

UFRRJ

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

DISSERTAÇÃO

**Contribuição das Bactérias Diazotróficas no
Crescimento de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu**

Leonardo dos Santos França Shockness

2016



UFRRJ

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

**CONTRIBUIÇÃO DAS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NO
CRESCIMENTO DE *Brachiaria brizantha* CV MARANDU.**

LEONARDO DOS SANTOS FRANÇA SHOCKNESS

Sob a Orientação da Professora
Vera Lucia Divan Baldani

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2016

633.2 Shockness, Leonardo dos Santos França, 1987-
S559c Contribuição das bactérias diazotróficas no
T crescimento de *Brachiaria brizantha* cv Marandu /
Leonardo dos Santos França Shockness – 2016.
35 f.: il.

Orientador: Vera Lucia Divan Baldani.

Dissertação (mestrado) – Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-
Graduação em Agronomia – Ciência do Solo.

Bibliografia: f. 22-28.

1. Plantas forrageiras – Teses. 2. Gramínea –
Teses. 3. Pastagens - Teses. 4. Nitrogênio – Fixação –
Teses. 5. *Brachiaria decumbens* – Teses. I. Baldani,
Vera Lucia Divan, 1954-. II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Agronomia – Ciência do Solo. III. Título.

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

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

LEONARDO DOS SANTOS FRANÇA SHOCKNESS

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

APROVADO EM 26/02/2016.

Vera Lucia Divan Baldani. Dr^a. Embrapa Agrobiologia
(Orientadora)

Adelson Paulo de Araújo. Dr. UFRRJ

Paulo César Teixeira. Dr. Embrapa Solos

DEDICO

Aos que um dia poderão usufruir do objeto deste estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sua infinita bondade, misericórdia e graça para comigo.
Agradeço a meus pais por terem me ajudado para chegar onde cheguei.

Agradeço à minha noiva, minha companheira Adrielli Paula Felipe pelo amor, pela paciência e por estar sempre junto nas horas difíceis, mesmo quando estávamos longe, Te Amo!

Agradeço aos amigos que fiz na Embrapa Agrobiologia, Lúcio, Wilson, João Luiz, Claudinho, Marildo, Geraldo, Maura, Tatu e Pedro vocês foram responsáveis por tornar as horas de trabalho mais amenas.

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida.

Agradeço à Embrapa Agrobiologia por permitir usar suas instalações.

Agradeço ao CPGA-CS pela oportunidade.

Agradeço à UFRRJ por ter me acolhido.

Agradeço à minha orientadora Dr. Vera Lúcia Divan Baldani.

Agradeço aos Professores que me ajudaram a chegar até aqui, Rodolfo, Ana Lucy, Berbara, Emanuel, Elvino e Rosalvo.

Agradeço ao Laboratório de Estudos das Relações Solo-Planta.

Agradeço a todos colegas do Laboratório de Gramíneas.

Agradeço aos amigos do alojamento que durante dois anos me aturaram, Pedro, Lívia, Murilo, Jander, Wilk, Betão, Mariana, Carlinha, Renata e Rafael Scoriza, Fresha, César, Silvana e Carlos, Pai, Jean, Ernane, Rulfe, Fabiano, Lucero, Ricardo, Tião, Hipólito, Hágabo, Terra e aos que ficaram pouco tempo mas prosearam bastante.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta o meu Muito Obrigado!!!!

RESUMO

SHOCKNESS, Leonardo dos Santos França. **Contribuição das bactérias diazotróficas no crescimento de *Brachiaria brizhanta* cv. Marandu**. 2016. 35 f Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. 2016.

Um dos principais fatores que afeta o crescimento e a persistência de gramíneas nos trópicos, aumentando assim a degradação das pastagens, é a deficiência de nitrogênio no solo. Entretanto, fertilizantes nitrogenados oneram muito os custos de produção, e com a demanda por alimentos crescendo ano a ano, tem-se enfatizado a necessidade de alternativas sustentáveis, tal como a fixação biológica de nitrogênio. Faz-se necessário pesquisas com Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) em gramíneas forrageiras, principalmente sobre diversidade de bactérias diazotróficas associadas a essas plantas, para que novas bactérias possam ser descobertas, assim como seu potencial de FBN. Este trabalho teve como objetivo isolar bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum Spp.* ou *Herbaspirillum Spp.*, provenientes de duas cultivares de *B. brizhanta* (Marandu e Xaráes) e de uma cultivar de *B. decumbens* (Ipean), testar as mesmas, e avaliar sua contribuição no crescimento de *Brachiaria brizhanta* cv. Marandu identificando as três mais promissoras. O trabalho foi realizado na Embrapa Agrobiologia em Seropédica – RJ, em duas etapas. Na primeira foi feito o isolamento de possíveis bactérias dizotróficas provenientes de plantas de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria decumbens*, sendo utilizadas as cultivares Marandu e Xaráes de *B. brizantha* e a cultivar IPEAN de *B. decumbens*. O isolamento foi realizado utilizando três meios semissólidos, NFB, LGI e JNFB, onde os dois primeiros selecionaram bactérias do gênero *Azospirillum*, e o terceiro bactérias do gênero *Herbaspirillum*. Foram selecionados 46 isolados, e após a purificação obteve-se 15 isolados puros, sendo feita a caracterização fenotípica dos mesmos, e posteriormente os testes bioquímicos de solubilização de fosfato, análise da redução de acetileno (ARA) e produção de ácido-3-indolacético (AIA). Na ARA todos isolados avaliados produziram etileno, mesmo em pequenas quantidades, tendo destaque os isolados L2, L4, J3, J6, J7, e J8. Na solubilização de fosfato os isolados N1, L1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8 e T14 foram capazes de solubilizar fosfato. Na produção de AIA se sobressaíram os isolados N1, J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8 e J9. Na segunda etapa foi realizado o experimento de interação planta - bactéria; que consistiu da inoculação dos 15 isolados da primeira etapa, acrescidos de três isolados conhecidos como padrões (SP245, Z94, CBAMC) em *B. brizhanta* cv. Marandu, mais a testemunha não inoculada e sem N. Neste experimento os isolados L2, L4 e J6 se destacaram em relação aos outros nos sete parâmetros avaliados. Com base neste trabalho podemos concluir que existem bactérias fixadoras de nitrogênio, solubilizadoras de fosfato e que produzem ácido-3-indolacético associadas a *Brachiaria brizhanta* e *Brachiaria decumbens*. As bactérias isoladas de duas cultivares de *B. brizhanta* (Marandu e Xaráes) e de uma cultivar de *B. decumbens* (Ipean) se mostraram mais eficientes no crescimento de *B. brizhanta* cv. Marandu do que as bactérias padrões provenientes de outras espécies de plantas. Ainda, dentre os 15 isolados de plantas do gênero *Brachiaria*, os isolados J6, L2 e L4 diferiram estatisticamente dos demais, sendo considerados os três mais promissores.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio. Gramíneas. Pastagem.

ABSTRACT

SHOCKNESS, Leonardo dos Santos França. **Contribution of diazotrophic bacteria in the growth of *Brachiaria brizhanta* cv. Marandu**. 2016. 35 p Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. 2016.

One of the main factors that affect growth and persistence of grasses in the tropics, thus increasing the degradation of pastures, is a nitrogen deficiency in the soil. However, nitrogen fertilizers much burden the production costs, and the demand for food increasing year by year, has emphasized the need for sustainable alternatives, such as biological nitrogen fixation. It is necessary to do more research on Biological Nitrogen Fixation (BNF) in forage grasses, especially about diversity among nitrogen-fixing bacteria associated with these plants, so that new bacteria can be discovered, as well as its potential to FBN. This study aimed to isolate diazotrophic bacteria of the genus *Azospirillum* spp. or *Herbaspirillum* spp., from two cultivars of *B. brizhanta* (Marandu and Xaraés) and one of *B. decumbens* (IPEAN), to test them, and to assess their contribution to the growth of *Brachiaria brizhanta* cv. Marandu identifying the three most promising. This study was conducted at Embrapa Agrobiology in Seropédica - RJ, in two stages. The first was to isolate possible diazotrophic bacteria from *Brachiaria brizantha* and *B. decumbens* plants, using the cultivars Marandu and Xaraés *B. brizantha*, and the cultivar IPEAN of *B. decumbens*. The isolation was performed using three semi-solid media, NFB, LGI and JNFb, where the first two selected bacteria of the genus *Azospirillum*, and the third one *Herbaspirillum* bacteria. There were selected 46 isolates and, after purification, it was obtained 15 isolates pure, and made the phenotypic characterization thereof. Further biochemical tests were the phosphate solubilization, acetylene reduction analysis (ARA), and production of acid-3-indole acetic (IAA). All tested isolates produced ARA ethylene, even in small quantities, with prominence for isolates L2, L4, J3, J6, J7 and J8. In the phosphate solubilization the isolates N1, L1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8, and T14 were able to solubilize phosphate. In the EIA production the isolates N1, J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8 and J9 excelled. In the second phase it was conducted an experiment to study plant - bacteria interaction. It consisted of the inoculation of 15 isolates from the first phase plus three isolates known as references (SP245, Z94, CBAMC) in *B. brizhanta* cultivar Marandu, plus the control without inoculation and without N. In this experiment the isolates L2, L4 and J6 outstand when compared to the other seven parameters evaluated. On the basis of this study we can conclude that there are nitrogen fixing bacteria, phosphate solubilizing, and that produce 3-indoleacetic acid, associated to *Brachiaria brizhanta* and *Brachiaria decumbens*. The isolated bacteria of the two *B. brizhanta* cultivars (Marandu and Xaraés), and the *Brachiaria decumbens* (IPEAN) cultivar were more efficient in the growth of *B. brizhanta* cultivar Marandu than the bacteria standards obtained from other plant species. Also, among the 15 isolates from *Brachiaria* plants, the J6, L2 and L4 were statistically different from the others, and are considered the three most promising.

