por microrganismos que são agentes quelantes de metais que capturam o ferro ferroso insolúvel de diferentes habitats (NAGOBA & VEDPATHAK, 2011).

O Sideróforo liga-se primeiro com ferro ( $\text{Fe}^{+3}$ ) firmemente e então o complexo sideróforo-ferro move-se para dentro da célula através da membrana celular utilizando os receptores específicos de sideróforos (AHMED & HOLMSTROM, 2014).

Mais de 500 sideróforos diferentes foram relatados, dos quais 270 foram bem caracterizados (BOUKHALFA et al., 2003), e os demais não foram caracterizadas e suas funções ainda não foram determinadas (ALI & VIDHALE, 2013)

Existem vários métodos de detecção da produção dos sideróforos, dentre estes, o uso do método CAS (Azul Cromo-Azuro) ágar proposto por Schwyn & Neilands (1987), a produção é determinada pela alteração na coloração do meio.

Os sideróforos podem ser considerados uma alternativa ecológica aos defensivos químicos no setor agrícola, são relatados o potencial de estirpes de *Pseudomonas fluorescens* como promotora de crescimento vegetal e controle biológico de *Erwinia carotovora* (KLOEPPER et al., 1980), da inibição de fungos fitopatogênicos, tais como *Phytophthora Parasitica*, *Pythium ultimum* e *Sclerotinia sclerotiorum* (SEUK et al, 1988, HAMDAN et al, 1991; MCLOUGHLIN et al, 1992) e biorremediação de metais pesados, por exemplo, o  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$  (NAIR et al., 2007; RAJKUMAR et al, 2010; SAHA, 2015).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

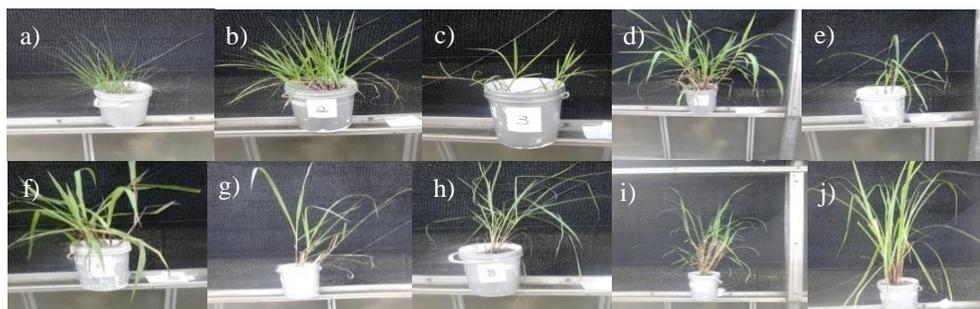
#### 3.1. Contagem e Isolamento de Bactérias Diazotróficas Associadas aos Genótipos de *Paspalum*

As amostras integrais das plantas de 10 genótipos de *Paspalum* sp e o solo rizosférico associados à estas foram oriundas do Banco Ativo de Germoplasma (BAG), situado na Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos, SP (Coordenadas geográficas 21° 57' de latitude Sul e 47° 56' de longitude Oeste, 856 metros de altitude média, precipitação anual de 1476 mm e temperatura média anual de 19,8°C, dentro do ecossistema de campos e bosques, com clima tropical de altitude. O solo do BAG é classificado como um Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Lista dos genótipos de *Paspalum* e características de um Latossolo Vermelho Amarelo que foram utilizados no isolamento de bactérias diazotróficas associados à raiz e ao solo rizosférico.

Espécie	Genótipo	pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	M.O.
		(CaCl <sub>2</sub> )	mg dm <sup>-3</sup>				mmolc dm <sup>-3</sup>		g kg <sup>-1</sup>
<i>Paspalum notatum</i>	BRA025020	4,4	2	0,8	14	2	3	37	24
<i>Paspalum notatum</i>	BRA012254	4,6	2	0,8	24	6	2	33	20
<i>Paspalum modestum</i>	BRA006491	4,6	20	1,4	17	6	3	38	48
<i>Paspalum regnellii</i>	BRA019186	4,4	7	0,7	21	6	2	40	32
<i>Paspalum guenoarum</i>	BRA003824	4,2	3	0,8	9	4	2	50	42
<i>Paspalum</i> sp.	BRA012424	4,7	5	0,7	18	7	1	35	34
<i>Paspalum glaucescens</i>	BRA011401	4,7	7	1,2	11	5	2	41	42
<i>Paspalum plicatulum</i>	BRA012700	5,3	11	1,1	27	13	1	39	40
<i>Paspalum malacophyllum</i>	BRA023540	4,7	9	0,7	18	7	2	38	39
<i>P. atratum</i> cv. <i>Pojuca</i>	BRA009610	4,2	4	0,7	10	3	4	71	43

As amostras foram coletadas em 8 de Abril de 2015 e guardadas em sacos de polietileno e transportados de carro até a Embrapa Agrobiologia, onde foram acondicionadas em vasos contendo 5 kg de Areia e vermiculita na proporção 2:1 em casa de vegetação sob condição estéril estas plantas tiveram sua parte aérea podada e após rebrota foi realizada uma adubação com solução de macronutrientes e micronutrientes após 15 dias da rebrota para a reposição de nutrientes, onde permaneceram para posterior isolamento no Laboratório de Gramíneas da Embrapa Agrobiologia, RJ (Figura 1).



**Figura 1.** Genótipos de *Paspalum* oriundos do BAG da Embrapa Pecuária, Sudeste, SP. a) BRA25020; b) BRA12254; c) BRA649; d) BRA19186; e) BRA3824; f) BRA12424; g) BRA11401; h) BRA12700; i) BRA23540; j) BRA9610.

As plantas foram coletadas e separadas em raiz e parte aérea. Para a retirada do solo rizosférico, as raízes foram secas ao ar e o solo aderido a estas foi retirado manualmente. As raízes, sem o solo rizosférico, foram lavadas em três passagens sucessivas em água destilada estéril e fragmentadas em pedaços menores. O solo aderido às raízes e as raízes foram homogeneizados e uma amostra composta e 5 g foi transferida para tubos falcon contendo 45 mL de solução salina. As amostras das raízes foram então trituradas com o auxílio de um pistilo e um grau de porcelana com 45 mL de solução salina o que consistiu na diluição  $10^{-1}$ .

Após as amostras originais correspondentes à suspensão em solução salina foram diluídas em série, transferindo 1 mL da suspensão anterior a tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina, até a diluição  $10^{-6}$  para raiz e solo rizosférico. Em seguida uma alíquota de 0,1 mL das diluições  $10^{-4}$  até a diluição  $10^{-6}$  foi utilizada para inocular, em triplicata, frascos contendo 5 mL dos meios NFB, LGI semi-sólidos semi-seletivos para bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* spp. e, em placas contendo 25 mL de meio LG sólido semi-seletivo para *Azotobacter* sp. (DÖBEREINER *et al.*, 1995).

Para o isolamento, foram utilizados os meios de cultivo livres de Nitrogênio, semi-sólidos LGI contendo como fonte de carbono sacarose a 0,5% para *Azospirillum amazonense* e meio NFB para as espécies *A. brasilense* e *A. lipoferum* que contém como fonte de carbono ácido málico a 0,5%. Os frascos inoculados foram incubados a 30°C por um período de 5 dias e a formação de película na superfície do meio, característica comum às bactérias diazotróficas associativas, foi observada. Após o desenvolvimento da película foram realizadas 3 repicagens sucessivas nos referidos meios para confirmação da capacidade de fixar nitrogênio, isto é formarem película. Após, as culturas foram riscadas em placas de meio sólido (NFB e LGI) acrescidos de 40 mg L<sup>-1</sup> de extrato de levedura para caracterização fenotípica e uma colônia foi inoculada em meio semissólido para checar novamente a formação da película e a purificação foi feita em meio Batata (DÖBEREINER *et al.*, 1995; BALDANI *et al.*, 2014).

Foi também utilizado o meio sólido LG + CaCO<sub>3</sub> (sacarose), semi-seletivo para bactérias do gênero *Azotobacter*, onde foi verificada a correspondência entre as características fenotípicas das colônias semelhantes ao gênero *Azotobacter*. A purificação foi feita através de riscagens sucessivas em placas contendo o mesmo meio de cultivo.

A quantificação de bactérias diazotróficas (BD) por grama de tecido fresco foi feita através da técnica do número mais provável (NMP) com o uso da tabela de McCrady (DÖBEREINER *et al.*, 1995) e através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC).

### 3.2. Estocagem dos Isolados

Os isolados obtidos associados à raiz e ao solo rizosférico dos 10 genótipos de *Paspalum* foram estocados, em meio batata sólido inclinado e óleo mineral, conservados à temperatura

ambiente e em glicerol 50% conservados sob temperatura de 4°C. Os isolados estocados foram reativados em meio Dygs por 24 h, sob temperatura de 30°C e agitação constante de 150 rpm para posterior caracterização dos isolados bacterianos.

### **3.3. Caracterização Fenotípica de Bactérias Diazotróficas Isoladas de *Paspalum* sp.**

As estirpes de *Azospirillum brasilense* (Sp 245), *Nitrospirillum amazonense* (CBAMC), *Azotobacter paspali* (AP 18), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL 5) e *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE94) foram utilizadas como referência na caracterização dos isolados obtidos.

#### **3.3.1. Morfologia de colônia**

Os isolados de *Paspalum* sp, obtidos, após purificação, foram caracterizados morfológicamente nos meios de cultivo sólido dos quais foram isolados e comparados com as estirpes CBAMC de *A. amazonense*, SP 245 de *A. brasilense* e AP18 de *A. paspali* oriundas da coleção de culturas bacterianas da Embrapa Agrobiologia, RJ. As características da colônia foram avaliadas conforme a metodologia proposta por Yano et al. (1993): 1. Tamanho (mm); 2. Características ópticas (translúcida e opaca); 3. Cor; 4. Forma da colônia (circular ou irregular); 5. Elevação (plana, lente, convexa, pulvinada, umbonada ou umbilicada); 6. Borda (ondulada, lobada, denteada, filamentosa ou inteira); 7. Superfície (lisa, rugosa ou papilada); 8. Produção de muco (escasso, pouco, moderado e abundante);

#### **3.3.2. Reação de Gram**

O esfregaço dos isolados foi preparado em lâminas a partir de colônias puras crescidas nos meio sólido LG, NFB e LGI seguindo a metodologia descrita por Yano et al. (1991). Após coloração reativa, foi feita a visualização em microscópio ótico de contraste de fase na objetiva de 100x com óleo de imersão.

Para o agrupamento das características morfológicas das colônias bacterianas e da reação de gram, foi construída uma matriz binária dos dados originais, compreendendo as variações das características dos isolados e das estirpes utilizadas como referência. Para cada variação das características foram atribuídos os valores 1 ou 0, indicando presença ou ausência de determinada característica.

Os isolados, assim como as estirpes referência foram comparados com base em suas semelhanças, estimadas pelo coeficiente de Jaccard, sendo o agrupamento destes realizado pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) (Everitt, 1993). Foi então construído um dendrograma representando a similaridade intergrupos obtida pelo programa PAST (PAleontological STatistics), versão 2.17 c.

### **3.4. Caracterização Molecular**

#### **3.4.1. Extração de DNA**

Para extração de DNA procedeu-se inicialmente o crescimento das bactérias em meio de cultura líquido DYGS por 24 h sob agitação constante de 350 rpm à 30°C. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o kit Wizard® Genomic DNA purification Kit (Promega®) conforme especificação do fabricante. As amostras de DNA extraídas foram quantificadas quanto à sua concentração em espectrofotômetro NanoDrop® e quanto à pureza através da eletroforese em gel de agarose a 1% segundo Sambrook & Russell (2001).

Dois  $\mu\text{l}$  de cada amostra de DNA em diferentes concentrações conhecidas de DNA lambda, juntamente com 2  $\mu\text{l}$  de tampão da amostra (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose) foram submetidos a uma voltagem de 100 volts por 2 horas em tampão TAE 1X (0,04 M Tris acetato e 1 mM de EDTA). Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador Kodak Logic 100 (Kodak).

### 3.4.2. BOX-PCR

As reações de PCR foram realizadas com o iniciador BOX A1R (5' – CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') (VERSALOVIC et al., 1994), conforme descrito por Kaschuk et al. (2006). Cada reação de amplificação foi realizada em um volume final de 24,1  $\mu\text{L}$ , contendo 25 ng de DNA genômico; Tampão 1X; 3 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,3 mM de cada dNTP; 1 U de Taq DNA polimerase e 2  $\mu\text{M}$  do iniciador BOX A1R. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Mastercycler® gradient, programado para realizar uma desnaturação inicial de 94° C por 7 minutos; seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 minuto; a 53 °C por 1 minuto; a 65°C por 8 minutos; e uma extensão final a 65 °C por 16 minutos. Após o término da reação, 12  $\mu\text{L}$  de produto de PCR será submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,5% a uma voltagem de 65 volts ( $\sim 3,5 \text{ V cm}^{-1}$ ) por 6 horas em tampão TAE 1X. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador KODAK Gel Logic Cabinet 100. As imagens foram capturadas, arquivadas como documentos do tipo TIFF e processadas pelo programa Bionumerics versão 7.6 para Windows. As matrizes de similaridade foram calculadas pelo coeficiente de Jaccard e o agrupamento de matrizes de similaridade utilizando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean).

Com base nos resultados obtidos pela técnica de BOX-PCR, os isolados representativos de cada grupo foram selecionados para a identificação taxonômica através do seqüenciamento do gene 16S rDNA.

### 3.4.3. Amplificação do gene 16S RNAr

Na amplificação da seqüência conservada do gene 16S rRNA foi utilizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para uma reação de PCR com volume final de 50  $\mu\text{l}$ , foram utilizados 50 ng de DNA molde; tampão de reação 10X da Taq DNA polimerase (10 mmol  $\text{l}^{-1}$  de Tris-HCl pH 9 e 50 mmol  $\text{l}^{-1}$  de KCl); 1,5 mmol  $\text{l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ; 200  $\mu\text{mol l}^{-1}$  dNTP com iguais concentrações de dATP, dTTP, dCTP e dGTP; 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e, 25 pmol de cada iniciador: AMP-F [5'- GAG AGT TTG ATY CTG GCT CAG -3'] e AMP-R [5'- AAG GAG GTG ATC CAR CCG CA - 3'] (WANG et al., 1996). A reação de amplificação foi realizada em termociclador PTC 100 termocycler (MJ Research) com uma desnaturação inicial de 95 °C por 5 min, seguida de 34 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 s, anelamento a temperatura de 60 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 2 min, e uma extensão final a 72 °C por 30 min. Ao final da reação, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%.

Para a purificação dos fragmentos obtidos, 32  $\mu\text{l}$  do produto de amplificação da região 16S DNAr genômico foram precipitados em uma reação com 8  $\mu\text{l}$  de NaCl 5M e 40  $\mu\text{l}$  de polietilínoglicol 8000 22 %. Os tubos foram incubados sob temperatura de 4 °C durante a noite e centrifugados por 30 minutos a 13.000 x g. O DNA foi lavado com etanol 70% duas vezes, seco a vácuo e dissolvido em 20  $\mu\text{l}$  de água milli-Q estéril.

### 3.4.4. Seqüenciamento dos fragmentos de 16S DNAr

Para o seqüenciamento dos fragmentos dos genes 16S DNAr dos isolados bacterianos, foram utilizados 300 ng dos produtos de PCR purificados, 5,0 µM de cada iniciador, 4 µl do Kit de seqüenciamento Dye-terminator (DYEnamic ET, Amersham Biosciences) e água ultrapura (ultraPURE™, Invitrogen Co.) para um volume final de 20 µl. Os ciclos de amplificação foram constituídos de uma etapa de desnaturação a 95 °C por 20 segundos, uma etapa de anelamento 50 °C por 15 segundos e uma etapa de extensão a 60 °C por 1 minuto. Depois de 30 ciclos, foi efetuada uma última etapa de extensão a 72 °C por 4 minutos. Após a reação de seqüenciamento, as amostras foram precipitadas adicionando 1,0 µl de acetado de amônio 7,5 M e 27,5 µl de etanol 70% e incubadas a 4 °C durante a noite. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por 30 min sob temperatura de 4 °C.

O sobrenadante foi então descartado e o precipitado foi lavado com 150 µl de etanol 70% e centrifugado novamente a 13.000 x g por 5 minutos a 4 °C. As amostras foram secas ao ar, ressuspendidas em 7,5 µl de tampão de corrida e analisadas em seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosystem).

### 3.4.5. Análise de Similaridade e Filogenia

A análise de similaridade dos isolados foi realizada pelo programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com as sequências contíguas possuindo em média 1500 pares de base para o gene 16S RNAr.

## 3.5. Avaliação da Capacidade Funcional dos Isolados Obtidos de Genótipos de *Paspalum*

### 3.5.1. Solubilização de fosfatos

Para avaliar a capacidade de solubilização de fosfato insolúvel *in vitro* foi utilizado o meio de cultivo NBRIP (National Botanical Research Institute) sólido para verificar a solubilização de Cálcio (P-Ca) conforme descrito por Nautiyal et al (1999).

As bactérias foram previamente cultivadas em meio DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986) por 24 horas e a concentração celular foi ajustada para a D.O.<sub>600</sub>=0,9 -1,0 e uma alíquota de 10 µl foi inoculada na superfície da placa de Petri. Foram estabelecidas 4 alíquotas por placa e 3 placas por isolado. O diâmetro do halo de solubilização, percebido como uma área translúcida em torno da colônia foi medida após 7 e 14 dias de incubação utilizando um paquímetro digital e quantificado a partir do índice de solubilização (IS) descrito por Kumar e Narula (1999):

$$IS=A/B$$

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

### 3.5.2. Produção de ácido-3-indolacético

Os isolados foram caracterizados quanto à produção de ácido-3-indolacético através do método de microplaca descrito por Sarwar & Kremer (1995). Para este teste, 1 mL de cultura bacteriana cultivada previamente por 24 horas em meio DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986) foi inoculada em 5mL de meio DYGS suplementado com L - triptofano na concentração final de 100 µg mL<sup>-1</sup>. Os tubos permaneceram no escuro sob agitação de 150 rpm a temperatura de 30°C por 48 h. Alíquotas de 1 mL foram retiradas e centrifugadas a 5000xg por 15 minutos.

Em microplacas de 96 poços, uma alíquota de 150 µl do sobrenadante foi misturado a 100 µl do reagente de Salkowski (1 mL de 0,5 M FeCl<sub>3</sub> em 49 mL de ácido perclórico 35 %) previamente preparado. As amostras permaneceram no escuro por 30 minutos sob temperatura ambiente e a leitura de absorvância foi feita em um leitor de microplaca (Labsystem iems reader MF, Labsystem) com comprimento de onda de 540 nm. A quantificação de compostos indólicos foi avaliada utilizando-se uma curva de calibração preparada com diluições seriadas de padrões de AIA sintético (5-100 µg triptofano mL<sup>-1</sup>).

Para padronização das amostras os resultados foram expressos na unidade µg mL<sup>-1</sup> de AIA por unidade de densidade ótica (DO). Todas as amostras de AIA foram analisadas em triplicata nas placas de 96 poços e o resultado foi decorrente de uma média das três leituras e expressos em mg mL<sup>-1</sup> de AIA por unidade de DO.

### **3.5.3. Produção de sideróforos**

A avaliação foi feita baseando-se no protocolo de Schwyn e Neilands (1987), modificado por Tortora et al. (2011) com alterações. Os isolados foram previamente crescidos em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio específico dos quais foram isolados NFB, LGI e LG (livre de ferro e suplementado com 0,1% de NH<sub>4</sub>Cl, sem adição de azul de bromotimol) e incubados por 72 h à 30° C sob agitação constante de 150 rpm.

Em seguida, as células foram centrifugadas à 8000 x g por 10 minutos e o pellet foi lavado 3 vezes com água estéril deionizada e a concentração celular foi ajustada para DO<sub>560</sub> = 0,2. 4 alíquotas de 10 µl da suspensão bacteriana foi inoculada em placas de Petri contendo meio LG, NFB e LGI sólido (sem azul de bromotimol e suplementada com 0,1% NH<sub>4</sub>Cl) e Cromoazuro S (CAS) e incubada a 30°C por 7 dias. A detecção da produção de sideróforos foi avaliada de acordo com a formação de um halo roxo, laranja, verde ou amarelo em volta das colônias.

Todas as vidrarias utilizadas foram lavadas com solução de HCl 10% e enxaguadas com água deionizada antes do uso.

## **3.6. Experimento de Inoculação em Casa de Vegetação**

### **3.6.1. Preparo do Inoculante e Inoculação**

Os isolados foram crescidos em placas com meio de cultura sólido LG, NFB e meio Batata (DÖBEREINER et al., 1995), com o objetivo de verificar a pureza. Após a verificação da pureza, uma colônia de cada isolado foi inoculada em frascos do tipo Erlenmayer de 250 mL contendo 50 mL do meio DYGS que serão incubados a 30° C sob agitação constante de 150 rpm por 24 horas. Posteriormente, 15 mL da suspensão bacteriana foi inoculada, com o auxílio de uma seringa esterilizada, em sacos de polipropileno contendo 35g de turfa estéril.

Para a inoculação das sementes, a turfa foi pesada numa proporção de 10 g de turfa. kg de semente<sup>-1</sup> e foi adicionada uma solução de água e açúcar (10%) na proporção de 6 mL. kg de semente<sup>-1</sup> para que ocorra uma melhor aderência entre a semente e a turfa. As sementes foram secas ao ar livre antes do plantio.

Após a inoculação, foi realizada a contagem nas sementes inoculadas através do método do Número Mais Provável (NMP) (DÖBEREINER et al, 1995), conforme o estabelecido em protocolo oficial do MAPA que preconiza a população de no mínimo 10<sup>6</sup> células. g de semente<sup>-1</sup>.

### 3.6.2. Substrato

Para a condução do experimento foi utilizado os 20 cm superficiais de um planossolo série Itaguaí (Tabela 2) coletado no Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia.

Não foi realizada calagem, já que não havia níveis tóxicos de Al no solo e o pH estava próximo ao ideal para a cultura. Foram realizadas duas adubações com solução nutritiva para vasos para reposição de macronutrientes, com exceção do Nitrogênio, e de micronutrientes aos 29 DAP e aos 50 DAP.

**Tabela 2.** Análise química do horizonte A de um planossolo, série Itaguaí, utilizado no experimento.

pH	Al	Ca	H+Al	Mg	K	P	N
		cmolc dm <sup>-3</sup>		mg L <sup>-1</sup>		%	
5,84	0,00	1,50	2,49	0,75	33,11	5,84	0,06

### 3.6.3. Genótipos utilizados

Foram selecionados 3 genótipos de *Paspalum*: *P. regnellii* (BRA 019186), *P. atratum* cv. *Pojuca* (BR 009610) e *P. malacophyllum* (BRA 023540) para avaliar a interação entre o genótipo e a inoculação das rizobactérias. As sementes foram cedidas pela Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

### 3.6.4. Delineamento experimental

O plantio dos 3 experimentos foi realizado em 9 de novembro de 2016, em caixas de polietileno com capacidade de 15 kg contendo 12 kg de terra, conduzido em casa de vegetação sob condições não-estéreis, na Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. O delineamento de todos os experimentos foi em blocos ao acaso com seis repetições. Foram plantadas 10 sementes por vaso que permaneceram até o final do experimento (Figura 2).

### 3.6.5. Variáveis analisadas

Para avaliação das variáveis, um perfilho principal representativo de cada caixa foi marcado e mensurados a altura, medida do nível do solo até a lígula da folha mais jovem, número de folhas, comprimento x largura da lâmina foliar da folha mais jovem, massa seca da parte aérea e número de perfilhos aos 38 e aos 68 dias após o plantio (DAP), foi ainda mensurada a altura da planta após 68DAP. Foram realizados 2 cortes a 10 cm de altura do solo aos 38 dias e aos 68 dias após o plantio (DAP), a massa da parte aérea foi coletada e conduzida à estufa de circulação de ar forçada sob temperatura de 65° C por 48h e após foram pesadas em balança.

### 3.6.6. Experimento 1

O genótipo *P.regnellii* foi inoculado com 4 tratamentos de inoculação, 3 isolados bacterianos 74LG (*Rhizobium* sp.), 5N (*Bacillus* sp.) e 41LG (*Acinetobacter* sp.) e a estirpe Sp 245 (BR11005) de *A. brasilense* usada como referência, uma testemunha absoluta, uma testemunha nitrogenada contendo 75 mg dm<sup>-3</sup> de Nitrogênio, na forma de Sulfato de Amônio que foi parcelado em 2 doses aos 20 DAP e aos 32 DAP(25 mg dm<sup>-3</sup> e 50 mg dm<sup>-3</sup>).

### 3.6.7. Experimento 2

O genótipo *P. atratum* cv. Pojuca foi inoculado com 4 tratamentos de inoculação: (i) 3 isolados bacterianos 121LG (gênero não determinado), 122LG (gênero não determinado) e 123LG (*Bacillus* sp.) e a estirpe Sp 245 (BR11005) de *A. brasilense* usada como referência, (ii) uma testemunha absoluta, (iii) uma testemunha nitrogenada contendo 75 mg dm<sup>-3</sup> de Nitrogênio, na forma de Sulfato de Amônio que foi parcelado em 2 doses aos 20 DAP e aos 32 DAP (25 mg dm<sup>-3</sup> e 50 mg dm<sup>-3</sup>).

### 3.6.8. Experimento 3

O genótipo *P. malacophyllum* foi inoculada com 4 tratamentos de inoculação: (i) 3 isolados 112LG (*Pseudomonas* sp.), 115LG (não determinado) e 18N (*Bacillus* sp.) e a estirpe Sp 245 (BR11005) de *A. brasilense* usada como referência, (ii) uma testemunha absoluta e (iii) uma testemunha nitrogenada contendo 75 mg dm<sup>-3</sup> de Nitrogênio na forma de Sulfato de Amônio que foi parcelado em 2 doses aos 20 DAP e aos 32 DAP (25 mg dm<sup>-3</sup> e 50 mg dm<sup>-3</sup>).



**Figura 2.** Vista parcial dos experimentos de inoculação em 3 genótipos de *Paspalum* sp. aos 68 dias após o plantio.

### 3.6.9. Análise estatística

Foi testada a normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Cockran e Bartlett) dos dados no programa R versão 3.3.2 e homogeneidade da variância dos dados no programa R e a comparação de médias foi realizada pelo teste Scott-Knott (SCOTT e KNOTT, 1974) a 5 % de probabilidade programa SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2003).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Contagem e Isolamento de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio

O número de bactérias diazotróficas variou de não detectado à  $10^7$  células bacterianas g massa fresca<sup>-1</sup> nos 10 genótipos utilizados. Os maiores valores na contagem foram aqueles provenientes da raiz nos meios LGI e LG e no solo rizosférico no meio NFB. Nas diluições utilizadas para a contagem houveram genótipos em que não foi detectado o crescimento de bactérias diazotróficas, sendo necessária um segundo isolamento que foi realizado utilizando a inoculação em meios semi-sólidos NFB e LGI, na diluição  $10^{-1}$  (Tabela 3).

Foi obtido um total de 161 isolados de bactérias diazotróficas associadas aos 10 genótipos de *Paspalum*, sendo a maioria proveniente das raízes destes (54%) em contraste com o solo rizosférico (46%) nas condições utilizadas no estudo (Tabela 4). Destes isolados, 127 obtidos no meio LG, 17 no meio NFB e 17 no meio LGI (Tabela 4). Entretanto, apenas 130 destes isolados mantiveram-se viáveis após a estocagem.