Key words: Biological nitrogen fixation. Grasses. Pasture.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Atividade da nitrogenase, pelo método de Redução de Acetileno (ARA), dos 15 isolados obtidos de <i>Brachiaria</i>	14
Figura 2. Índice de Solubilização de Fosfato dos diferentes isolados de diferentes cultivares de <i>Brachiaria</i>	14
Figura 3. Número de isolados classificados quanto ao Índice de Solubilização.	15
Figura 4. Produção de ácido-3-indolacético (AIA) pelos 15 isolados de duas cultivares de <i>B. Brizantha</i> e uma cultivar de <i>B. decumbens</i>	15
Figura 5. Processo de Purificação: meios semissólidos com as respectivas películas (A) e (B); placa com isolados (C); estoque de isolado puro (D).	29
Figura 6. Frascos com isolados usados para redução de acetileno (ARA) (A), (B) e (C); equipamento utilizado.	29
Figura 7. Microplaca com curva padrão e os 15 isolados acrescidos dos três padrões.	30
Figura 8. Placas de Petri com isolados, usadas para análise da solubilização de fosfato.	30
Figura 9. Montagem do experimento.	31
Figura 10. Três principais tratamentos que diferiram estatisticamente: T3 = L2 (A); T5 = L4 (B); T11 = J6 (C). E mais: T19 = Testemunha (D).	31

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Contagem do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas isoladas de raízes e parte aérea de três cultivares de <i>Brachiaria</i> em três meios de Cultura.	11
Tabela 2. Colônias de diazotrofos isoladas em seus respectivos meios semi-seletivos.	11
Tabela 3. Identificação dos 15 isolados de diazotrofos obtidos de raízes e parte aérea dos diferentes cultivares de <i>Brachiaria</i> , nos meios de cultura NFB, LGI e JNFB.	12
Tabela 4. Caracterização fenotípica das colônias de diazotrofos formadas pelos isolados obtidos em diferentes partes da planta dos diferentes genótipos de <i>Brachiaria</i> utilizados.	13
Tabela 5. Médias dos tratamentos na avaliação de massa fresca e seca da parte aérea no crescimento de <i>B. brizantha</i> inoculada com 15 isolados provenientes de duas cultivares de <i>B. brizantha</i> e uma cultivar de <i>B. decumbens</i> , mais três estirpes conhecidas e testemunha sem inoculação e sem N.	16
Tabela 6. Médias dos tratamentos na avaliação de massa fresca e seca radicular no crescimento de <i>B. brizantha</i> inoculada com 15 isolados provenientes de duas cultivares de <i>B. brizantha</i> e uma cultivar de <i>B. decumbens</i> , mais três estirpes conhecidas e testemunha sem inoculação e sem N.	17
Tabela 7. Médias dos tratamentos na avaliação de comprimento, área e volume radicular no crescimento de <i>B. brizantha</i> inoculada com 15 isolados provenientes de duas cultivares de <i>B. brizantha</i> e uma cultivar de <i>B. decumbens</i> , mais três estirpes conhecidas e testemunha sem inoculação e sem N.	18
Tabela 8. Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros avaliados.	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. A Importância do Gênero <i>Brachiaria</i>	2
2.1.1. <i>Brachiaria brizantha</i>	3
2.1.2. <i>Brachiaria decumbens</i>	4
2.2. Bactérias Diazotróficas	4
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
3.1. Local de Procedência das Cultivares de <i>Brachiaria brizantha</i> e <i>Brachiria decumbens</i>	7
3.2. Preparo das Amostras e das Diluições.....	7
3.3. Meios de Cultura e Condições de Cultivos Utilizados	8
3.4. Caracterização dos Isolados.....	8
3.4.1. Caracterização fenotípica	8
3.4.2. Caracterização fisiológica	8
3.5. Experimento de Interação Planta – Bactéria.....	9
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
4.1. Isolamento e Caracterização Fenotípica	11
4.2. Caracterização Fisiológica.....	13
4.2.1 Atividade da nitrogenase (ARA).....	13
4.2.2 Solubilização de fosfato	14
4.2.3. Produção de ácido-3-indolacético (AIA).....	15
4.3. Experimento de Interação Planta – Bactéria.....	16
4.3.1. Massa fresca e seca da parte aérea	16
4.3.2. Massa fresca e seca radicular	17
4.3.3. Comprimento, área e volume radicular.....	18
5. CONCLUSÕES	20
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
8. ANEXOS.....	29

1. INTRODUÇÃO

A forrageiras são de grande importância na produção de bovinos no Brasil, sendo evidenciada pela extensão de terra ocupada por estas, onde as áreas dedicadas à pecuária ocupam 210 milhões de hectares ou 20% do território nacional contra apenas 10% das áreas agrícolas (IBGE, 2006), e cerca de 88% da carne bovina produzida no país é de origem quase que exclusiva de rebanhos mantidos em pastagens (COSTA et al., 2009). A maior evidência da importância das forrageiras é o fato de o Brasil estar entre os maiores produtores e exportadores mundiais de carne, sendo que a produção brasileira de carne deve continuar seguindo um rápido crescimento na próxima década, e os preços do produto devem aumentar fortemente durante os próximos dez anos, algo em torno de 4,4% a.a. (OCDE-FAO, 2015).

Porém essa grande área coberta com pastagem, quase que em monocultivo, em solos de baixa fertilidade e muitas vezes com manejo inadequado, apresenta grande risco para a pecuária, evidenciado principalmente pelo seu acelerado processo de degradação. Essas áreas estão presentes e distribuídas em todos os Estados e Biomas brasileiros, em diferentes níveis de degradação, os quais são proporcionais à área ocupada pelas pastagens. A degradação das pastagens é o fator mais importante, na atualidade, que compromete a sustentabilidade da produção animal, e pode ser explicada como um processo dinâmico de degeneração ou de queda relativa da produtividade (MACEDO & ZIMMER, 1993; MACEDO, 1999).

Muitos são os fatores que desencadeiam a degradação das pastagens, tais como superlotação, manejo e práticas culturais, uso de fogo, ausência ou uso inadequado da adubação, dentre outros. Um dos principais fatores que afeta crescimento e a persistência de gramíneas nos trópicos, aumentando assim a degradação das pastagens, é a deficiência de nitrogênio no solo, uma vez que este nutriente acelera a formação e o crescimento de novas folhas e aumenta o vigor de rebrota, melhorando sua recuperação após o corte e resultando em maior produção e capacidade de suporte das pastagens (CECATO et al. 1996).

Entretanto, os fertilizantes nitrogenados oneram muito os custos de produção, e com a demanda por alimentos crescendo ano a ano, tem-se enfatizado a necessidade de alternativas sustentáveis, tal como a fixação biológica de nitrogênio (FBN). A FBN é feita, principalmente, por bactérias conhecidas como diazotróficas que podem colonizar a região rizosférica, o interior (endofíticas) ou a superfície (epifíticas) de tecidos vegetais (SOUTO, 1982; BASHAN et al., 2004; BODDEY et al., 2003).

A interação entre bactérias diazotróficas e as diversas culturas, tais como, gramíneas forrageiras, milho, trigo e arroz, tem sido tema de pesquisas no mundo inteiro, devido ao seu potencial biotecnológico evidenciado no aumento da produtividade dessas culturas, contribuindo com a redução dos custos de produção, auxiliando assim na manutenção e conservação dos recursos ambientais. Faz-se necessário pesquisas com FBN em gramíneas forrageiras, principalmente na área de diversidade de bactérias diazotróficas associadas a essas plantas, para que novas bactérias possam ser descobertas, assim como seu potencial de FBN (MOREIRA et al., 2010; SANTOS, 2013).

Este trabalho teve como objetivo isolar bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* Spp. ou *Herbaspirillum* Spp., provenientes de duas cultivares de *B. brizhanta* (Marandu e Xaráes) e de uma cultivar de *B. decumbens* (Ipean), testar as mesmas, e avaliar sua contribuição no crescimento de *Brachiaria brizhanta* cv. Marandu identificando as três mais promissoras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Importância do Gênero *Brachiaria*

O gênero *Brachiaria* pertence à tribo Paniceae da família Poaceae. Este abrange cerca de 100 espécies de plantas distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, encontrando-se a maior diversidade desta espécie principalmente no continente africano (Monteiro et al., 1974). Segundo Portes et al (2003) um dos fatores que influenciou no aumento das áreas de pastagem e também na produção foi a introdução de espécies forrageiras originárias da África, principalmente as do gênero *Brachiaria*, forrageiras bem adaptadas as condições de clima e solos brasileiros e com crescimento vigoroso.

No Brasil, de acordo com Sendulsky (1977), levantamentos efetuados indicam a presença de 16 espécies entre exóticas e nativas, sendo que as quatro mais utilizadas como plantas forrageiras são de origem africana: *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruziziensis* e *B. humidicola*. Fato esse que pode ser confirmado onde dos milhões de hectares cultivados de pastagem nativas ou cultivadas, cerca de 70 a 80% são formados por espécies do gênero *Brachiaria* (VALLE et al, 2001).

A primeira introdução oficial de *Brachiaria* no Brasil, ocorreu em 1952, com a *B. decumbens*, pelo Instituto de Pesquisa Agropecuária do Norte (IPEAN) em Belém, Pará (SERRÃO & SIMÃO NETO, 1971). Justamente por ter sido trazido para o território brasileiro pelo referido instituto, esta ficou conhecida com cv. Ipean, porém devido a sua baixa produção de sementes não ganhou importância comercial no país. No entanto, a partir de 1965, com a importação de *B. ruzizienses* e *B. brizantha*, junto com grandes quantidades de sementes, foi que o gênero *Brachiaria* começou a conseguir seu reconhecimento, começando pela região Amazônica e depois se espalhando pelas regiões Centro-Oeste e Sudeste e se expandindo de 1970 em diante, onde ocorreu uma aumento considerável de pastagens do gênero *Brachiaria*, principalmente as espécies de *B. decumbens*, *B. brizantha*, *B. ruzizienses* e *B. humidicola*, (ALVIM, 2002).

Foi também nessa época de grande crescimento e expansão do gênero *Brachiaria* que apareceram os primeiros problemas relatados ao gênero, causados pelas cigarrinhas-das-pastagens em áreas formadas com *B. decumbens* causando grandes prejuízos à pecuária brasileira daquela época, aliado a descoberta do efeito de fotossensibilização, principalmente em bezerros, observado em pastagens implantadas com a cv. Basilisk, fazendo com que ocorresse a busca por novas variedades (MENDONÇA, 2012).

Segundo Nunes et al. (1984), a liberação *B. brizantha* cv. Marandu em 1984, que apresenta resistência às cigarrinhas, fez com que esse cenário de problemas relacionados ao gênero fosse mudando, ocorrendo então a substituição das áreas de pastagens implantadas com *B. decumbens* por *B. brizantha* cv Marandu, popularmente conhecido como “capim-braquiara”.

Durante meados da década de 80, foram realizadas viagens de coleta ao Leste Africano, centro de maior diversidade genética e dispersão do gênero *Brachiaria*, buscando reunir uma maior variabilidade para incentivar a diversificação de pastagens. Parte da coleção reunida pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), foi introduzida no país pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), (KELLER-GREIN et al., 1996; MILES & VALLE, 1996).

As espécies do gênero *Brachiaria* desempenham papel muito importante na pecuária de corte e de leite, pois viabilizam a mesma em solos ácidos e de baixa fertilidade, condição predominante em solos amazônicos e de cerrado, além de proporcionar a criação de novos

polos de desenvolvimento, fatores que despertam grande interesse dos pecuaristas, aliado ao fato de serem plantas de alta produção de massa seca, apresentarem poucos problemas com doenças e mostrarem bom crescimento durante a maior parte do ano, inclusive no período seco (COSTA, 2006). Além desses fatores, a importância do gênero é aumentada pela boa adaptabilidade que essas espécies apresentam a vários tipos de solos (SOUZA FILHO & DUTRA, 1991) e, principalmente, por serem resistentes a cigarrinha-das-pastagens, sendo umas espécies mais resistentes do que as outras (VALLE et al., 2000).

O gênero *Brachiaria* é atualmente conhecido taxonomicamente como gênero *Urochloa* (RODRIGUES-DA-SILVA, 2003). Devido a tal mudança, a espécie *B. brizantha* é agora denominada *Urochloa brizantha* e a espécie *B. decumbens* agora é denominada de *Urochloa decumbens*, entretanto, a nomenclatura *B. brizantha* foi utilizada neste trabalho por ser mais conhecida e por estar sendo utilizada pelos pesquisadores da área.

2.1.1. *Brachiaria brizantha*

Dentre as espécies mais cultivadas e utilizadas, a *Brachiaria brizantha* tem apresentado alta capacidade de adaptação, sendo responsável por grande parte da alimentação do rebanho bovino criado a pasto. Representa considerável aumento da área plantada, sendo, devido ao maior porte, uma das forrageiras mais plantadas no Brasil nos últimos 15 anos em relação às outras espécies de braquiária (MACEDO, 2005).

Trata-se de uma excelente fonte de alimento, de boa qualidade, desde que se obedeça à exigência nutricional da planta, com adubação e manejo adequado, caso contrário, perde o valor nutritivo rapidamente, principalmente após o florescimento (VALLE et al., 2001).

A *B. brizantha* é uma planta cespitosa, com colmos iniciais prostrados, mas produzindo perfilhos predominantemente eretos. Apresenta pelos na porção apical dos entrenós e bainhas, e lâminas largas e longas com pubescência apenas na face inferior e com margens não cortantes (SEIFFERT, 1980).

Segundo Alvim (2002), devido ao seu hábito de crescimento, a *B. brizantha* possibilita a consorciação com plantas leguminosas, tais como *Pueraria phaseoloides*, *Centrosema pubescens*, *Stylosanthes guianensis* e *Calopogonium mucunoides*, e apesar de seu hábito de crescimento, também pode ser recomendada para formar pastagens em áreas declivosas sujeitas a erosão, pois controla bem a mesma.

Segundo Correia e Santos (2003), dentre os aspectos positivos da *B. brizantha*, podemos destacar:

- ✓ Resistência à cigarrinha das pastagens;
- ✓ Elevada produção de matéria seca;
- ✓ Alta qualidade de forragem;
- ✓ Elevada resposta à adubação;
- ✓ Boa produção de sementes;
- ✓ Boa cobertura de solo;
- ✓ Competição com invasoras;
- ✓ Adequada para utilização na forma de pasto vedado;
- ✓ Não atacada por formigas cortadeiras de folhas;
- ✓ Estabelecimento rápido.

2.1.2. *Brachiaria decumbens*

A *Brachiaria decumbens* é originária, do leste tropical da África, próximo a Região dos Grandes Lagos em Uganda, sob um clima moderadamente úmido, em pastagens abertas, ou em áreas com arbustos esporádicos e em solos férteis, podendo suportar grande pressão de pastejo, como ocorre em Uganda, onde as pastagens nativas devido ao pastejo excessivo, foram convertidas em pastagens de *B. decumbens* (BOGDAN 1977).

A *Brachiaria decumbens* é uma forrageira amplamente utilizada como fonte alimentar para ruminantes no Brasil devido sua boa adaptação e produção de massa em condições climáticas tropicais (SATURNINO, 2010). É uma espécie bem adaptada a áreas tropicais úmidas com verão chuvoso, e estação seca de quatro ou cinco meses (VIEIRA, 1974), pois requer precipitação acima de 1000 mm, tolerando períodos secos (VILELA, 1977).

A *B. decumbens* possui boa adaptação aos solos fracos e ácidos, tem fácil estabelecimento, boa produtividade de forragem sob uso intensivo, boa tolerância à sombra e boa qualidade forrageira, além de elevada persistência (VALLE et al., 2010).

A *B. decumbens* juntamente com a *B. humidicola*, é indicada para áreas de solo com baixa fertilidade, áreas íngremes ou que sejam mais suscetíveis a erosão, pois proporcionam boa cobertura do solo (ZIMMER & BARBOSA, 2005).

Apesar da suscetibilidade a cigarrinha das pastagens, aliado a possibilidade de poder causar fotossensibilização hepatógena em bezerros recém desmamados, já que em determinadas ocasiões a planta pode ser hospedeira do fungo *Phytomyces chartarum*, agente causador da fotossensibilização, que ocorre quando é ingerido pelos animais em pastejo superior a 90 dias (BOTREL et al., 1999), ainda assim a *B. decumbens* permanece no mercado de sementes como umas das espécies com maior participação na formação de pasto (VALLE et al., 2004).

2.2. Bactérias Diazotróficas

O nitrogênio em forma gasosa (N_2) ocorre em nossa atmosfera com concentração de aproximadamente 78%, sendo um dos maiores limitantes para a manutenção de qualquer forma de vida no planeta, pois a grande maioria dos seres vivos não tem acesso a este reservatório. Os únicos seres vivos capazes de converter o N-atmosférico a N-combinado são as bactérias dizotróficas, e o processo realizado por elas reduzindo o N-atmosférico a formas assimiláveis, e garantindo a resiliência deste processo, é conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN) (SILVA, 2010).

As bactérias dizotróficas compreendem um vasto grupo de organismos procariotos, onde podem ser encontrados organismos representantes de arqueobactérias, cianobactérias, bactérias gram-positivas e gram-negativas, apresentando grande diversidade fisiológica, morfológicas, genética e filogenética. Essa vasta diversidade garante a resiliência dos processos, e também a ocorrências deste em ampla gama de habitats terrestres (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

As bactérias diazotróficas são microrganismos capazes de realizar a conversão do nitrogênio gasoso (N_2) em formas acessíveis aos demais eucariotos (NH_3 , etc.). Esses microrganismos podem associar-se a rizosfera de gramíneas (associativos) ou até mesmo colonizar o interior dos tecidos das mesmas (endofíticos) (BALDANI et al., 1997).

Além da fixação biológica de nitrogênio, alguns desses microrganismos tem a capacidade de promover o crescimento vegetal através da solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo e produzem, ou alteram, a concentração de hormônios vegetais (ROESCH, 2003). Por essas características, essas bactérias foram coletivamente chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (CATTELAN, 1999).

Segundo Moreira et al. (2008) devido a essa ampla diversidade de habitats, as diazotróficas tem sido encontradas em associação com diversas culturas, tais como, milho, arroz, cana-de-açúcar, trigo, café, palmeiras, gramíneas, entre outros. Há também relatos de sua presença em solos contaminados com metais pesados (MOREIRA et al, 2008), em solos tratados com resíduos siderúrgicos e biossólido industrial (MELLONI et al., 2000), em áreas sob reabilitação de bauxita (MELLONI et al., 2004; NÓBREGA et al., 2004) e em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia (SILVA, 2006).

A interação de bactérias diazotróficas com as culturas tem sido pesquisada em todo o mundo, devido ao potencial no aumento da produtividade das culturas, o que pode reduzir custos de produção, diminuindo o volume de adubos nitrogenados e, conseqüentemente, melhorar conservação dos recursos ambientais (KUSS, 2006).

As bactérias fixadoras de nitrogênio podem ser classificadas em três grupos: diazotrofos de vida livre, que fixam o nitrogênio apenas para seu próprio uso; diazotrofos associativos, que auxiliam para o crescimento de plantas sem contudo formar estruturas diferenciadas, não ocorrendo simbiose e os diazotrofos simbióticos, que estabelecem uma interação mais específica entre o macro e micro simbiote, e em alguns casos, formam estruturas diferenciadas chamadas nódulos, que ocorrem preferencialmente em plantas leguminosas (EVANS & BURRIS, 1992).

As bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas podem ser agrupadas em três categorias: organismos rizosféricos, endofíticos facultativos e endofíticos obrigatórios (BALDANI et al., 1997).

Na primeira categoria estão todas as espécies que colonizam as raízes superficialmente, na chamada rizosfera. Os microrganismos endofíticos facultativos são aqueles capazes de colonizar raízes interna e externamente e o terceiro grupo, tido como de maior importância, os que colonizam o interior de raízes e também a parte aérea das plantas não leguminosas (MARIN et al., 1999).

A denominação de bactéria endofítica, é devido ao fato de serem capazes de viver no interior do vegetal sem que induzam uma resposta de defesa a sua presença (PETRINI, 1991). Essa definição inclui bactérias endofíticas simbióticas, assim como associativas, e ainda, bactérias que são endófitas em apenas alguma fase do seu ciclo de vida, transitando entre colonização rizosférica e endofítica (HALLMANN et al., 1997).

As primeiras espécies de diazotrofos associativos foram isoladas de raízes e partes aéreas de gramíneas e palmeiras (MAGALHÃES; DÖBEREINER, 1984). Dentre as bactérias diazotróficas, as mais estudadas são as pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, que já foram isolados em plantas de milho (PERIN et al., 2006; DOBEREINER et al.1976) e cana-de-açúcar (REIS JUNIOR et al., 2004; DOBEREINER et al.1976).

Rodrigues et al. (2006) afirma que várias bactérias diazotróficas endofíticas, representantes dos gêneros *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Burkholderia* e *Herbaspirillum*, foram identificadas em associação com variedades de arroz, em diferentes países. Outros diazotrofos que também já foram estudados são as bactérias do gênero *Gluconacetobacter* (YAMADA et al., 1997; DOBEREINER et al.1976).

Entre os organismos classificados como diazotrofos rizosféricos temos o gênero *Azospirillum*, que colonizam principalmente a zona de alongação e pelos radiculares, onde ainda algumas estirpes de *Azospirillum* pode ser encontradas no interior dos vegetais, recebendo a denominação de endofíticos facultativos (DOBBELAERE et al., 2002).

Reis et al. (2010) afirma que 15 espécies de *Azospirillum* já foram descritas, sendo elas: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereinerae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. canadense*, *A. zae*, *A. rugosum*, *A. palatum*, *A. picis*, *A. thiophilum*.

Dentre as espécies descritas as mais estudadas são *A. lipoferum*, *A. brasilense* e *A. amazonense*. As duas primeiras espécies são normalmente encontradas em áreas tropicais associadas com forrageiras e cereais como milho, arroz, trigo, sorgo além de outras gramíneas como a cana-de-açúcar e de diversas plantas de outras famílias (HARTMAN; BALDANI, 2006; ZAMBRANO et al., 2007). Já a *A. amazonense* foi isolada a partir de amostras de espécies forrageiras plantadas na região amazônica, sendo também encontrada em associação com a rizosfera de arroz, milho e sorgo, além de outras gramíneas utilizadas como pastagens em áreas localizadas na região do Cerrado e Mata Atlântica (MAGALHÃES et al., 1983; REIS JUNIOR et al., 2006).

As bactérias do gênero *Azospirillum* tem proporcionado efeitos benéficos para as plantas, dentro os principais são o aumento da densidade e comprimento dos pelos absorventes das raízes; incrementos na velocidade de aparecimento de raízes laterais e do volume de superfície radicular; alteração da respiração das raízes e das atividades de enzimas da via glicolítica e do ciclo dos ácidos tricarbóxicos; produção de nitritos; aumento na absorção de nutrientes e sinais moleculares que interferem no metabolismo das plantas. Além destes efeitos hormonais, as bactérias do gênero *Azospirillum* ainda contribuem para a planta associada com nitrogênio fixado (SANTOS, 2013).

Hungria (2011), afirma ainda que inoculantes compostos por estirpes de *Azospirillum spp.* são comercializados para inoculação em trigo e milho, com aumentos de 31 e 26 % na produtividade de grãos, respectivamente.

Com os resultados satisfatórios obtidos com os diazotrofos rizosféricos, outras bactérias associadas a gramíneas passaram a ser estudadas, dentre elas destacam-se *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Burkholderia tropica*, que possuem um modo de colonização diferente das bactérias do gênero *Azospirillum*, pois são consideradas endofíticas obrigatórias (BALDANI; BALDANI, 2005).

Segundo Baldani et al (1986), a primeira espécie endófito identificada foi o *Herbaspirillum seropedicae*, e posteriormente, outros membros do gênero foram identificados como o *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BALDANI et al., 1996), *Herbaspirillum frisingense* (KIRCHHOF et al., 2001) e houve a descrição de uma espécie isolada de nódulos de feijão coabitando com o Rizóbio, o *Herbaspirillum lusitanum* (VALVERDE et al., 2003).

As bactérias do gênero *Herbaspirillum* são considerados bactérias endofíticas obrigatórias, tendo baixa sobrevivência no solo (BALDANI et al., 1996). As bactérias do referido gênero, são capazes de colonizar nichos específicos no interior dos tecidos vegetais, podendo de forma mais eficientemente transferir para a planta compostos nitrogenados produzidos e ainda não sofrerem limitações de substâncias ricas em carbono (OLIVARES et al., 1997).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na Embrapa Agrobiologia em Seropédica – RJ, em duas etapas. Na etapa primeira foi feito o isolamento, a caracterização fenotípica e a caracterização fisiológica de bactérias dizotróficas provenientes de plantas de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria decumbens*, sendo utilizadas as cultivares, Marandu e Xaraés de *B. brizantha* e a cultivar IPEAN de *B. decumbens*.

Na segunda etapa foi realizado um experimento de inoculação em condições gnotobiotica com sementes da Wolf Seeds com 60 % de pureza e inoculação das bactérias oriundas da primeira etapa.

3.1. Local de Procedência das Cultivares de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria decumbens*

As cultivares de *B. brizantha* (marandu e xaraés) e *B. decumbens* (ipean) utilizadas para o experimento foram provenientes do Campo Agrostológico do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em Seropédica, uma área de 0,5 ha, o qual possui mais de 60 espécies de interesse forrageiro (gramíneas e leguminosas), servindo também como banco de germoplasma para estudos, aulas e pesquisas.

As cultivares para o experimento foram coletadas em touceiras (duas touceiras por cultivar) no dia 02/12/2014 contendo uma pequena quantidade solo aderido as raízes. As plantas coletadas tinham aproximadamente um metro de altura, não apresentavam panícula, injúrias nem sintomas de doenças, visto que por ser um Campo Agrostológico estavam com suas exigências nutricionais e hídricas adequadas. Após a coleta as plantas foram acondicionadas em sacos plásticos transparentes e imediatamente levadas para o Laboratório de Gramíneas da Embrapa onde se procedeu o preparo das amostras.

3.2. Preparo das Amostras e das Diluições

As amostras de plantas das cultivares de *B. brizantha* e *B. decumbens* foram lavadas em água corrente para limpeza da parte aérea e das raízes, tomando o cuidado de lavar para retirar o solo aderido, porém sem danificar as raízes. Após lavar as amostras de plantas foi feita a separação da parte aérea e das raízes, sendo cortada as amostras cerca de meio centímetro acima das raízes, no início do colmo.

As amostras foram fragmentadas em pedaços menores com auxílio de uma tesoura e colocados em bandejas de plásticos, e em seguida foram pesados 10 g de cada cultivar, tanto das raízes como da parte aérea.

Após a fragmentação, as amostras foram colocadas em liquidificador de uso doméstico com 90 ml de solução salina e trituradas por 2 minutos. Em seguida a trituração no liquidificador o conteúdo foi adicionado em frascos de vidros com tampa, com capacidade para 250 ml, e foram levados para o agitador horizontal onde permaneceram por 30 minutos em agitação.

Ao final de 30 minutos, as amostras correspondentes à suspensão em solução salina foram diluídas em série, transferindo 1 ml da suspensão para 6 tubos de ensaio com solução salina, correspondendo as diluições seriadas de 10^{-1} até 10^{-6} para amostras da parte aérea, e em 7 tubos de ensaios com solução salina, correspondendo as diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} para amostras de raízes, onde 1 ml da suspensão foi adicionada ao primeiro tubo de ensaio e o mesmo foi homogeneizado em agitador e depois foi tirado 1 ml deste tubo e sendo feito da mesma forma até completar as diluições seriadas (DÖBEREINER et al, 1995).

3.3. Meios de Cultura e Condições de Cultivos Utilizados

Após o preparo das diluições seriadas, uma amostra de 0,1 ml de cada diluição foi utilizada para inocular, em triplicata, frascos contendo 5 ml dos respectivos meios semissólidos semi-específicos NFB (malato), JNFB (malato) e LGI (sacarose), tanto para a parte aérea quanto para raízes. (DÖBEREINER et al, 1995). Nestes meios de cultura semissólidos, as bactérias formaram película na superfície, características comuns entre bactéria diazotróficas (BD) isoladas de plantas não leguminosas.

Os frascos inoculados foram incubados a 30 °C por sete dias, para o desenvolvimento de película característica na região superficial do meio. Após o desenvolvimento da película, era retirada uma amostra da mesma e reinoculada para confirmação da capacidade de formar película e purificação. Após este processo as culturas foram inoculadas em placas de meio sólido (NFB 3X, JNFB e LGI) e meio Batata para confirmação da pureza. (BALDANI & DÖBEREINER, 1980; DÖBEREINER et al, 1995).