Dados similares foram obtidos por Videira e colaboradores (2012) utilizando o método do Número Mais Provável (NMP) para quantificar o número de bactérias diazotróficas que colonizavam 2 genótipos de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) que apresentou população de diazotrofos variando de  $10^2$  à  $10^6$  g de tecido vivo<sup>-1</sup> em ambos os genótipos.

**Tabela 3.** Contagem de bactérias associados à raiz e ao solo rizosférico em 10 genótipos de *Paspalum* sp. pelo método do número mais provável (NMP) e pelo número de unidades formadoras de colônia (UFC). Valores médios de 3 repetições.

Genótipos	Raiz			Solo Rizosférico		
	NFB	LGI	LG	NFB	LGI	LG
	Log <sub>10</sub> n° cél. g de raiz <sup>-1</sup>	Log <sub>10</sub> UFC g de raiz <sup>-1</sup>	Log <sub>10</sub> n°de cél. g de solo <sup>-1</sup>	Log <sub>10</sub> UFC g de solo <sup>-1</sup>		
<i>BRA25020</i>	3,48	9,15	8,49	3,40	*-	6,63
<i>BRA12254</i>	3,40	*-	7,68	3,18	2,85	7,82
<i>BRA06491</i>	*-	8,40	*-	2,60	2,95	7,11
<i>BRA19186</i>	3,44	4,60	7,61	4,25	3,73	7,18
<i>BRA03824</i>	*-	*-	*-	*-	*-	7,24
<i>BRA12424</i>	2,60	*-	8,28	2,95	4,40	7,56
<i>BRA11401</i>	*-	9,15	8,24	*-	3,40	7,14
<i>BRA12700</i>	*-	5,40	8,29	*-	*-	7,32
<i>BRA23540</i>	2,60	5,40	7,66	3,98	5,15	6,97
<i>BRA09610</i>	2,95	4,60	7,55	3,4	2,95	7,62

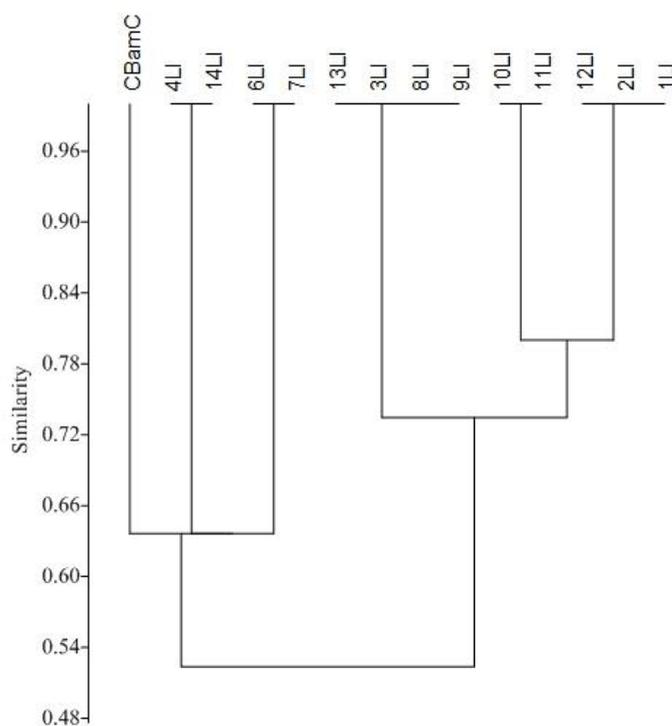
\*-: Não detectado.

### 4.2. Caracterização Fenotípica dos Isolados Bacterianos Associados à 10 Genótipos de *Paspalum*

#### 4.2.1. Caracterização em meio de cultura LGI dos isolados

Foram formados 3 grupos do total de 13 isolados que possuem características morfoculturais diferentes da estirpe CBAMC de *A.brasilense* que apresentou colônia circular,

pequena, plana, com borda inteira, produção escassa de muco, superfície rugosa, de coloração branca (Figura 4). Os isolados que possuíram valores de similaridade mais próximos da estirpe de referência foram o do grupo I (isolados 4LI, 14LI e 6LI e 7LI) diferindo apenas no tamanho médio e na superfície lisa, o grupo II (isolados 1LI, 2LI, 3LI, 8LI, 9LI, 10LI, 11LI, 12LI, 13LI) com aproximadamente 72% de similaridade entre si e dissimilaridade com os demais grupos por apresentarem tamanho médio, pouca produção de muco e característica óptica transparente (Figura 3).

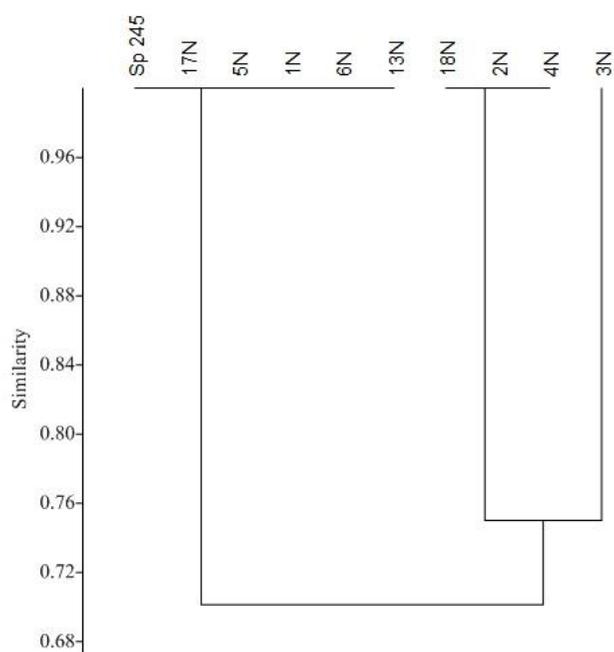


**Figura 3.** Dendrograma de similaridade de 13 isolados oriundos de 10 genótipos de *Paspalum* sp e da estirpe CBAMC (BR 11145- *Azospirillum amazonense*) a partir da caracterização morfo-cultural em meio LGI sólido, utilizando análise de agrupamento por médias não ponderadas (UPGMA) e o índice de Jaccard como distância pelo programa estatístico PAST versão 2.17 c.

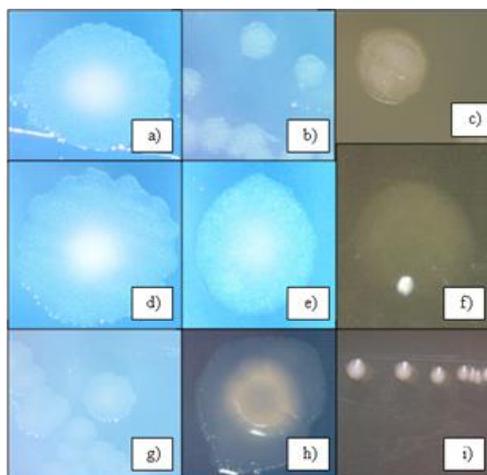
#### 4.2.2. Caracterização em meio de cultura NFB

Do total de 9 isolados obtidos foi possível a formação de 2 grupos. Os isolados do grupo I 1N, 5N, 6N, 17N, 13N apresentaram características similares à estirpe Sp 245 apresentando forma circular, pequena, elevação plana, borda inteira, superfície lisa, produção escassa de muco, característica óptica opaca e coloração branca (Figura 5).

Os isolados 2N, 3N, 4N e 18N do grupo II apresentaram 72% de similaridade com a estirpe de referência, diferindo apenas no tamanho das colônias encontrado que foi médio. (Figura 4).



**Figura 4.** Dendrograma de similaridade de 9 isolados oriundos de 10 genótipos de *Paspalum* sp e da estirpe Sp 245 (BR 11005- *Azospirillum brasilense*) a partir da caracterização morfo cultural em meio NFB sólido, utilizando análise de agrupamento por médias não ponderadas (UPGMA) e o índice de Jaccard como distância pelo programa estatístico PAST versão 2.17 c .

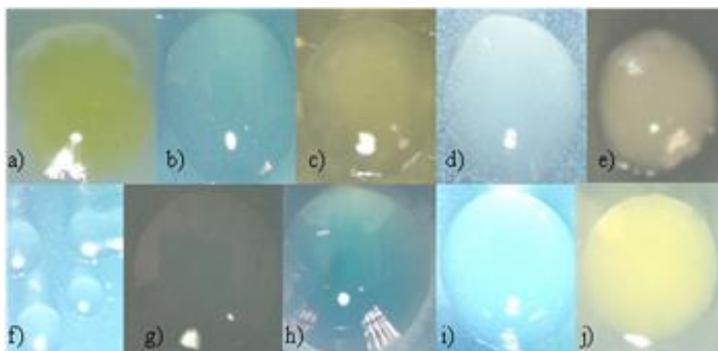


**Figura 5.** Aspecto morfo cultural dos isolados crescidos em Nfb e LGI com 4 dias. a) isolado 1 N; b) isolado 13 N; c) estirpe CBAMC- *A. amazonense*; d) isolado 3 N; e) isolado 13 N; f) 12LI; g) isolado 6N; h) Estirpe SP 245- *A. brasilense* i) isolado 4LI.

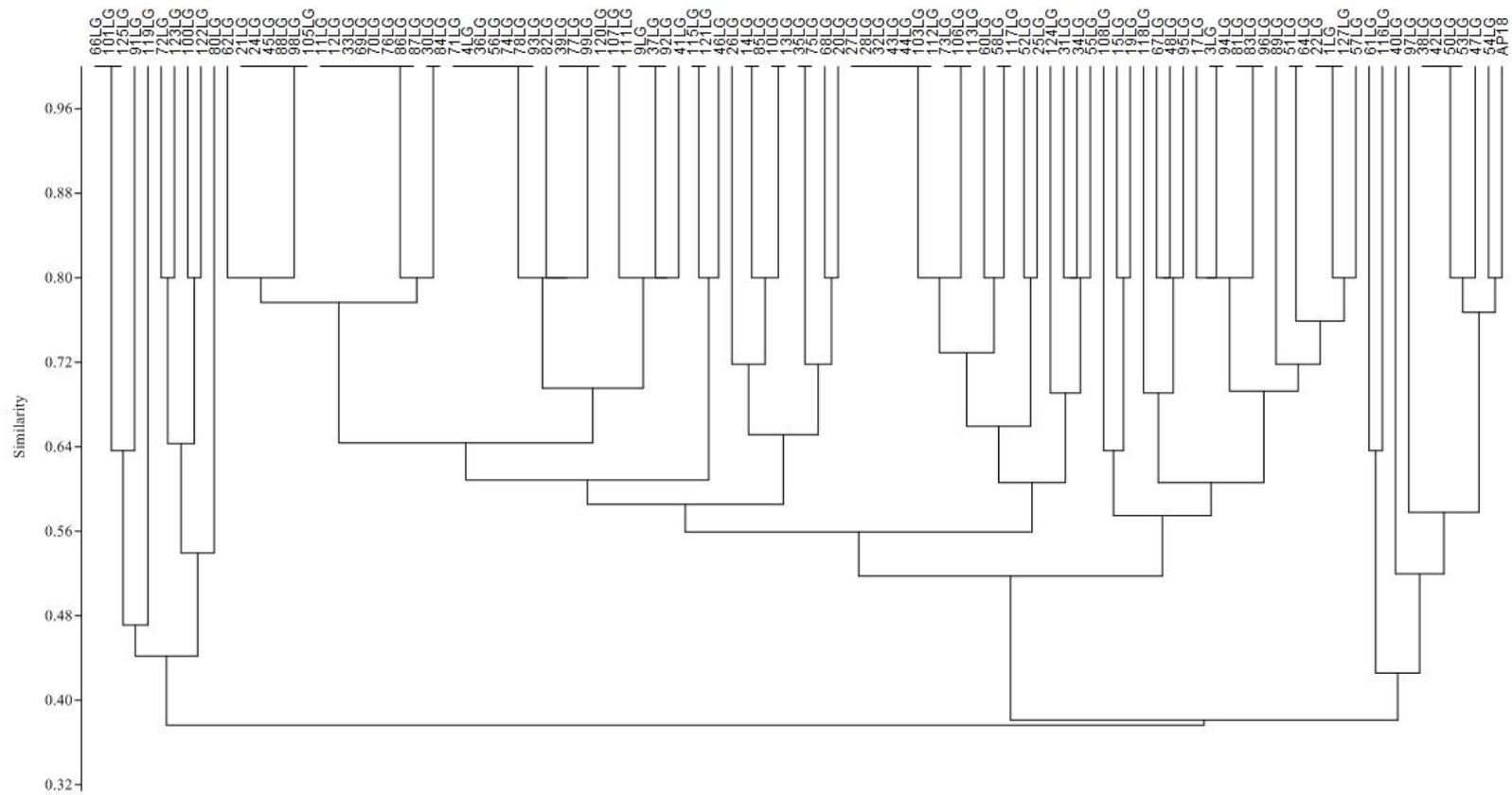
#### 4.2.3. Caracterização em meio de cultura LG

Do total de 105 isolados foi possível a formação de 39 grupos distintos com similaridade igual ou superior à 80%. O grupo que apresentou maior número de isolados foi o grupo 6 com 12 isolados que apresentou característica morfo cultural circular, média, elevação plana, borda inteira, superfície lisa, pouca produção de muco, translúcida, transparente.

Seguido pelo grupo 10 com 11 isolados que apresentou característica morfocultural circular, média, elevação convexa, borda inteira, superfície lisa, produção de muco moderada, translúcida e transparente. Apenas o grupo 31 composto por 5 isolados possuíram características similares a AP 18 (*A. paspali*) que apresentou característica morfocultural circular, pequena, plana, inteira, lisa, produção de muco escassa, opaca e branca (Figura 6 e 7).



**Figura 6.** Aspecto morfocultural de isolados bacterianos crescidos em meio LG por 4 dias. a) isolado 2 LG; b) isolado 13LG; c) isolado 28 LG; d) isolado 38 LG; e) isolado 96 LG; f) isolado 76 LG; g) isolado 84 LG h) isolado 87 LG; i) isolado 122 LG; j) isolado 124LG.

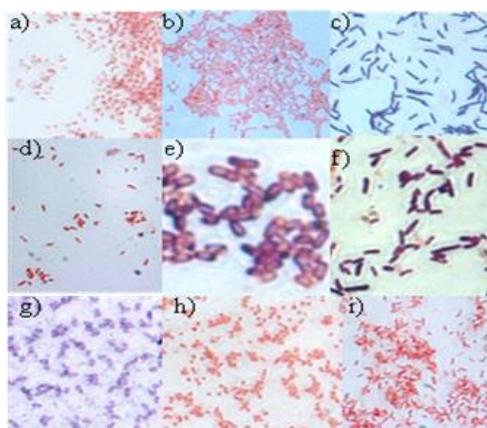


**Figura 7.** Dendrograma de similaridade de 105 isolados provenientes do meio LG isolados oriundos de 10 genótipos de *Paspalum* sp e da estirpe AP 18 (*A. paspali*) a partir da caracterização morfo-cultural em meio LG sólido.

#### 4.2.4. Reação coloração de Gram

De um total de 130 isolados, 65% apresentaram reação de gram negativa e 35% apresentaram reação de gram positiva (Figura 8).

Coloração de Gram é um método empírico de distinguir as espécies bacterianas em dois grandes grupos (Gram-positivos e Gram-negativos) com base nas propriedades químicas e físicas de suas paredes celulares. O método foi nomeado em homenagem ao cientista dinamarquês Hans Christian Gram (1853-1938), que desenvolveu a técnica em 1884 (Gram-1884). A importância dessa determinação é a correta identificação de bactérias, como todos os demais métodos fenotípicos (BARTHOLOMEW & MITTWER, 1952).



**Figura 8.** Reação de Gram dos isolados: a) 87 LG; b) 6 LG; c) 3 N; d) 112 LG; e) 1 N; f) 4 LI; g) 13 LI; h) Estirpe sp7 (BR 11001- *A. brasilense*) e i) 79 LG.

### 4.3. Caracterização Molecular dos Isolados Associados à 10 Genótipos de *Paspalum*

#### 4.3.1. Extração de DNA

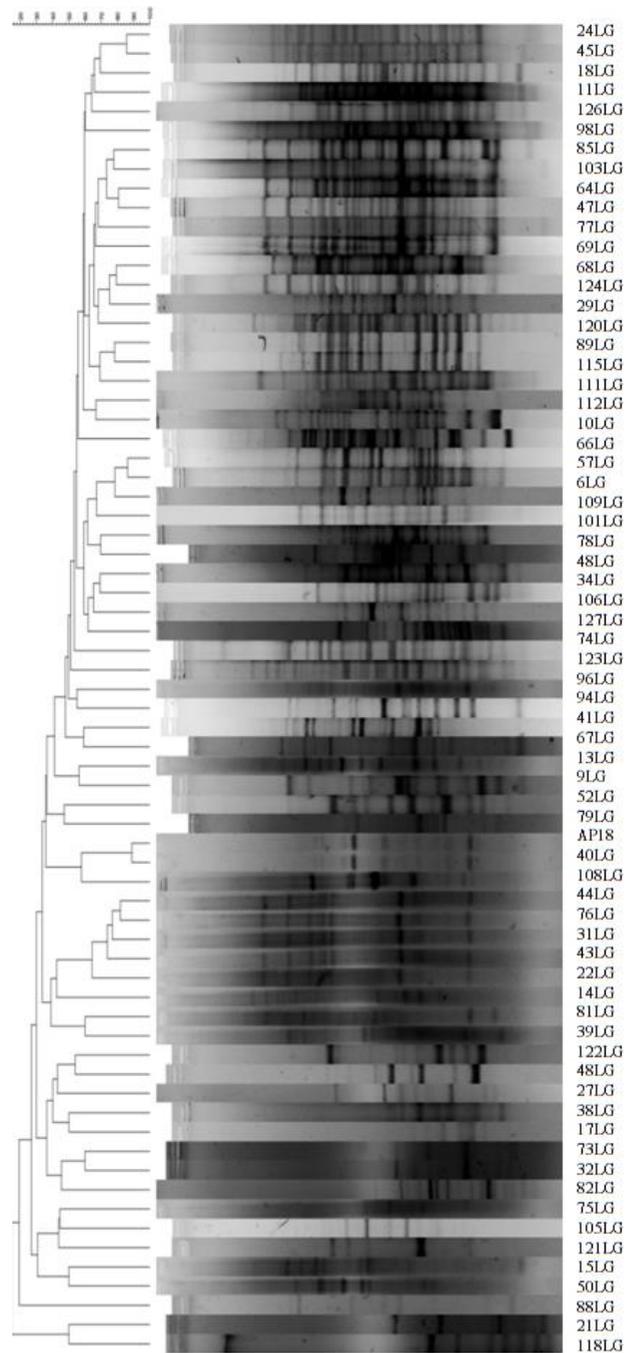
Um total de 80 isolados selecionados através da caracterização fenotípica teve seu DNA extraído para caracterização molecular. A metodologia utilizada permitiu a extração de DNA de boa qualidade, sem a necessidade de purificações posteriores.

#### 4.3.2. BOX-PCR

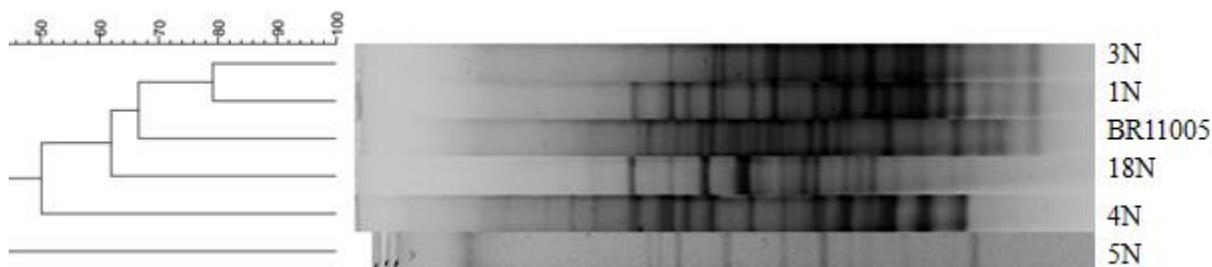
Os perfis gerados pelo BOX-PCR mostraram uma alta diversidade genotípica, sendo possível a formação de 55 isolados diferentes a partir de 70% de similaridade. Os isolados foram agrupados de acordo com o meio de cultura dos quais foram isolados, sendo obtidos no meio LG 11 grupos similares (Figura 9), no meio LGI (Figura 11) nenhum grupo similar e no meio NFB (Figura 11) apenas 2 isolados similares. Este agrupamento permitiu que pudesse ser selecionado um isolado representativo de cada grupo para que pudessem ter o sequenciamento parcial do gene 16S para identificação taxonômica. Nenhum dos isolados apresentou mais de 70% de similaridade com as estirpes referência AP 18 de *A. paspali*, BR 11005 de *A. brasilense* e BR 11145 de *A. amazonense*, usadas para comparação.

Javadi Nobandegani e colaboradores (2014) observaram que o uso da técnica BOX-PCR é um método de identificação do perfil genômico rápido, simples e que possui replicabilidade na distinção de estirpes de *Pseudomonas* solubilizadoras de Fosfatos, apresentando-se como um marcador molecular mais eficiente do que a técnica do 16S rRNA. Neste trabalho os autores encontraram 6 diferentes perfis entre os 6 isolados obtidos da rizosfera de Dendêzeiro e

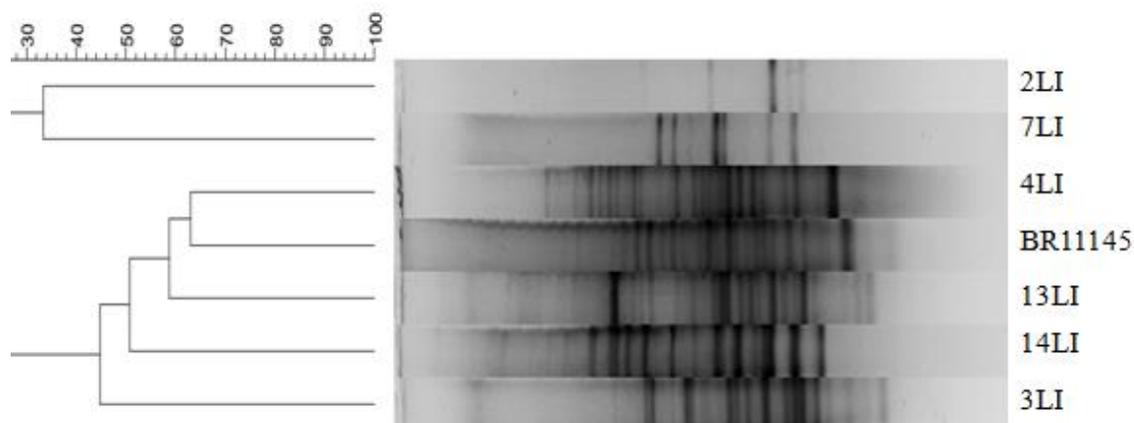
concluíram que o método teve potencial de diferenciar os isolados, incluindo aqueles que não foram facilmente diferenciados por técnicas fenotípicas e técnicas filogenéticas, como o 16S rRNA.



**Figura 9.** Dendrograma de similaridade para o agrupamento dos perfis de BOX-PCR dos isolados oriundos de 10 genótipos de *Paspalum* em meio de cultura LG. A estirpe AP18 de *A. paspali* foi incluída no agrupamento. A similaridade foi calculada usando o coeficiente de Jaccard e agrupamento UPGMA.



**Figura 10.** Dendrograma de similaridade para o grupamento dos perfis de BOX-PCR dos isolados oriundos de 10 genótipos de *Paspalum* em meio de cultura NFB. A estirpe BR11005 de *A. brasilense* foi incluída no grupamento. A similaridade foi calculada usando o coeficiente de Jaccard e agrupamento UPGMA.



**Figura 3.** Dendrograma de similaridade para o grupamento dos perfis de BOX-PCR dos isolados oriundos de 10 genótipos de *Paspalum* em meio de cultura LGI. A estirpe BR 11145 de *A. amazonense* foi incluída no grupamento. A similaridade foi calculada usando o coeficiente de Jaccard e agrupamento UPGMA.

#### 4.3.3. Sequenciamento

Foram sequenciados 30 isolados da raiz e solo rizosférico dos 10 genótipos de *Paspalum*, destes 16 isolados pertencentes ao gênero *Bacillus*, 6 isolados ao gênero *Rhizobium*, 2 ao gênero *Burkholderia*, 2 ao gênero *Pseudomonas* e 1 isolado ao gênero *Dyadobacter*, 1 isolado ao gênero *Acinetobacter*, 1 isolado ao gênero *Microbacterium* e 1 isolado ao gênero *Azospirillum* (Tabela 4).

Os resultados demonstram que diferente do que foi encontrado por Döbereiner em 1966 em que reportava uma associação bastante específica com a nova espécie descrita como *Azotobacter* (syn. *Azorhizophilus*) *paspali* e a rizosfera de *Paspalum notatum*, o isolamento nos genótipos de *Paspalum notatum* (BRA 25020 e BRA 12254) não apresentaram similaridade com as sequencias depositadas no banco de dados do NCBI de *A. paspali*, mesmo utilizando um meio semi-específico no isolamento. No entanto, a maioria dos gêneros sequenciados é considerada rizobactéria promotora de crescimento vegetal.

**Tabela 4.** Análise de similaridade do seqüenciamento parcial do gene 16S rDNA entre os isolados bacterianos representativos e as seqüências depositadas no banco de dados NCBI.