A tabela de McCrady (DÖBEREINER et al., 1995) foi utilizada para determinar o número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por grama de tecido fresco. Os isolados que apresentaram película característica de organismos diazotróficos foram utilizadas no isolamento e purificação conforme descrito por Döbereiner et al. (1995).

3.4. Caracterização dos Isolados

3.4.1. Caracterização fenotípica

Os isolados, obtidos das diluições mais elevadas (10^{-3} a 10^{-6}), foram caracterizados morfológicamente nos meios de cultivo sólidos dos quais foram isolados (NFB, JNFB e LGI) e em meio rico (Batata). As características culturais da colônia avaliadas foram: elevação, forma, bordo, superfície e detalhe óptico.

3.4.2. Caracterização fisiológica

a) Atividade da nitrogenase (ARA)

A atividade da nitrogenase dos isolados foi avaliada pelo método de Atividade de Redução de Acetileno (ARA) (BODDEY et al., 1990), sendo avaliados os 15 isolados provenientes de *B. brizantha* e *B. decumbens*, e utilizando as bactérias das espécies *Azospirillum brasilense* (SP 245), *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE 94) e *A. amazonense* (CBAMC) como controle positivo, totalizando 18 isolados para análise.

Uma alíquota de 20 µL da cultura bacteriana foi transferida para frascos de penicilina de 20 mL contendo 6 mL dos meios semissólidos e semi-seletivos sem indicador JNFB, LGI e NFB, para *Herbaspirillum* sp, e *Azospirillum* sp, respectivamente. Estes frascos foram incubados por 48 horas a 30 °C até que a formação de película característica de bactérias diazotróficas fosse observada.

Os frascos foram fechados com lacres de borracha e alumínio e injetados 10% de sua fase gasosa com gás acetileno, seguido de incubação por 1 hora e 30 minutos a 30 °C. Posteriormente 1 mL da fase gasosa foi retirada do frasco, sendo descartado 0,5 mL e injetado os outros 0,5 mL no cromatógrafo de gás com ionização de chama, Perkin Elmer modelo F11, utilizando uma coluna Poropak N de 50 cm a 40 °C para a leitura do etileno formado (VIDEIRA, 2008).

b) Solubilização de fosfato

A capacidade de solubilização de fosfato insolúvel foi testada em meio de cultura NBRIP sólido com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. As bactérias foram previamente cultivadas em meio DYGS por 24 horas, após esse período, foi medida a densidade óptica (DO) em um espectrofotômetro, e normalizada a D.O. (600 nm) = 0,9 - 1, e uma alíquota de 20 μL foi inoculada na superfície da placa de Petri contendo o meio NBRIP sólido, em forma de “gotas ou pontuações”.

Foram estabelecidas 3 alíquotas por placa, cada placa sendo inoculada com o mesmo isolado, perfazendo assim as três repetições por isolado. A avaliação da solubilização de fosfato foi feita medindo o diâmetro da colônia e do halo de solubilização, assim estabelecendo a eficiência pelo índice de solubilização (IS) sendo diâmetro do halo / diâmetro da colônia, como descrito em Nautiyal (1999) e também classificados pelo IS conforme Chagas Junior et al. (2010).

O diâmetro do halo de solubilização, percebido como uma área translúcida em torno da colônia, foi medido após 3, 6, 9, 12, 15 e 18 dias de incubação.

c) Produção de ácido-3-indolacético (AIA)

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 foi cultivada previamente por 24 horas em meio DYGS e posteriormente inoculada em 20 mL de meio DYGS suplementado com L-triptofano na concentração final de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os tubos permaneceram no escuro sob agitação de 150 rpm a temperatura de 30 °C por 24 horas.

Alíquotas de 1 mL foram retiradas após 24 horas de cultivo e centrifugadas a 10.000 rpm 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_3 em 49 ml de ácido perclórico 35 %) previamente preparado. As amostras permaneceram no escuro por 30 minutos sob temperatura ambiente e a leitura de absorbância foi feita em um leitor de microplaca (Labsystem iems reader MF, Labsystem) com comprimento de onda de 535 nm.

A quantificação de compostos indólicos foi feita utilizando-se uma curva de calibração preparada com diluições seriadas de padrões de AIA sintético (0 - 250 mg mL^{-1}).

Para padronização das amostras os resultados foram expressos na unidade mg mL^{-1} de AIA por unidade de densidade óptica (DO). Todas as amostras de AIA foram analisadas em triplicata nas placas de 96 poços e o resultado decorrente de uma média das três leituras.

3.5. Experimento de Interação Planta – Bactéria

Neste experimento foram utilizados os 15 isolados provenientes do isolamento e purificação das cultivares de *B. brizantha* e *B. decumbens*.

O experimento foi montado no dia 13/10/2015 na casa de vegetação número três da Embrapa Agrobiologia, em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições, sendo analisada a interação da *B. brizantha* cv Marandu com os 15 isolados diazotróficos (N1; L1; L2; L3; L4; J1; J2; J3; J4; J5; J6; J7; J8; J9; J10), além das três bactérias padrões (ZAE94 de *H. seropedicae*; SP245 de *A. brasilense* e CBAMC de *A. amazonense*), e a testemunha não inoculada sem nitrogênio, totalizando assim os 19 tratamentos. As estirpes foram reativadas em Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio DYGS, a 30 °C sob agitação a 150 rpm por 24 horas.

O experimento foi conduzido em tubos de ensaio com capacidade para 120 mL, contendo 60 mL de solução de Hoagland's para tubos com ágar (6 g.L^{-1}), sem nitrogênio. Os

tubos, contendo a solução nutritiva agarizada, foram tampados com uma rolha de algodão e esterilizados em autoclave. Após a esterilização e antes da solidificação do Agar, cada tratamento foi inoculado com 2 mL de cultura bacteriana previamente crescida. O tratamento controle não foi inoculado, sendo somente adicionado meio de cultura estéril.

As sementes de *B. brizantha* cv. Marandu da Wolf Seeds®, com 60% de pureza, foram desinfestada de acordo com metodologia adaptada de Döbereiner et al, (1995). Após a desinfestação as sementes foram colocadas em placas de Petri contendo meio Agar – água (1%), sendo o processo realizado em câmara de fluxo laminar, e pré-germinadas em estufa durante 48 horas. Posteriormente as plântulas foram colocadas nos respectivos tubos de ensaio, sendo uma semente por tubo.

Durante o experimento foram ainda adicionados 2,5 ml de solução de Hoagland's para tubos aos 10 e 20 dias após implantação do experimento. Na ocasião da primeira adição de Hoagland's para tubos, com 10 dias, a maioria das parcelas já estavam com as folhas encostando na rolha de algodão, onde a mesma foi trocada, em capela de fluxo laminar, sendo utilizado algodão estéril, de forma que o mesmo não impedisse o crescimento das folhas, porém evitando contaminação do meio.

A coleta do experimento se deu após 30 dias da inoculação, no dia 12/11/15, onde os parâmetros massa fresca da raiz e da parte aérea das plantas de *B. brizantha* cv Marandu foram mensurados utilizando uma balança de precisão de quatro casas decimais. Posteriormente a massa fresca da parte aérea foi para estufa de ventilação forçada com 65 °C por 72 horas, e as raízes foram acondicionadas em tubos falcon com álcool a 50 % para serem analisadas no equipamento Winrhizo do Laboratório das Interações Solo – Planta, onde foram analisados a área radicular, volume e comprimento de raízes. Após as análise no Winrhizo, as raízes foram para estufa de ventilação forçada com 65 °C por 72 horas.

Foi testada a normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Bartlet) dos dados, posteriormente sendo feitas análises de variância usando o programa ASSISTAT (SILVA, 2006) e comparação de médias pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento e Caracterização Fenotípica

Observou-se a variação do Número Mais Provável (NMP) (Tabela 1) entre as cultivares e o meios semissólidos, isto se deve principalmente ao fato de que as plantas que foram coletadas para a contagem e isolamento estavam em estágios diferentes, visto que algumas vinham de corte mais recente do que outras, fora as próprias características de cada cultivar.

Tabela 1. Contagem do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas isoladas de raízes e parte aérea de três cultivares de *Brachiaria* em três meios de Cultura.

Cultivares	Meios Semissólidos		
	NFB	LGI	JNFB
<i>B. brizantha</i> cv Ipean			
P. Aérea	45 x 10 ³	45 x 10 ³	4,5 x 10 ³
Raiz	7,5 x 10 ³	1,1 x 10 ³	4,5 x 10 ³
<i>B. brizantha</i> cv Marandu			
P. Aérea	4,0 x 10 ³	4,5 x 10 ³	9,5 x 10 ³
Raiz	4,5 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵	0,95 x 10 ⁵
<i>B. decumbens</i> cv Xaraés			
P. Aérea	0,9 x 10 ³	4,5 x 10 ³	4,5 x 10 ³
Raiz	2,5 x 10 ³	150 x 10 ³	2,5 x 10 ³

Num primeiro momento foram isoladas 21 colônias proveniente do meio NFB, sete do meio LGI e 18 do meio JNFB. As 46 colônias isoladas e seus respectivos meios seletivos podem ser observados na Tabela 2.

Em seguida a contagem, e com a obtenção de 46 isolados, deu-se prosseguimento a purificação e os 46 isolados foram submetidos novamente ao processo de purificação. Durante este processo o número de isolados diminuiu. Após o processo de purificação dos 46 isolados, foram obtidos 15 isolados puros, conforme descritos na Tabela 3.

Tabela 2. Colônias de diazotrofos isoladas em seus respectivos meios semi-seletivos.