Isolado	Genótipo	Local	16S rDNA ( similaridade%)	nºde acesso	%similaridade
106LG	BRA12700	Raiz	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	NR 041715.1	99%
112LG	BRA23540	Raiz	<i>Rhizobium freirei</i>	NR 114564.1	100%
118LG	BRA9610	Raiz	<i>Burkholderia sp.</i>	NR 104978.1	100%
123LG	BRA9610	Raiz	<i>Bacillus licheniformis</i>	NR 118996.1	100%
126LG	BRA9610	Solo	<i>Rhizobium hainanense</i>	NR 029195.1	100%
13LG	BRA12254	Raiz	<i>Rhizobium miluonense</i>	NR 044063.1	99%
29LG	BRA6491	Raiz	<i>Rhizobium sp.</i>	NR 102511.1	99%
32LG	BRA19186	Solo	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NR 075005.1	99%
38LG	BRA19186	Solo	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NR 075005.1	99%
39LG	BRA19186	Raiz	<i>Dyadobacter janqsuensis</i>	NR 134721.1	99%
41LG	BRA19186	Solo	<i>Acinetobacter oleivorans</i>	NR 102814.1	100%
52LG	BRA19186	Raiz	<i>Burkholderia sp.</i>	NR 104978.1	99%
67LG	BRA19186	Solo	<i>Bacillus circulemes</i>	NR 112632.1	100%
6LG	BRA25020	Raiz	<i>Bacillus licheniformis</i>	NR 118996.1	99%
74LG	BRA19186	Raiz	<i>Rhizobium pusense</i>	NR 116874.1	99%
79LG	BRA3824	Raiz	<i>Rhizobium tropici</i>	NR 102511.1	99%
94LG	BRA11401	Solo	<i>Bacillus subtilis</i>	NR 112686.1	99%
21LG	BRA12254	Solo	<i>Bacillus subtilis</i>	NR 113265.1	100%
43LG	BRA19186	Raiz	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NR 075005.1	99%
108LG	BRA12700	Solo	<i>Microbacterium arborescens</i>	NR 029265.1	98%
127LG	BRA9610	Solo	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	NR 041715.1	99%
4LG	BRA25020	Raiz	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NR 075005.1	99%
2LI	BRA25020	Solo	<i>Bacillus megaterium</i>	NR 112636.1	99%
3LI	BRA25020	Solo	<i>Azospirillum formosense</i>	NR 117483.1	99%
7LI	BRA12254	Solo	<i>Bacillus detrensii</i>	NR 114085.1	99%
4N	BRA11401	Solo	<i>Bacillus subtilis</i>	NR 112686.1	99%
1N	BRA6491	Solo	<i>Bacillus subtilis</i>	NR 112686.1	99%
14LI	BRA12254	Solo	<i>Bacillus subtilis</i>	NR 112686.1	99%
5N1	BRA19186	Raiz	<i>Bacillus licheniformis</i>	NR 118996.1	99%
9S441N1(18N)	BRA23540	Solo	<i>Bacillus aerius</i>	NR 118439.1	99%

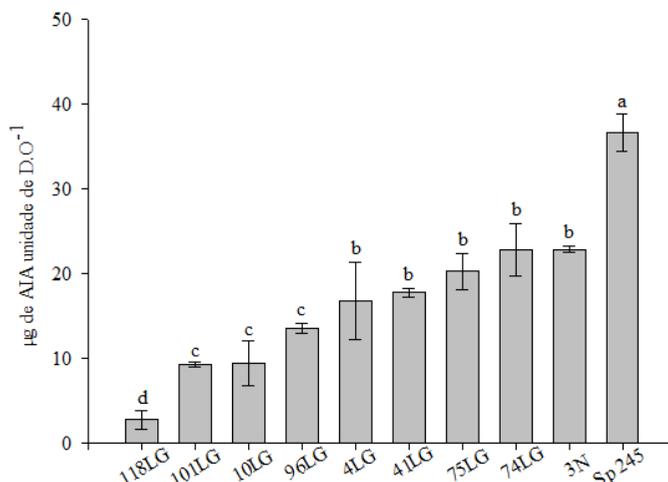
#### 4.4. Caracterização Fisiológica dos Isolados Associados à 10 Genótipos de *Paspalum*

##### 4.4.1. Avaliação da produção de compostos indólicos (AIA)

Apenas 9 isolados apresentaram a capacidade de produção de compostos indólicos. Estes produziram entre 2,79 e 36,62 µg de AIA unidade de D.O-1 (Figura 11).

O ácido 3 indole acético (AIA) é o principal fitohormônio produzido pelas rizobactérias e tem sua síntese elevada in vitro em presença do precursor L-triptofano. Os resultados estão em acordo com o observado por Cássan e colaboradores (2014) que encontraram valores de produção de compostos indólicos 5 a 50 µg mL<sup>-1</sup>, de acordo com o meio de cultivo e da estirpe testada (Cassán et al., 2014).

O uso do meio DYGS suplementado com L-triptofano para o crescimento dos isolados contém grandes quantidades de diversos aminoácidos oriundos a partir do extrato de levedura e da peptona utilizados em sua composição que podem funcionar como precursores para a síntese de compostos indólicos (CHAVES et al, 2015).



**Figura 4.** Capacidade de produção de AIA in vitro pelos isolados de genótipos de *Paspalum* e a estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* crescidas em meio DYGS suplementado com 200 µg ml de L-Triptofano-1 após 48h. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Skott-knot à 5% de probabilidade. Média de três repetições.

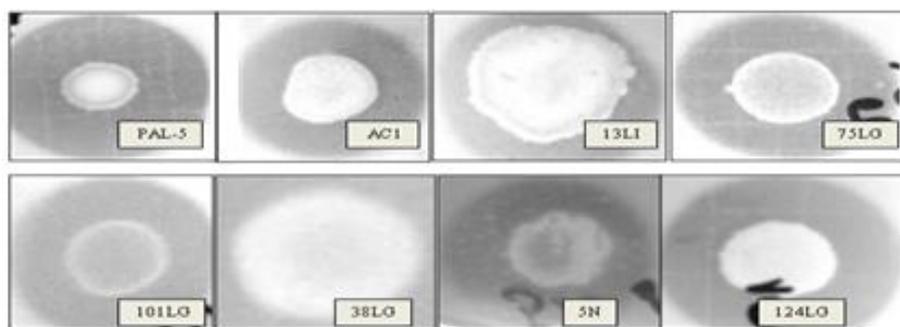
#### 4.4.2. Solubilização de fosfatos

Do total de 55 isolados, apenas 14 solubilizaram fosfato nas condições testadas, com Índice de solubilização (IS) variando entre 1,11 a 2,36 o que foi inferior a estirpe PAL-5 que apresentou IS de 3,07 aos 7 dias de incubação e de 2,84 aos 14 dias de incubação e valores próximos à estirpe de AC1 que apresentou IS de 1,50 aos 7 dias de incubação e de 1,90 aos 14 dias de incubação usadas como referência (Tabela 5, Figura 13).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus* são consideradas as mais frequentes bactérias solubilizadoras de Fosfatos, no entanto também é reportada a ocorrência de outros gêneros solubilizadores de P, como por exemplo, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Acinetobacter*, *Gluconacetobacter*, dentre outros. (SHARMA et al., 2017, ALIKHANI et al., 2006).

**Tabela 5.** Índice de Solubilização de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  pelas estirpes referência e pelos isolados bacterianos oriundos de genótipos de *Paspalum* em meio de cultura sólido NBRIP, avaliação aos 7 e 14 dias de incubação.

Isolados	7 dias	14 dias	Isolados	7 dias	14 dias
PAL-5	3,07	2,84	101LG	1,85	2,24
AC1	1,50	1,90	118LG	1,47	1,05
11LG	1,11	1,11	121LG	1,70	2,15
18LG	1,48	1,45	3N	1,55	1,78
29LG	1,63	2,27	4N	-	1,73
41LG	1,89	2,11	5N	2,06	1,51
67LG	1,50	1,75	4LI	1,11	1,12
75LG	2,02	2,36	13LI	1,17	1,67



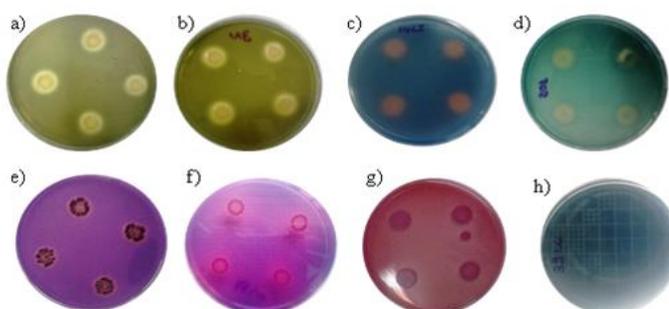
**Figura 5.** Solubilização de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  em meio sólido NBRIP pelas bactérias referência, PAL-5 e AC1 e pelos isolados dos 10 genótipos de *Paspalum*, aos 14 dias após o crescimento.

#### 4.4.3. Produção de sideróforos

Nas condições testadas apenas os isolados crescidos em meio NFB (CAS) produziram halo indicando a produção de sideróforos, no entanto, nos demais meios não houve a formação do halo, no entanto houve a alteração da cor do meio, indicando a produção de sideróforos. Dos 55 isolados bacterianos avaliados, cerca de 40 isolados cresceram em meio sólido LG, LGI ou NFB (CAS) e apresentaram produção de sideróforos indicada como a alteração da cor do meio de Azul para lilás, roxo ou rosa no meio LG (CAS) e de azul para roxo ou laranja no meio LGI (CAS) e de azul para verde em meio NFB (CAS). Onze isolados não conseguiram crescer nos meios indicados. E os isolados 43LG, 48LG, 73LG e 81LG cresceram no meio, mas não produziram sideróforos até o 14º dia de avaliação. (Figura 15).

A variação de coloração no meio indica a produção de diferentes tipos de sideróforos, o que de acordo com os sideróforos microbianos podem ser classificados principalmente de acordo com o grupo funcional quelante do Ferro em 3 tipos: catecolatos (fenolatos), hidroximatos e hidroxicarboxilatos o que forma complexos octaédricos hexadentados com o metal. Os sideróforos produzidos pelas bactérias podem ser de um ou mais tipos, alguns sideróforos são mais eficazes do que outros e a grande diversidade de moléculas produzidas relaciona-se ao fato da diversidade de substratos que podem usar (MARAHIEL, 1997; CROSA & WALSH, 2002; AGUADO-SANTACRUZ et al, 2012)

Dos isolados avaliados, os isolados que se destacaram na produção de sideróforos foram os isolados 13LG, 15LG, 41LG, 96LG, 118LG, 121LG, 3N, 4N e 5N sendo avaliadas como ótimas produtoras de sideróforos semelhante ao controle positivo ZAE 94 (*H. seropedicae*) (Tabela 7).



**Figura 6.** Produção de Sideróforos por isolados bacterianos de 10 genótipos de *Paspalum* aos 14 dias após crescimento em meio LG, NFB e LGI, acrescido de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  à 0,1%, sem indicador e CAS, utilizando a estirpe ZAE 94 como controle positivo. a) ZAE 94; b) 3N; c) 96LG; d) 14LI; e) 123LG; f) 13LG; g) 21LG; h) 105LG; 39LG como não produtora.

**Tabela 6.** Produção de Sideróforos por isolados bacterianos oriundos de 10 genótipos de *Paspalum* aos 8 dias após crescimento em meio sólido LG, NFB e LGI, acrescido de de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  à 0,1%, sem indicador e CAS, utilizando a estirpe ZAE 94 como controle positivo.

Bactérias	7º dia	12º dia	Bactérias	7º dia	12º dia
ZAE 94	+++	+++	81LG	-	-
4LG	Nd	Nd	82LG	+	+++
6LG	+	+	88LG	+	+++
9LG	Nd	Nd	89LG	Nd	Nd
10LG	++	++	94LG	+	+
11LG	Nd	Nd	96LG	+++	+++
13LG	+++	+++	98LG	Nd	Nd
14LG	+	+	101LG	++	++
15LG	+++	+++	105LG	Nd	+
17LG	+	+	106LG	+	+
18LG	Nd	Nd	108LG	Nd	Nd
21LG	+	+	112LG	Nd	+
29LG	Nd	Nd	118LG	+++	+++
32LG	+	++	121LG	+++	+++
38LG	++	++	123LG	++	++
39LG	Nd	Nd	126LG	Nd	+
41LG	+++	+++	127LG	+	+
43LG	-	-	9s4n1(18N)	+	++
44LG	Nd	Nd	1N	++	++
45LG	+	++	3N	+++	+++
48LG	-	Nd	4N	+++	+++
52LG	+	++	5N	+++	++++
67LG	-	++	2LI	++	++
73LG	-	-	3LI	Nd	++
74LG	++	+++	4LI	Nd	Nd
75LG	+	++	7LI	+	++
77LG	+	+	13LI	+	++
79LG	+	+	14LI	++	++

Legenda: +++ (Ótima produtora); ++(Boa produtora); + (produtora), - (Não produz); Nd (não cresceu).

#### 4.4.4. Capacidade de promoção de crescimento vegetal dos isolados

Os isolados apresentaram diferentes respostas quanto à promoção de crescimento vegetal, os isolados no meio LG que apresentaram capacidade de solubilizar fosfatos, produzir compostos indólicos e produzir sideróforos foram os isolados 41LG, 75LG e 101LG, enquanto que no meio LGI e NFB os isolados apresentaram resposta positiva apenas para duas características fisiológicas, a solubilização de fosfatos e a produção de sideróforos do isolado no meio LGI, 13LI e dos isolados do meio NFB, 4N e 5N, e da produção de compostos indólicos e sideróforos do isolado no meio NFB, 3N. (Figura 12, Tabelas 5 e 6).

Os testes de caracterização realizados *in vitro* possibilitam a seleção de isolados com maior capacidade de promoção de crescimento vegetal durante as próximas etapas de experimentação da resposta à inoculação.

## 4.5. Experimentos de Inoculação

### 4.5.1. Experimento 1: Efeito da inoculação em *Paspalum regnellii*

Na primeira coleta aos 38 DAP foi observado que os tratamentos inoculados com os isolados 74LG e 5N apresentaram valores inferiores ao tratamento sem inoculação para a variável produto do comprimento pela largura da folha mais jovem, mas também não foi observada diferença entre a inoculação e o tratamento com Alto N (Tabela 7).

O tratamento inoculado com a estirpe Sp 245 obteve de massa seca da parte aérea 30% superior ao tratamento que recebeu adubação nitrogenada.

O isolado 5N apresentou resultados semelhantes à Sp 245 no número de perfilhos e no produto do comprimento pela largura da folha mais jovem, no entanto esse aumento não foi expresso na produção de massa seca da parte aérea (Tabela 9, Figura 15).

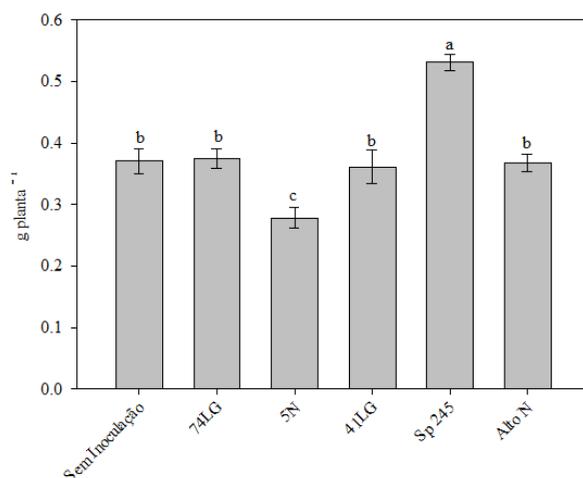
A resposta da inoculação foi maior na segunda coleta, realizada aos 68 DAP, havendo diferença com a estirpe Sp 245 nas variáveis altura até a lígula da folha mais jovem de 20%, altura total de 10%, o produto do comprimento pela largura da folha mais nova de 31% e número de folhas de 66% em relação ao tratamento não inoculado. E de 56,46% de incremento na massa da parte aérea em relação ao tratamento não inoculado.

A resposta do isolado 5N foi semelhante à Sp 245 quando observado o número de folhas e a do isolado 41LG quando observado o produto do comprimento pela largura da folha mais jovem. A produção de massa seca do isolado 5N foi 29,83% superior ao tratamento sem inoculação, mas inferior ao tratamento inoculado com a estirpe Sp 245 e ao tratamento nitrogenado (Tabela 9, Figura 16).

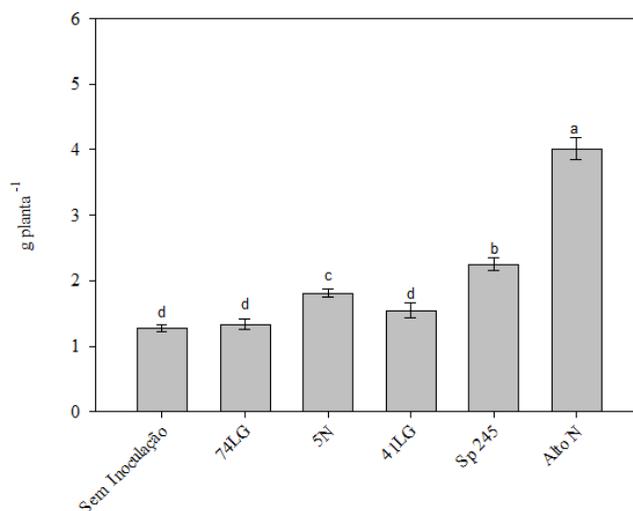
**Tabela 7.** Efeito da inoculação de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal em plantas de *P. regnellii* aos 38 dias após o plantio e aos 68 dias após o plantio (DAP) no número de perfilhos (Perf), altura até a lígula da folha mais jovem (Altc), número de folhas da touceira do perfilho principal (Perf), o produto do comprimento pela largura da folha mais jovem (CxLf) e altura total aos 68 DAP (Altt). Dados médios de 6 repetições.

Tratamentos	38 DAP				68 DAP				
	Perf	Altc	NF	CxLf	Perf	Altc	NF	CxLf	Altt
		Cm		Cm		Cm		cm <sup>2</sup>	Cm
Sem Inoculação	4,00	12,32	14	52,51 a	4,00 c	10,93 c	12,67 c	45,91 c	44,23 c
74LG	3,33	12,03	11,67	41,88 b	4,00 c	11,15 c	15,20 c	54,12 c	41,02 c
5N	3,83	11,97	11,83	34,76 b	5,83 b	10,28 c	17,00 b	53,65 c	43,93 c
41LG	3,00	11,80	12	45,21 a	4,67 c	12,27 c	12,83 c	63,11 b	44,75 c
Sp 245	4,00	13,37	13,17	47,11 a	5,00 b	13,75 b	19,33 b	66,14 b	49,20 b
Alto N	3,50	13,07	14,33	48,13 a	7,67 a	16,07 a	26,83 a	80,09 a	55,75 a
Média	3,61	12,42	12,94	44,93	5,19	12,40	17,31	60,50	46,48
CV%	27,20	14,52	10,80	17,77	13,37	12,66	19,04	12,44	11,11

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-knott à 5% de probabilidade.



**Figura 7.** Acúmulo de massa seca de parte aérea de plantas de *P. regnellii* coletadas aos 38 dias após o plantio e inoculadas com os isolados bacterianos 74LG, 5N, 41LG e a estirpe Sp 245. Média de 6 repetições. Letras iguais minúsculas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.



**Figura 8.** Acúmulo de massa seca de parte aérea de plantas de *P. regnellii* coletadas aos 68 dias após o plantio e inoculadas com os isolados bacterianos 74LG, 5N, 41LG e a estirpe Sp 245. Média de 6 repetições. Letras iguais minúsculas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

#### 4.5.2. Experimento 2: Efeito da Inoculação em *Paspalum atratum* cv. Pojuca

Na primeira coleta não houve diferença entre o tratamento inoculado e o não inoculado, sendo observada diferença estatística apenas para o número de folhas do tratamento nitrogenado.

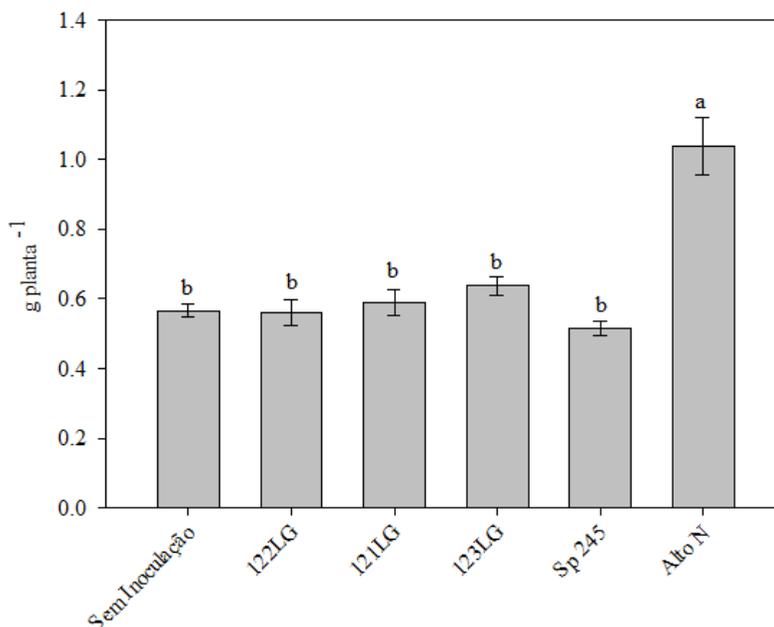
Na segunda coleta foi observado o perfilhamento das plantas inoculadas com o isolado 121LG foi 21% superior ao tratamento não inoculado.

E os isolados 121LG, 123LG e a estirpe Sp 245 obtiveram valores até 8,8% superiores em altura até a lígula da folha mais jovem do que o tratamento sem inoculação e do que o tratamento nitrogenado. No entanto, o mesmo não foi observado para a massa seca da parte aérea na primeira e na segunda coleta.

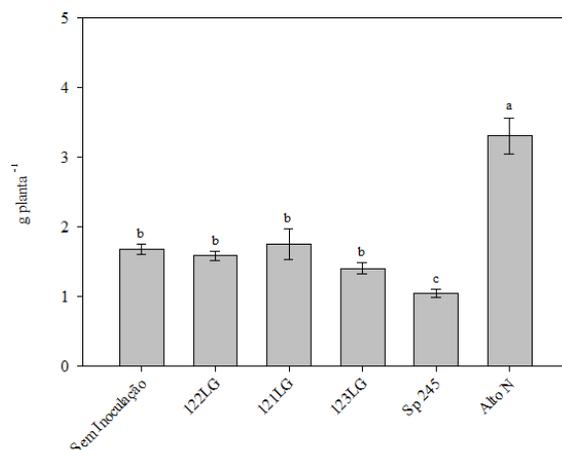
**Tabela 8.** Efeito da inoculação de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal em plantas de *P. atratum* cv. Pojuca aos 38 dias após o plantio e aos 68 dias após o plantio (DAP) no número de perfilhos (NF), altura até a lígula da folha mais jovem (Altc), número de folhas da touceira do perfilho principal (NF), o produto do comprimento pela largura da folha mais jovem (CxLf) e altura aos 68 DAP (Altt). Dados médios de 6 repetições.

Tratamentos	38 DAP				68 DAP				
	Perf	Altc	NF	CxLf	Perf	Altc	NF	CxLf	Altt
		Cm		Cm		cm		cm <sup>2</sup>	
Sem Inoculação	4,33 b	10,67	19,33 b	56,81	4,33 b	8,60 b	10,50 b	58,54 b	45,72
122LG	4,33 b	8,60	18,00 b	47,48	4,17 b	8,52 b	11,50 b	51,46 c	45,48
121LG	4,67 b	9,73	19,33 b	56,79	5,50 a	9,43 a	14,33 b	61,66 b	48,42
123LG	5,33 a	9,42	19,17 b	47,32	4,50 b	9,22 a	11,67 b	64,99 b	47,22
Sp 245	3,83 b	9,03	15,58 b	53,79	3,83 b	9,12 a	11,33 b	51,25 c	46,62
Alto N	6,00 a	10,33	24,33 a	65,65	6,50 a	7,73 b	21,67 a	82,64 a	51,68
Média	4,75	9,53	19,29	54,64	4,80	8,76	13,50	61,75	47,52
CV%	20,30	10,60	15,31	22,17	23,18	9,86	18,86	9,35	8,35

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-knott à 5% de probabilidade.



**Figura 9.** Acúmulo de massa seca da parte aérea de plantas de *P. atratum* cv. Pojuca coletadas aos 38 dias após o plantio e inoculadas com os isolados bacterianos 122 LG, 121 LG, 123 LG e a estirpe Sp 245. Média de 6 repetições. Letras iguais minúsculas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.



**Figura 10.** Acúmulo de massa seca da parte aérea de plantas de *P. atratum* cv. Pojuca coletadas aos 68 dias após o plantio e inoculadas com os isolados bacterianos 122LG, 121LG, 123LG e a estirpe Sp 245. Média de 6 repetições. Letras iguais minúsculas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

#### 4.5.3. Experimento 3: Efeito da inoculação em *P. malacophyllum*

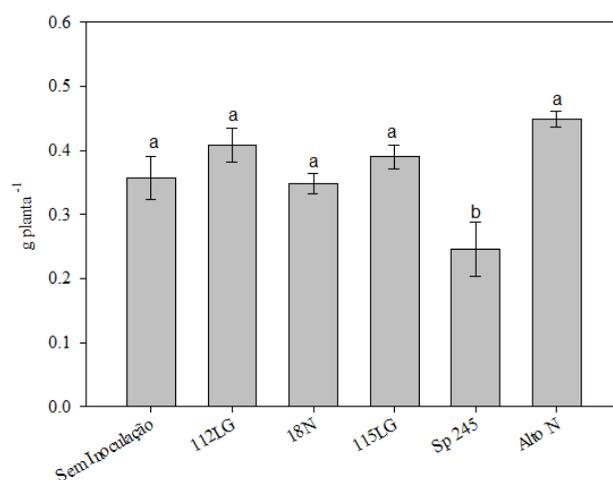
Na primeira coleta não houve diferença entre os tratamentos para as variáveis biométricas. Para a variável massa seca o tratamento inoculado com a estirpe Sp 245 foi menor que os outros tratamentos, no entanto, não foi observado diferença entre o tratamento nitrogenado e os demais tratamentos.

Na segunda coleta foi observado que o tratamento inoculado com o isolado 115 LG obteve maior produto de comprimento pela largura da folha mais jovem do que o tratamento sem inoculação. E a estirpe Sp 245 obteve altura total de 11% maior em relação ao tratamento sem inoculação. Entretanto o mesmo não foi observado para a massa seca da parte aérea.

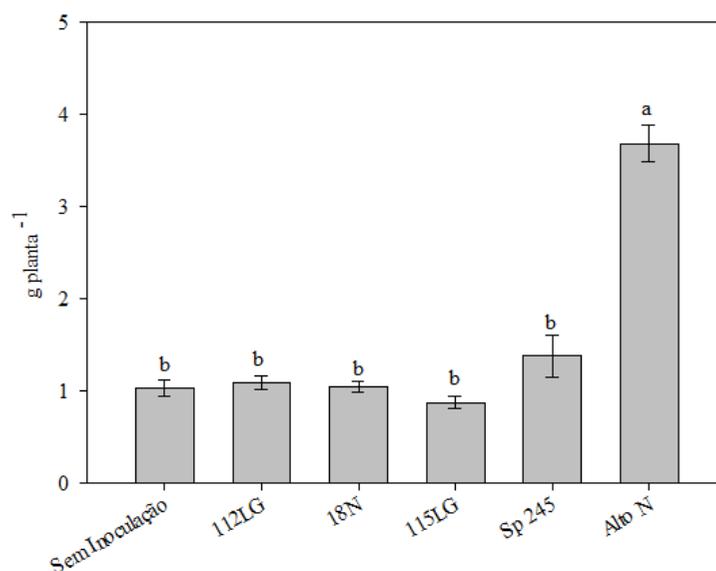
**Tabela 9.** Efeito da inoculação de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal em plantas de *P. malacophyllum* aos 38 dias após o plantio (38DAP) e aos 68 dias após o plantio (68 DAP) no número de perfilhos (Perf), altura até a lígula da folha mais jovem (Altc), número de folhas da touceira do perfilho principal (NF), o produto do comprimento pela largura da folha mais jovem (CxLf) e altura aos 68 DAP (Altt). Dados médios de 6 repetições.

Tratamentos	38 DAP				68 DAP				
	Perf	Altc	NF	CxLf	Perf	Altc	NF	CxLf	Altt
		cm		cm <sup>2</sup>		cm		cm <sup>2</sup>	Cm
Sem Inoculação	4,67	13,88	13,17	42,53	4,50 b	14,55 b	11,17	38,37 d	40,05 c
112LG	4,83	14,67	13,83	46,47	4,83 b	15,55 b	13,67	46,44 c	36,79 c
18N	4,50	13,88	12,17	40,38	4,67 b	14,50 b	11,67	41,02 d	36,73 c
115LG	4,50	15,13	12,67	47,24	4,83 b	13,15 b	13,17	55,11 b	39,33 c
Sp 245	4,33	13,65	11,67	42,08	5,83 b	17,30 b	19,50	45,46 c	45,02 b
Alto N	5,33	15,20	12,50	42,92	11,17 a	23,48 a	31,00	69,31 a	53,28 a
Média	4,69	12,42	13,73	43,60	5,97	19,66	16,69	49,28	41,86
CV%	17,23	14,39	12,67	11,96	25,87	16,42	20,30	10,06	10,67

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-knott à 5% de probabilidade.