Meio	Cultivar					
	Ipean		Xaraés		Marandu	
	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz
NFB	P.10 ⁻² . IB	R.10 ⁻² . IB. 2	P.10 ⁻² . XC.1	R.10 ⁻² . XC	P.10 ⁻² . MA	R.10 ⁻² .MC.1
		R.10 ⁻² . IB. 1.1	P.10 ⁻² . XC.2.1		P.10 ⁻² . MB.1	R.10 ⁻² .MC.2
		R.10 ⁻² . IB. 1.2	P.10 ⁻² . XC.3		P.10 ⁻² . MB.2	R.10 ⁻³ .MB.1
		R.10 ⁻³ . I				R.10 ⁻³ .MB.2
						R.10 ⁻⁵ .M.1
						R.10 ⁻⁵ .M.2
					R.10 ⁻⁵ .M.3	

Continua...

Continuação da **Tabela 2.**

Meio	Cultivar					
	Ipean		Xaraés		Marandu	
	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz
NFB						R.10 ⁻⁶ .M.1
						R.10 ⁻⁶ .M.2
LGI		R.10 ⁻³ .IA.1		R.10 ⁻⁵ .X	P.10 ⁻² .MB	R.10 ⁻³ .MC.3.2
		R.10 ⁻³ .IA.1.1				
		R.10 ⁻³ .IA.2				
		R.10 ⁻³ .IB				
JNFB			P10 ⁻² .XA.2.1.1		P.10 ⁻² .MC.1	R.10 ⁻² .MA.1.1
			P10 ⁻² .XA.2.1.2		P.10 ⁻² .MC.2.1	R.10 ⁻³ .MA.2
			P10 ⁻² .XA.2.2.1		P.10 ⁻² .MC.2.2	R.10 ⁻³ .MB.2
			P10 ⁻² .XA.2.2.2		P.10 ⁻³ .MC.1.2	R.10 ⁻³ .MB.3.2
					P.10 ⁻³ .MC.1.3	R.10 ⁻³ .MC.2.1
					P.10 ⁻³ .MC.3.1	R.10 ⁻³ .MC.2.2
					P.10 ⁻⁵ .M	R.10 ⁻⁴ .MB.2

Tabela 3. Identificação dos 15 isolados de diazotrofos obtidos de raízes e parte aérea dos diferentes cultivares de *Brachiaria*, nos meios de cultura NFB, LGI e JNFB.

Meio	Cultivar					
	Ipean		Xaraés		Marandu	
	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz
NFB						R. 10 ⁻⁶ .M.2
LGI		R. 10 ⁻³ .IA.1			P. 10 ⁻² .MB	
		R. 10 ⁻³ .IB				
		R. 10 ⁻³ .IB.1				
JNFB			P. 10 ⁻² .XA.2.1.1		P.10 ⁻² .MC.1	R. 10 ⁻³ .MA.2.A
					P.10 ⁻² .MC.1.A	R. 10 ⁻³ .MA.2.B
			P. 10 ⁻² .XA.2.1.1			R. 10 ⁻⁴ .MB.2.B
			P. 10 ⁻² .XA.2.1.1.a			R. 10 ⁻⁴ .MB.2*A
					R. 10 ⁻³ .MC.2.2	

Em seguida procedeu-se a caracterização fenotípica dos isolados puros, onde as características avaliadas das colônias foram: elevação, forma, bordo, superfície e detalhe óptico, como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4. Caracterização fenotípica das colônias de diazotrofos formadas pelos isolados obtidos em diferentes partes da planta dos diferentes genótipos de *Brachiaria* utilizados.

	Isolados	Forma	Elevação	Bordo	Superfície	Detalhes Ópticos
N1	N.R. 10 ⁻⁶ .M.2	circular	lente	inteira	lisa	opaca
L1	L.R. 10 ⁻³ .IA.1	circular	convexa	inteira	lisa	opaca
L2	L.R. 10 ⁻³ .IB	circular	convexa	inteira	lisa	opaca
L3	L.R. 10 ⁻³ .IB.1	circular	convexa	inteira	lisa	opaca
L4	L.P. 10 ⁻² .MB	irregular	lente	ondulada	rugosa	opaca
J1	J.P. 10 ⁻² .XA.2.1.1.A	circular	plana	ondulada	lisa	translúcida
J2	J.P. 10 ⁻² .XA.2.1.1.B	circular	plana	inteira	lisa	translúcida
J3	J.P. 10 ⁻² .XA.2.1.1.C	circular	lente	ondulada	lisa	translúcida
J4	J.R. 10 ⁻³ .MA.2.A	circular	convexa	inteira	lisa	opaca
J5	J.R. 10 ⁻³ .MA.2.B	circular	convexa	inteira	lisa	opaca
J6	J.R. 10 ⁻⁴ .MB.2*A	circular	convexa	inteira	lisa	opaca
J7	J.R. 10 ⁻⁴ .MB.2.B	circular	lente	denteada	lisa	opaca
J8	J.P.10 ⁻² .MC.1	circular	convexa	inteira	lisa	opaca
J9	J.P.10 ⁻² .MC.1.A	circular	lente	inteira	lisa	opaca
J10	J.R. 10 ⁻³ .MC.2.2	circular	lente	denteada	lisa	opaca

Para facilitar a discussão dos dados, os isolados foram nomeados por tratamento, onde os isolados acrescidos dos padrões e da testemunha (N.R. 10-6.M.2, L.R. 10-3.IA.1, L.R. 10-3.IB, L.R. 10-3.IB.1, L.P. 10-2.MB, J.P. 10-2.XA.2.1.1.A, J.P. 10-2.XA.2.1.1.B, J.P. 10-2.XA.2.1.1.C, J.R. 10-3.MA.2.A, J.R. 10-3.MA.2.B, J.R. 10-4.MB.2*A, J.R. 10-4.MB.2.B, J.P.10-2.MC.1, J.P.10-2.MC.1.A, J.R. 10-3.MC.2.2, SP245, ZAE94, CBAMC e testemunha) receberam a letra inicial dos meios de culturas semissólidos utilizados e a numeração respectivamente (N1, L1, L2, L3, L4, J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8, J10, SP245, Z94, CBAMC, Testemunha).

4.2. Caracterização Fisiológica

4.2.1 Atividade da nitrogenase (ARA)

Na avaliação da atividade da nitrogenase (Figura 1), todos isolados avaliados produziram etileno, mesmo em pequenas quantidades, tendo destaque os isolados L2, L4, J3, J6, J7 e J8, que apresentaram maior concentração de etileno por frasco.

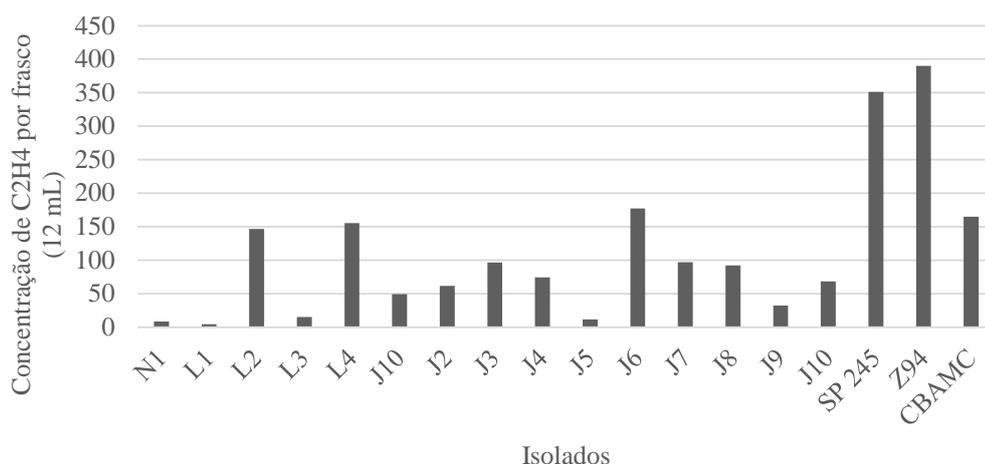


Figura 1. Atividade da nitrogenase, pelo método de Redução de Acetileno (ARA), dos 15 isolados obtidos de *Brachiaria*.

Estes resultados confirmam que os isolados testados são possíveis bactérias fixadoras de nitrogênio, pois, de acordo com Boddey et al. (2007), as bactérias capazes de reduzir acetileno a etileno são capazes de reduzir N₂ a NH₃ (amônia).

4.2.2 Solubilização de fosfato

O cálculo do Índice de Solubilização (IS) (Figura 2), feito da seguinte forma: diâmetro do halo dividido pelo diâmetro da colônia mostrou que os isolados dos tratamentos J3, J4, J5, J6, J7, J8 e J9 foram considerados de média solubilização ($2 \leq IS \leq 4$), já os isolados N1, L1 e J2 de baixa solubilização ($IS \leq 2$). Vale salientar que os tratamentos padrões SP 245 e Z94 também foram classificados como de média solubilização. Dentre os 15 isolados apenas 5 isolados não solubilizaram fosfato, sendo eles os tratamentos L2, L3, L4, J1 e J10.

O IS está relacionado à capacidade da bactéria solubilizar o fósforo e poder disponibilizar para planta. Segundo Chagas Junior et al. (2010), muitas bactérias produzem ácidos orgânicos, e estes quando secretados possuem a capacidade de dissolver o fosfato mineral, ou quelatar íons de Fe e Al associados com fosfatos, contribuindo para a liberação do P.