**Figura 11.** Acúmulo de massa seca de plantas de *P. malacophyllum* coletadas aos 38 dias após o plantio e inoculadas com os isolados bacterianos 112LG, 18N, 115LG e a estirpe Sp 245. Média de 6 repetições. Letras iguais minúsculas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.



**Figura 20.** Acúmulo de massa seca de plantas de *P. malacophyllum* coletadas aos 68 dias após o plantio e inoculadas com os isolados bacterianos 112LG, 18N, 115LG e a estirpe Sp 245. Média de 6 repetições. Letras iguais minúsculas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os resultados encontrados demonstram que o efeito da inoculação é dependente do genótipo avaliado. Resultados similares foram obtidos por Hungria et al. (2016) quando avaliaram a inoculação de duas estirpes, a abv5 e abv6, de *A. brasilense* em 2 genótipos de *Brachiaria* spp.(= *Urochloa* spp.) obtendo ganhos na produção de massa seca em 73% das coletas, em média de 22% que variaram em função do genótipo utilizado e em relação a diferentes épocas de corte ao longo de 2 anos e aos locais em que os experimentos foram implantados.

## 5. CONCLUSÃO

- A maior contagem de rizobactérias foi encontrada nas raízes do genótipo de *P. notatum* (BRA 25020), no entanto isto não foi expresso no maior número de isolados.
- 130 isolados viáveis foram obtidos associados às raízes e solo rizosférico.
- Os isolados bacterianos apresentaram como principal atividade a produção de sideróforos.
- A interação entre *P. regnellii* e a estirpe Sp 245 foi a mais eficiente, indicando possibilidades de utilização desta estirpe para o aumento da sustentabilidade da cultura.
- O efeito da inoculação variou em função das coletas e dos genótipos de *Paspalum* utilizados.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, E.; HOLMSTROM, S.J.M. Siderophores in environmental research: roles and applications. **Microbiology Biotechnologic**, v.7, p.196–208, 2014.
- ALI, S.S.; VIDHALE, N.N. Bacterial siderophore and their application: a review. **International Journal Current Microbiology Applied Science**, v.2, p.303–312, 2013.
- ALIKHANI, H.A; SALEH-RASTIN, N.; ANTOUN, H. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. **Plant Soil**, v. 287, p.35–41.2006.
- ALLEM, A. C. ; VALLS, J. F. M. Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-grossense. Departamento de Difusão de Tecnologia, 1987.
- ALISCIONI, S. S. Contribución a la filogenia del género *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p.504-523, 2002.
- AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, p.241-248, 2002.
- ANAND, K.; KUMARI, B.; MALLICK, M.A. Phosphate solubilizing microbes: an effective and alternative approach as biofertilizers. **International Journal of Pharmacy and Farmaceutical Sciences**, v.8, p.37-40, 2016.
- ANDRADE, R. P. Tecnologia de produção de sementes de espécies do gênero *Brachiaria*. In: Anais do 11º Simpósio sobre manejo da pastagem. FEALQ, PIRACICABA, SP, p. 49-71, 1994.
- 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, p.549-579, 2005.
- BALDANI, J. I; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S; BODDEY, L. H; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant Soil**. v. 384, p.413–431, 2014.
- BARRETO, I. L. O gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul. Livre Docência thesis, Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.1974.
- BATISTA, L. A. R. ; GODOY, R. Variabilidade intraespecífica em *Paspalum notatum* Fluegge. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 43, 1997, Goiânia. Anais. Ribeirão Preto: SBG, 1997, p.323.
- BATISTA, L. A. R.; NETO, A. R. B. Espécies do gênero *Paspalum* com potencial forrageiro. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste.,19 p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos, 29). 2000.

BHATTACHARYYA, P. N; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal Microbiology**, p.1327–1350, 2012.

BODDEY, R. M.; CHALK, P. M.; VICTORIA, R. L.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. The use of the <sup>15</sup>N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv. batatais. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, n.8, p.1036-1045, 1983.

BOUKHALFA, H.; LACK, J. G.;REILLY, S. D.;HERSMAN, L.; NEU, M. P. Siderophore production and facilitated uptake of iron and plutonium in *P. putida*. No. LA-UR-03-0913. Los Alamos National Laboratory, 2003.

BURTON, G. W. Dallisgrass seed sources. **Journal American Society Agronomy**, p.458-68. 1945.

BURTON, G.W. Conventional breeding of dallisgrass, *Paspalum dilatatum* Poir. **Crop and Science**, p.491-494. 1962.

BURTON, G. W. A search for the origin of Pensacola bahiagrass. **Economic Botanic**, p. 379-382. 1967.

CAI, Y., WANG, R.; AN, M. M.; BEI-BEI, L. Iron-depletion prevents biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through twitching motility and quorum sensing. **Brazilian Journal of Microbiology**. V. 41, p. 37-41, 2010.

CASSÁN, F; VANDERLEYDEN, J; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant bacteria-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal Plant Growth Regulatory**.; v. 33, p.44-59. 2014

CATTELAN, A. J. (1999). Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. Londrina: Embrapa Soja, 1999. (Série Documentos).

CHASE, A. New species of *Paspalum* from tropical America. **Journal Washington Academy of Sciences**., p. 143-146. 1937.

CHAVES, V. A.; SANTOS, S. G.; SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; REIS, V. M. Desenvolvimento Inicial de Duas Variedades de Cana-de-açúcar Inoculadas com Bactérias Diazotróficas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39(6), p.1595-1602. 2015.

COMPANT, S.; CLÉMENT, S. SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology Biochemistry**. 42:669-678. 2010.

CORSI, M.; NUSSIO, L. G. Manejo do capim elefante: correção e adubação do solo. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM. Anais. FEALQ, Piracicaba, 10. p. 87-117. 1993.

COSTACURTA, A. & VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Crit Rev Microbiol.** v. 21, p. 1-18.1995.

CROSA, J. H; WALSH C. T., Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. **Microbiol. Molec. Biol. Rev.** 66:223-249. 2002.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16 S Ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril.) **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2375-2379, 2001.

DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp. nov., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.** p. 357–365. 1966.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry.** Oxford, v. 29, p. 771-774, 1997.

DÖBEREINER, J. *Azotobacter* em solos ácidos. **Boletim Inst. Ecol. Exp. Agr.** p.1-36, 1953.

DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp.n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.1, p.357-365, 1966.

DÖBEREINER, J., BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. – Brasília: EMBRAPA – SPI, Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995, 60 p.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Crit Rev Plant Sci** vol. 22, p.107–149. 2003.

DOBBELAERE, S, CROONENBORGH, A. THYS, A. VANDE BROEK, A. VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil.**vol. 212, p. 155-164.1999.

EUCLYDES, R. F. Manual de utilização do programa SAEG (Sistema de Análise Estatística e Genética). Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 59p. 1983.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 5.0. In: 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, p. 255-258, 2003.

GYANESHWAR, P., KUMAR, G. N., PAREKH, L. J., POOLE, P.S. The role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant Soil**, vol. 245, p. 83-93. 2002.

HAMDAN H, WELLER D. M., THOMASHOW L. S. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. Triticici by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. **Applied Environmental Microbiology.** v. 57, p.3270-3277, 1991.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. E. Fixação biológica do nitrogênio com a cultura de soja. Workshop Nitrogênio na sustentabilidade de sistemas intensivos de produção agropecuária, pg. 51-75, Dourados-MS, 2000.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina, Embrapa Soja, 36 p. - (Documentos / Embrapa Soja). 2011.

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

JAMES, E. K.; BALDANI, J. I. The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels. **Plant and Soil**. v. 356, p. 1-3, 2012.

JAVADI NOBANDEGANI, M.B.; SAUD, H.M.; YUN, W.M. Specific Genomic Fingerprints of Phosphate Solubilizing *Pseudomonas* Strains Generated by Box Elements. **Bio Med Research International**. v. 2014, p.1-6. 2014.

KHALID, A.; TAHIR, S.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere and non-rhizosphere soils. **Australian Journal Soil Research**. 42: 921-926.2004.

KLOPPER J. W., LEONG J, TEINTZE M, SCHIROTH M. N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting Rhizobacteria. **Nature**. v. 286, p. 885-886, 1980.

KUMAR, V.; NARULA, N. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergent of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. **Biology and Fertility of Soils**, v. 28, p. 301-305, 1999.

MACEDO, M. C. M. Sustainability of Pasture Production in the Savannas of Tropical America. In: Proceedings of the XVIII International Grassland Congress. Session 21-Temperate and Tropical Native Grasslands, Winnipeg, Manitoba, Canadá. Vol. 4: p. 7-16. 1997.

MACEDO, M. C. M; ZIMMER, A.H.; KICHEL, A.N.; ALMEIDA, R. G. de; ARAUJO, A. R. de. Degradação de pastagens, alternativas de recuperação e renovação e formas de mitigação. In: ENCONTRO DE ADUBAÇÃO DE PASTAGENS DA SCOT CONSULTORIA-TEC-FÉRTIL, 1., Ribeirão Preto, SP. Anais. Bebedouro: Scot Consultoria, p. 158-181. 2013.

MANNETJE, L. T. A key based on vegetative characters of some induced species of *Paspalum*, S. 1. CSIRO. (CSIRO. Technical Paper. 1). 1961.

MARAHIEL, M. A. Protein templates for the biosynthesis of peptide antibiotics. **Chem. Biol**. 4:561-567. 1997.

MESSENGER A. J., BARCLAY R Bacteria, iron and pathogenicity. **Biochem Educ**. v.11, p.54-63.1983.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, PLANO ABC disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/download.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/download.pdf) Acesso: em 20 de agosto de 2015.

MOREIRA, F. M. S; da Silva, K; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae** 1(2): p.74-99, 2010.

MEIRELLES, P. R. L; BATISTA, L. A. R; COSTA, C.; SILVA, M. G. B; FACTORI, M. A.; SILVEIRA, P. F; CAVASANO, F. A. Germoplasma do gênero *Paspalum* com potencial para produção de forragem. Biosci. **J. Uberlândia**, v. 29, Supplement 1, p. 1587-1595. 2013.

MISTURA, C.; FAGUNDES, J. L.; FONSECA, D. M. da; MOREIRA, L. M.; VITOR, C. M. T.; NASCIMENTO JÚNIOR, D. do; RIBEIRO JÚNIOR, J. I. Disponibilidade e qualidade do capim-elefante com e sem irrigação adubado com nitrogênio e potássio na estação seca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.372-379, 2006.

MOREIRA, F. M. S. e SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: Editora UFLA, 626 p. 2002.

MOREIRA, F. M. S; SILVA, K.; NOBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**. p 74-99, 2010.

NAGOBA, B., VEDPATHAK, D. Medical applications of siderophores. **Eur Journal Gen Med**. v. 8, p. 229-235, 2011.

NAIR, A.; JUWARKAR, A. A., SINGH, S. K. Production and characterization of siderophores and its application in arsenic removal from contaminated soil. **Water Air Soil Pollution**. v.180, p.199-212, 2007.

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

OLIVEIRA, R. C. & VALLS, J. F. M. Novos sinônimos e ocorrências em *Paspalum L.* (Poaceae). **Hoehnea**. p. 289-295, 2008.

PATTEN, C. L., GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal Microbiology**. 42: 207-220.1996.

RAJKUMAR, M.A.E.N.; PRASAD, M.N.V.; FREITAS, H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends Biotechnology**. v. 28, p.142-149, 2010.

REIS,V. M; PEDRAZA, R. O; TEIXEIRA, K. R. S. Diversidade e relação filogenética de espécies do gênero *Azospirillum*. 20 p. Embrapa Agrobiologia (Documentos, 273), 2010.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**,v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

SANTACRUZ, G. A. A.; GÓMEZ, B. M.; FRANCISCO, J. B.; MOYA, E. G.; ORTIZ, R. E. P. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos em La asimilación de hierro por lãs plantas: uma síntesis. **Rev. Fitotec. Mex.** Vol. 35(1): 9-21.2012.

SANTI, C., BOGUSZ, D. FRANCHE, C. Nitrogen Fixation in non Legumes- Invited review. **Ann. Bot.** p.743-767. 2013.

SAHA, M.; SARKAR, S.; SARKAR, B.; SHARMA, B. K.; BHATTACHARJEE, S.; TRIBEDI, P. Microbial siderophores and their potential applications: a review. **Environmental Science Pollution Research.** v. 39, p.84-99, 2015.

SEUK C, PAULITA T, BAKER R Attributes associate with increased biocontrol activity of *Pseudomonas fluorescent*. **Journal of Plant Pathology.**v.4: p.218-225, 1988.

SAWAR, M. & KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, v.20, p.282-285, 1995.

SCHWYN, B. & NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochem.** v. 160, p.47-56, 1987.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, n.2, p. 507-512, 1974.

USDA. USDA Foreign Agricultural Service. Disponível em <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/>>. Acesso em setembro de 2015.

SHARMA S., B.; RIYAZ, Z. S.; MRUGESH H. T.; THIVAKARAN, A. G. Phosphate solubilizing microbes: a sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springer plus**; 2013. Disponível em: <http://www.springerplus.com/content/2/1/587>. [Acessado em 03.02.2017].

THOMPSON, J. P. and SKERMAN, V. B. D. *Azorhizophilus paspali*, comb. nov. invalidation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB n.6. **International Journal Systematic Bacteriology.** 215-218. 1981.

TORTORA, M. L., DÍAZ RICCI, J. C, PEDRAZA, R. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology** v. 193, p. 275-286, 2011.

VALLS, J. F. M. & OLIVEIRA, R. C. 2013. *Paspalum* in: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB013432>. Acesso em: 10 de Setembro de 2015.

VASSILEVA, M.; AZCON, R.; BAREA, J.M.; VASSLEV, N. Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. **Proc Biochem**; v.35, p.693-700, 2000.

WANG, R. F., CAO, W. W., CERNIGLIA, C. E., Phylogenetic analysis of *Fusobacterium prausnitzii* based upon 16S rRNA gene sequence and PCR confirmation. **International Journal Systematic Bacteriology.**v. 46, p. 341-343, 1996.

WU, H. Identification and characterization of a novel biotin synthesis gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol**; vol.71, p. 45-55. 2005.

XIE, H., PASTERNAK, J. J., GLICK, B. R. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* CR12-2 that overproduce indoleacetic acid. **Curr Microbiol**.v. 32, p.67-71. 1996.

YANO, D. M. Y.; ATTILI, D. S.; GATTI, M. S. V.; EGUCHI, S. Y.; OLIVEIRA, U. M. Técnicas de microbiologia em controle de qualidade. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1991.

YANO, D. M. Y.; FARRIS, M. G. UMINO, C. Y.; COUTINHO, H. L. C.; CANHOS, V. P. Técnicas para cultivo, identificação e preservação de bactérias. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello". Campinas, SP. 64 p. 1993.

ZANOTTI, C. A., POZNER, R.; MORRONE, O. Understanding spikelet orientation in Paniceae (*Poaceae*). **American Journal of Botany**. p.717-729, 2010.

## 7. ANEXOS

### 7.1. Isolados

**Tabela 10.** Lista da origem dos isolados de bactérias diazotróficas obtidas dos 10 genótipos de *Paspalum* sp.

Isolados	Genótipo	Amostra	Meio de cultura	Isolados	Genótipo	Amostra	Meio de cultura
1 LG	BRA25020	Raiz	LG	83 LG	BRA3824	Raiz	LG
2 LG	BRA25020	Solo rizosférico	LG	84 LG	BRA3824	Solo rizosférico	LG
3 LG	BRA25020	Raiz	LG	85 LG	BRA 3824	Raiz	LG
4 LG	BRA25020	Raiz	LG	86 LG	BRA3824	Solo rizosférico	LG
5 LG	BRA25020	Solo rizosférico	LG	87 LG	BRA12424	Raiz	LG
6 LG	BRA25020	Raiz	LG	88 LG	BRA12424	Solo rizosférico	LG
7 LG	BRA25020	Solo rizosférico	LG	89 LG	BRA12424	Raiz	LG
8 LG	BRA25020	Solo rizosférico	LG	90 LG	BRA12424	Solo rizosférico	LG
9 LG	BRA25020	Raiz	LG	91 LG	BRA12424	Solo rizosférico	LG
10 LG	BRA25020	Raiz	LG	92 LG	BRA12424	Solo rizosférico	LG
11 LG	BRA25020	Raiz	LG	93 LG	BRA11401	Solo rizosférico	LG
12 LG	BRA12254	Raiz	LG	94 LG	BRA11401	Solo rizosférico	LG
13 LG	BRA12254	Raiz	LG	95 LG	BRA11401	Raiz	LG
14 LG	BRA 12254	Raiz	LG	96 LG	BRA11401	Raiz	LG
15 LG	BRA 12254	Raiz	LG	97 LG	BRA11401	Solo rizosférico	LG
16 LG	BRA12254	Raiz	LG	98 LG	BRA 11401	Solo rizosférico	LG
17 LG	BRA 12254	Solo rizosférico	LG	99 LG	BRA11401	Solo rizosférico	LG
18 LG	BRA 12254	Solo rizosférico	LG	100 LG	BRA11401	Raiz	LG
19 LG	BRA12254	Solo rizosférico	LG	101 LG	BRA 11401	Solo rizosférico	LG
20 LG	BRA12254	Raiz	LG	102 LG	BRA11401	Solo rizosférico	LG
21 LG	BRA 12254	Solo rizosférico	LG	103 LG	BRA 11401	Solo rizosférico	LG
22 LG	BRA6491	Raiz	LG	104 LG	BRA11401	Raiz	LG
23 LG	BRA6491	Solo rizosférico	LG	105 LG	BRA12700	Solo rizosférico	LG
24 LG	BRA6491	Solo rizosférico	LG	106 LG	BRA 12700	Raiz	LG
25 LG	BRA6491	Solo rizosférico	LG	107 LG	BRA 12700	Solo Rizosférico	LG
26 LG	BRA6491	Raiz	LG	108 LG	BRA 12700	Raiz	LG
27 LG	BRA 6491	Solo rizosférico	LG	109 LG	BRA 12700	Raiz	LG
28 LG	BRA 6491	Solo rizosférico	LG	110 LG	BRA 23540	Raiz	LG
29 LG	BRA 6491	Solo rizosférico	LG	111 LG	BRA 23540	Solo Rizosférico	LG
30 LG	BRA6491	Solo rizosférico	LG	112 LG	BRA 23540	Solo Rizosférico	LG
31 LG	BRA 6491	Solo rizosférico	LG	113 LG	BRA 23540	Raiz	LG
32 LG	BRA19186	Raiz	LG	114 LG	BRA 23540	Solo Rizosférico	LG
33 LG	BRA19186	Raiz	LG	115 LG	BRA 23540	Solo Rizosférico	LG
34 LG	BRA19186	Raiz	LG	116 LG	BRA 23540	Raiz	LG
35 LG	BRA19186	Raiz	LG	117 LG	BRA 9610	Raiz	LG
36 LG	BRA19186	Raiz	LG	118 LG	BRA 9610	Raiz	LG
37 LG	BRA19186	Raiz	LG	119 LG	BRA 9610	Raiz	LG
38 LG	BRA 19186	Solo rizosférico	LG	120 LG	BRA 9610	Solo Rizosférico	LG
39 LG	BRA 19186	Solo rizosférico	LG	121 LG	BRA 9610	Raiz	LG
40 LG	BRA19186	Solo rizosférico	LG	122 LG	BRA 9610	Raiz	LG
41 LG	BRA19186	Raiz	LG	123 LG	BRA 9610	Solo Rizosférico	LG
42 LG	BRA19186	Raiz	LG	124 LG	BRA 9610	Solo Rizosférico	LG
43 LG	BRA19186	Solo rizosférico	LG	125 LG	BRA 9610	Solo Rizosférico	LG
44 LG	BRA19186	Raiz	LG	126 LG	BRA9610	Raiz	LG
45 LG	BRA19186	Raiz	LG	127 LG	BRA 9610	Raiz	LG
46 LG	BRA19186	Raiz	LG	1 N	BRA6491	Raiz	NFB
47 LG	BRA19186	Solo rizosférico	LG	2 N	BRA6491	Raiz	NFB

Continua...

Continuação da **Tabela 10.**

Isolados	Genótipo	Amostra	Meio de cultura	Isolados	Genótipo	Amostra	Meio de cultura
48 LG	BRA19186	Solo rizosférico	LG	3 N	BRA6491	Solo rizosférico	NFB
49 LG	BRA19186	Raiz	LG	4 N	BRA12254	Solo rizosférico	NFB
50 LG	BRA19186	Raiz	LG	5 N	BRA19186	Solo rizosférico	NFB
51 LG	BRA19186	Solo rizosférico	LG	6 N	BRA6491	Raiz	NFB
52 LG	BRA19186	Raiz	LG	7 N	BRA23540	Solo rizosférico	NFB
53 LG	BRA19186	Solo rizosférico	LG	8 N	BRA19186	Solo rizosférico	NFB
54 LG	BRA19186	Raiz	LG	10 N	BRA6491	Raiz	NFB
55 LG	BRA19186	Raiz	LG	11 N	BRA12254	Solo rizosférico	NFB
56 LG	BRA19186	Solo rizosférico	LG	12 N	BRA19186	Solo rizosférico	NFB
57 LG	BRA 19186	Raiz	LG	13 N	BRA12254	Solo rizosférico	NFB
58 LG	BRA19186	Raiz	LG	14 N	BRA25020	Solo rizosférico	NFB
59 LG	BRA19186	Raiz	LG	15 N	BRA6491	Raiz	NFB
60 LG	BRA19186	Raiz	LG	16 N	BRA19186	Raiz	NFB
61 LG	BRA19186	Raiz	LG	17 N	BRA19186	Raiz	NFB
62 LG	BRA19186	Solo rizosférico	LG	18 N	BRA 6491	Solo rizosférico	NFB
63 LG	BRA19186	Raiz	LG	1 LI	BRA 25020	Solo rizosférico	LGI
64 LG	BRA 19186	Raiz	LG	2 LI	BRA 25020	Solo rizosférico	LGI
65 LG	BRA19186	Raiz	LG	3 LI	BRA 11401	Solo rizosférico	LGI
66 LG	BRA19186	Raiz	LG	4 LI	BRA 12254	Raiz	LGI
67 LG	BRA 19186	Solo rizosférico	LG	5 LI	BRA 12254	Raiz	LGI
68 LG	BRA 19186	Raiz	LG	6 LI	BRA 12254	Solo Rizosférico	LGI
69 LG	BRA 19186	Solo rizosférico	LG	7 LI	BRA 19186	Raiz	LGI
70 LG	BRA19186	Raiz	LG	8 LI	BRA 19186	Raiz	LGI
71 LG	BRA19186	Raiz	LG	9 LI	BRA 19186	Raiz	LGI
72 LG	BRA 19186	Raiz	LG	10 LI	BRA19186	Raiz	LGI
73 LG	BRA19186	Raiz	LG	11 LI	BRA3824	Solo rizosférico	LGI
74 LG	BRA19186	Solo rizosférico	LG	12 LI	BRA3824	Solo rizosférico	LGI
75 LG	BRA 19186	Raiz	LG	13 LI	BRA12254	Solo rizosférico	LGI
76 LG	BRA 19186	Raiz	LG	14 LI	BRA12254	Raiz	LGI
77 LG	BRA 19186	Raiz	LG	15 LI	BRA12700	Raiz	LGI
78 LG	BRA 3824	Raiz	LG	16 LI	BRA23540	Solo rizosférico	LGI
79 LG	BRA 3824	Raiz	LG	17 LI	BRA23540	Solo rizosférico	LGI
80 LG	BRA 3824	Solo rizosférico	LG				
81 LG	BRA 3824	Raiz	LG				
82 LG	BRA 3824	Solo rizosférico	LG				

## 7.2. Meios

### Meio LG (LIPMAN, 1904)

Açúcar cristal		20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10%	0,5 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sol. 10%	1,5 mL
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10%	2 mL
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	sol. 10%	2 mL
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	sol. 0,1%	2 mL
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	sol. 1%	1 mL
Azul de bromotimol	sol. 0,5% em 0,2 N de KOH	5 mL

Ajustar o pH para 6,8-7,0;

Completar para 1000 mL com água destilada;

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

Obs: Para fazer LG+CaCO<sub>3</sub> adicionar 1 g de CaCO<sub>3</sub> grosso por litro de meio de cultura (não é necessário ajustar o pH).

**Meio NFb** (BALDANI & DÖBEREINER, Soil Biology & Biochemistry. Oxford, v. 12, n. 4 p. 433-439, 1980)

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

Ajustar o pH para 6,5 com solução de KOH a 10%;

Completar para 1000 mL com água destilada;

Adicionar 1,6g l<sup>-1</sup> de agar para semissólido e 15g l<sup>-1</sup> para sólido, para meio líquido adicionar 1g por Litro<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl (Cloroeto de amônio).

**Meio DYGS** (RODRIGUEZ NETO, Summa Phytopathologica, Campinas, v. 12, n. 1-2 p16, 1986)

Glicose	2g
Ácido málico	2g
Peptona bacteriológica	1,5g
Extrato de levedura	2g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5g
Ácido glutâmico	1,5g

Ajustar o pH com solução de KOH a 10% pH 6,0 para *Herbaspirillum*. pH 6,0 para *Gluconacetobacter* (menos ácido málico) ou pH 6,8 para *Azospirillum*;

Completar para 1000 mL com água destilada.

**Meio Batata** (BALDANI & DÖBEREINER, Soil Biology & Biochemistry. Oxford, v. 12, n. 4, p. 433-439, 1980)

Batata cozida	200 g
Ácido málico	2,5 g
Açúcar cristal	2,5 g
Solução de micronutrientes	2 mL
Solução de vitaminas	1 mL

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

adicionar o ácido málico em 50 mL de água destilada com 2 gotas de azul de bromotimol solução a 0,5% em 0,2 N de KOH.

Adicionar o açúcar cristal, o micronutriente e a vitamina e ajustar o pH com KOH ate atingir pH 6,8 - 7,0;

Filtrar a batata em algodão e juntar a solução preparada anteriormente ao filtrado;

Completar o volume para 1000 mL;

Adicionar  $1,84 \text{ g L}^{-1}$  de ágar para semi-sólido e  $15 \text{ g l}^{-1}$  de ágar para sólido.

### 7.3. Soluções

#### **Solução salina para diluição seriada**

$\text{K}_2\text{HPO}_4$	sol. 10%	1mL
$\text{MgSO}_4$	sol. 10%	0,5mL
$\text{NaCl}$	sol. 10%	0,2mL
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	sol. 1%	0,5mL
$\text{FeEDTA}$	sol. 1,64%	1mL
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		0,5MI

Ajustar o pH para 6,5 com solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 5%;

Completar para 1000 mL com água destilada.

#### **Solução de micronutrientes para meio de cultura**

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,200g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,235g
$\text{H}_2\text{BO}_4$	0,280g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,008g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,024g

Completar para 200 mL com água destilada.

#### **Solução de vitaminas**

Biotina	10mg
Piridoxol - HCL	20mg

Dissolver em banho-maria e completar o volume para 100 mL com água destilada.