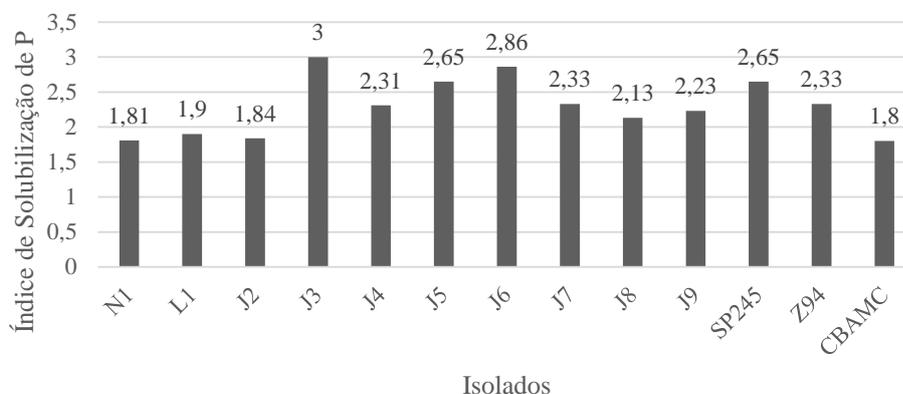


Figura 2. Índice de Solubilização de Fosfato dos diferentes isolados de diferentes cultivares de *Brachiaria*.



Figura 3. Número de isolados classificados quanto ao Índice de Solubilização.

4.2.3. Produção de ácido-3-indolacético (AIA)

Os 15 isolados foram avaliados quanto a produção de ácido-3-indolacético, juntamente com os 3 padrões (Figura 4) e durante o teste se destacaram os isolados N1, J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8 e J9. Estes isolados conseguiram uma produção de AIA semelhante ou maior que os padrões testados. Os tratamentos L1, L4 e J10 tiveram uma baixa produção de AIA, já os isolados L2 e L3 não conseguiram produzir AIA.

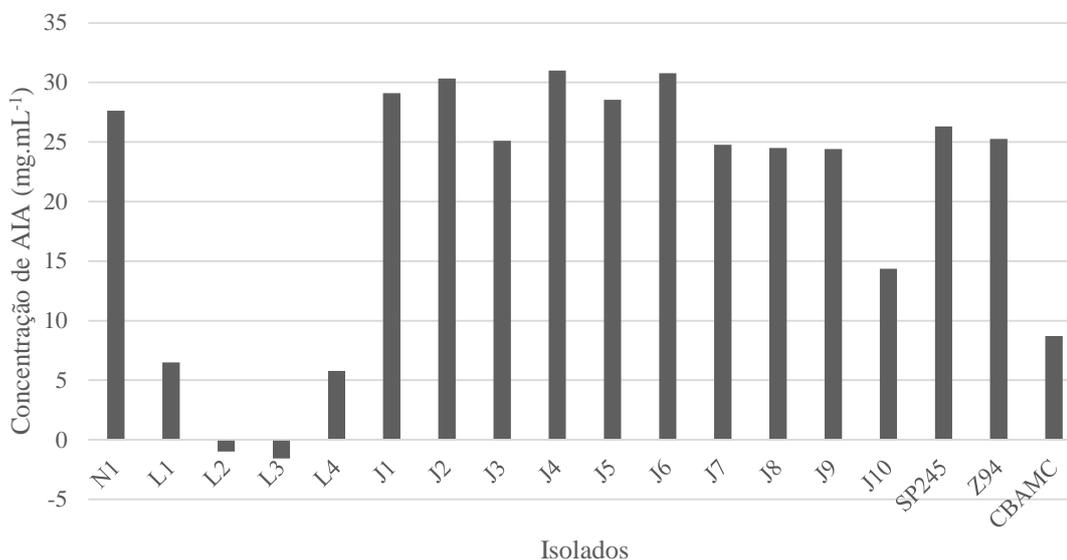


Figura 4. Produção de ácido-3-indolacético (AIA) pelos 15 isolados de duas cultivares de *B. Brizantha* e uma cultivar de *B. decumbens*.

Os microorganismos, com a produção do fitohormônio (AIA), podem estimular o crescimento vegetal e também a produção de metabólitos, fazendo com que a sua utilização reflita no crescimento das plantas com as quais mantêm associação. Segundo Loper e Schroth (1986), cerca de 80% das bactérias isoladas da rizosfera são capazes de produzir AIA.

4.3. Experimento de Interação Planta – Bactéria

4.3.1. Massa fresca e seca da parte aérea

Após a mensuração da massa fresca da parte aérea foi feita a análise estatística da ANOVA (Anexo G) e as médias foram comparadas pelo Teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade (Tabela 5).

Tabela 5. Médias dos tratamentos na avaliação de massa fresca e seca da parte aérea no crescimento de *B. brizantha* inoculada com 15 isolados provenientes de duas cultivares de *B. brizantha* e uma cultivar de *B. decumbens*, mais três estirpes conhecidas e testemunha sem inoculação e sem N.

Médias dos tratamentos (g tubo ⁻¹)		
Tratamentos ¹	Massa Fresca Parte Aérea ²	Massa Seca Parte Aérea ²
N1	0,141 a	0,027 c
L1	0,170 b	0,030 b
L2	0,203 a	0,038 a
L3	0,169 b	0,032 b
L4	0,196 a	0,039 a
J1	0,145 b	0,028 c
J2	0,147 b	0,030 b
J3	0,156 b	0,032 b
J4	0,155 b	0,028 c
J5	0,143 b	0,026 c
J6	0,193 a	0,037 a
J7	0,131 c	0,027 c
J8	0,112 c	0,021 d
J9	0,096 d	0,019 d
J10	0,121 c	0,023 c
SP245	0,118 c	0,021 d
Z94	0,141 b	0,025 c
CBAMC	0,151 b	0,024 c
Test.	0,079 d	0,015 d
	F – Anova = 6,5944 **	F – Anova = 5,5573 **
	CV % = 19,46	CV% = 22,22

¹** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; * significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F; ns não significativo.

² As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Quando avaliada a massa fresca da parte aérea, observa-se que os tratamentos L2, L4 e J6 diferiram estatisticamente dos demais, onde os mesmos propiciaram aumento de massa fresca da parte aérea quando comparados com os demais isolados, com os padrões e com a testemunha (Test.).

Ao analisar a massa seca da parte aérea observou-se comportamento semelhante ao ocorrido na massa fresca da parte aérea, em que novamente os tratamentos L2, L4 e J6 se diferiram dos demais, evidenciando que os respectivos isolados se comportaram positivamente na interação planta – bactéria, quando comparada a parte aérea do vegetal, onde podemos inferir que os isolados citados conseguiram propiciar maior aporte de massa quando

comparados a testemunha não inoculada, aos demais isolados, e também aos padrões comerciais.

Os dados obtidos quando analisada a parte aérea de *B. brizantha* cv. Marandu neste experimento foram semelhantes aos obtidos por Oliveira et al. (2007), que trabalhando com esta gramínea sem aplicação de N e com a inoculação de bactérias diazotróficas, quando comparado com a testemunha (sem N e sem inoculação), teve maior produção de forragem, evidenciando assim segundo o autor, uma alternativa para o aumento da produção de forragem.

4.3.2. Massa fresca e seca radicular

Os resultados de massa fresca radicular (Tabela 6), mostraram que os tratamentos L2 e L3 diferiram estatisticamente dos demais, mostrando que a interação destes isolados com a *B. brizantha* resultou em uma quantidade maior de acúmulo de massa às raízes.

Já quando avaliamos a massa seca radicular temos um resultados diferente do apresentado para massa fresca radicular, onde os tratamentos N1, L1, L2, L3, L4, J1, J2, J3 e J6, diferiram estatisticamente dos demais, mostrando que estes isolados tiveram melhor interação com a planta.

Os dados obtidos para os parâmetros de massa seca e fresca radicular mostram que os tratamentos inoculados com as bactérias diazotróficas tiveram melhor rendimento quando comparada a testemunha sem inoculação e sem N, e também que os isolados provenientes de cultivares de *Brachiaria* interagiram com a planta positivamente, melhor do que os isolados padrões isolados de outras plantas.

Os resultados obtidos neste experimento são semelhantes aos obtidos por Brasil et al. (2005) que ao avaliar plantas de capim Braquiária inoculadas com bactérias diazotróficas, as mesmas apresentaram produção de massa seca, principalmente do sistema radicular, superior aos tratamentos sem inoculação.

Tabela 6. Médias dos tratamentos na avaliação de massa fresca e seca radicular no crescimento de *B. brizantha* inoculada com 15 isolados provenientes de duas cultivares de *B. brizantha* e uma cultivar de *B. decumbens*, mais três estirpes conhecidas e testemunha sem inoculação e sem N.

Médias dos tratamentos (g tubo ⁻¹)		
Tratamentos ¹	Massa Fresca da Raíz ²	Massa Seca da Raíz ²
N1	0,153 c	0,011 a
L1	0,218 b	0,013 a
L2	0,285 a	0,014 a
L3	0,253 a	0,013 a
L4	0,321 b	0,013 a
J1	0,146 c	0,011 a
J2	0,119 c	0,012 a
J3	0,168 c	0,013 a
J4	0,148 c	0,009 b
J5	0,158 c	0,010 b
J6	0,225 b	0,017 a
J7	0,129 c	0,010 b
J8	0,108 c	0,007 b
J9	0,118 c	0,006 b
J10	0,131 c	0,008 b

Continua...

Continuação da Tabela 6.

Médias dos tratamentos (g tubo ⁻¹)		
Tratamentos ¹	Massa Fresca da Raíz ²	Massa Seca da Raíz ²
SP245	0,157 c	0,007 b
Z94	0,155 c	0,008 b
CBAMC	0,212 b	0,009 b
Test.	0,122 c	0,005 b
F – Anova = 6,7933 **		F – Anova = 4,6335 **
CV % = 25,45		CV% = 29,76

¹ ** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; * significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F; ns não significativo.

² As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade

Guimarães et al. (2011) também relatam benefícios similares em pastagens de *Brachiaria brizantha*, onde plantas inoculadas apresentaram maior produção de massa seca radicular quando comparadas a plantas não inoculadas. Este aumento pode estar relacionado à produção de fitormônios pelas bactérias diazotróficas, o que auxilia o crescimento radicular, consequentemente beneficiando o aumento na absorção de água e sais minerais (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

4.3.3. Comprimento, área e volume radicular

Quando analisadas as médias de comprimento de raízes, observou-se que os tratamentos L4 e J6 propiciaram maior comprimento de raízes quando comparado aos demais isolados e a testemunha, sendo que maior comprimento radicular propicia a planta maior alcance de suas raízes, aumentando sua área de absorção de água e nutrientes no solo.

Ao avaliar a área radicular, os tratamento L4 e J6 diferiram estatisticamente dos demais tratamentos. Os resultados obtidos para este parâmetro indicam que os isolados L4 e J6 proporcionaram maior alcance da área pelas raízes de *B. brizantha* cv Marandu, demonstrando que os isolados interagiram de forma positiva fazendo com que as raízes da planta abrangessem uma área maior, o que facilitaria para absorção de água e nutrientes presentes no solo.

Tabela 7. Médias dos tratamentos na avaliação de comprimento, área e volume radicular no crescimento de *B. brizantha* inoculada com 15 isolados provenientes de duas cultivares de *B. brizantha* e uma cultivar de *B. decumbens*, mais três estirpes conhecidas e testemunha sem inoculação e sem N.

Médias dos tratamentos das raízes			
Tratamentos ¹	Comprimento ² (mm)	Área ² (mm ²)	Volume ² (mm ³)
N1	1833,163 c	1891,205 c	155,536 c
L1	2373,474 b	2297,289 b	177,148 b
L2	2300,068 b	2278,329 b	179,965 b
L3	1814,706 c	2050,186 b	184,766 b
L4	3059,636 a	2796,343 a	203,677 b
J1	2032,517 c	2195,335 b	189,914 b
J2	2382,914 b	2444,975 b	203,042 b
J3	2354,542 b	2423,090 b	198,730 b
J4	2150,510 b	2156,044 b	177,135 b

J5	2338,384 b	2369,138 b	191,687 b
Continua...			
Continuação da Tabela 7.			
Médias dos tratamentos das raízes			
Tratamentos¹	Comprimento² (mm)	Área² (mm²)	Volume² (mm³)
J6	3186,111 a	3198,012 a	257,250 a
J7	2030,451 c	2066,072 b	168,985 b
J8	1635,332 c	1719,890 c	146,115 c
J9	1171,580 c	1361,725 c	126,215 c
J10	1924,422 c	2092,736 b	183,586 b
SP245	1272,609 c	1559,300 c	153,178 c
Z94	2182,924 b	2199,188 b	184,130 b
CBAMC	2073,954 c	2217,730 b	189,563 b
Test.	1680,531 c	1632,936 c	127,140 c
F – Anova= 3,5267 **		F – Anova= 3,8681 **	F – Anova= 3,9197 **
CV % = 28,60		CV % = 22,53	CV % = 18,86

¹ ** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F; * significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F; ns não significativo.

² As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados de área radicular são semelhantes aos obtidos com os dados de comprimento radicular, onde também os tratamentos T5 e T11 diferiram estatisticamente dos demais, evidenciando que uma maior área radicular está relacionada com o comprimento das raízes. Maior comprimento de raízes também aumentaria a área de atuação da mesma no perfil do solo, tornando a planta mais eficiente na absorção de água e nutrientes. Um sistema radicular bem desenvolvido garante boa formação e sustentação da parte aérea.

Quando analisados os dados de volume radicular, o tratamento T11 se destacou significativamente em relação aos demais isolados, inclusive aos padrões e também em relação a testemunha. Esses dados mostram a interação benéfica da planta com o isolado T11, onde um maior volume radicular irá proporcionar maior absorção de água e nutrientes, e facilitar na rebrota e crescimento da parte aérea, visto que plantas com volume radicular extenso se alimentam melhor e plantas com um grande volume de raízes geralmente irão possuir a habilidade de produzir em solos mais pobres (RUSSEL, 1961).

5. CONCLUSÕES

Existem bactérias fixadoras de nitrogênio, solubilizadoras de fosfato e que produzem ácido-3-indolacético provenientes de *Brachiaria brizhanta* e *Brachiaria decumbens*.

As bactérias isoladas de duas cultivares de *B. brizhanta* (Marandu e Xaráes) e de uma cultivar de *B. decumbens* (Ipean) se mostraram mais eficientes no crescimento de *B. brizhanta* cv. Marandu do que as bactérias padrões provenientes de outras espécies de plantas.

Dentre os 15 isolados de duas cultivares de *B. brizhanta* (Marandu e Xaráes) e de uma cultivar de *B. decumbens* (Ipean), os isolados J6, L2 e L4 diferiram estatisticamente dos demais isolados, sendo considerados os três mais promissores.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Deve-se avaliar os isolados que se destacaram também com outras cultivares de *B. brizhanta* e de *B. decumbens* para verificar a interação destas plantas com os isolados.

Os isolados devem ser testados em solo para avaliar a capacidade de interação com a planta e com o solo.

Novos estudos devem ser feitos com os isolados L2, L4 e J6 e plantas do gênero *Brachiaria* avaliando a produção, quando comparados a doses de nitrogênio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVIM, M. J.; BOTREL, M. A.; XAVIER, D. F. As principais espécies de *Brachiaria* utilizadas no país. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 4p. 2002. (Embrapa Gado de Leite. Comunicado Técnico, 22).
- BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum spp.* no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 238p., 1996.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the brazilian experience. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.77, p.549-579, 2005.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, R.S.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non legumes plants. Soil Biology and Biochemistry, v .29, p.922-928, 1997.
- BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum spp.* Soil Biology & Biochemistry, Oxford, v. 12, n. 4, p. 433-439, 1980.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances. Canadian Journal of Microbiology, v.50 p.521-577, 2004.
- BODDEY, L. H.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. A Avaliação da Fixação Biológica de N Associada a Leguminosas e Não-Leguminosas Utilizando a Técnica da Redução do Acetileno: História, Teoria e Prática. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 43 p.
- BODDEY, R. M.; BODDEY, L.H.; URQUIAGA, S. A técnica de redução de acetileno na medição da fixação biológica de nitrogênio. Itaguaí: Editora Universidade Rural, 1990. 37 p. (EMBRAPA-CNPBS. Documentos, 6).
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. Plant and Soil, The Hague, v. 252, p.139-149, 2003.
- BOGDAN, A.V. Tropical pasture and fodder plants. Longman, New York, 1977. 475p.
- BOTREL, M.A.; ALVIM, M. J.; XAVIER, D. F. Avaliação de gramíneas forrageiras na Região Sul de Minas Gerais. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 34, n. 4. p 683-689, abril. 1999.
- BRASIL, M. da S.; BALDANI, V. L. D.; MANHÃES SOUTO, S. Efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas forrageiras do Pantanal. Pasturas Tropicales, v. 27, n. 3, pp. 22-33, 2005.

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

CECATO, U.; GOMES, L.H.; ASSIS, M.A.;SANTOS, G.T.; DAMACENO, J.C.; JOBIM, C.C.; RIBAS, N.P.; MIRA, R.T.; CANO, C.C.P. Avaliação de cultivares do gênero *Cynodon*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33. 1996, Fortaleza. Anais... Fortaleza: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1996. p.114-116.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A. de; OLIVEIRA, A. N. de; WILLERDING, A. L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. Acta Scientiarum. Agron. [online]. 2010, vol.32, n.2, pp. 359-366. ISSN 1807-8621. 2010.

CORRÊA, L. A. SANTOS, P. M. Manejo e utilização de plantas forrageiras dos gêneros *Panicum*, *Brachiaria* e *Cynodon*. Embrapa Pecuária Sudeste. São Carlos. Documentos 34. 36p. 2003.

COSTA, K. A. P.; OLIVEIRA, I. P.; FAQUIN, V. Adubação nitrogenada para pastagens do gênero *Brachiaria* em solos do Cerrado. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 60 p. 2006.

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

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.

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

DOBELLAERE, S.; CROONENBORGH, A.; TRYS, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; ANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. Biology and Fertility of Soils, Berlin, v.36, p. 284-297, 2002.

EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J eds. Biological Nitrogen Fixation. New York: Chapman and Hall, 1992, p.1-42.

FERREIRA, J.S.; SABINO, D.C.C.; GUIMARÃES, S.L.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Seleção de veículos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. Revista Agronomia, v.37, n.02, p.6-12, 2003.

GUIMARÃES, S. L. Aplicação de inoculante turfoso com bactérias diazotróficas e molibdênio em cultivares de arroz adubadas com nitrogênio mineral. 2006. 52p Tese

(Doutorado em Agronomia - Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

GUIMARÃES, S. L.; BONFIM-SILVA, E. M.; POLIZEL, A. C.; CAMPOS, D. T. da S. Produção de Capim-Marandu inoculado com *Azospirillum spp.* Enciclopédia Biosfera, v. 7, n. 13, pp.816-826, 2011.

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

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

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo da Agropecuária 2006. IBGE, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense sp. nov.*, a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.51, p.157-168, 2001.

LOPER, J. E.; SCHROTH, M. N. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. Phytopatology, v. 76, p. 386-389, 1986.

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

MACEDO, M. C. M. Pastagens no ecossistema cerrados: evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42, 2005, GOIÂNIA. ANAIS. Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia, P56-84. 2005.

MACEDO, M. C. M. Degradação de Pastagens: Conceitos e Métodos de Recuperação. In: Anais do Simpósio Sustentabilidade da Pecuária de Leite no Brasil. Editado por VILELA, D.; MARTINS, C. E.; BRESSAN, M.; CARVALHO, L. A. Embrapa Gado de Leite. p.137-150. 1999.

MACEDO, M.C.M.; ZIMMER, A.H. Sistemas pasto-lavoura e seus efeitos na produtividade agropecuária. In: FAVORETTO, V.; RODRIGUES, L.R.A.; REIS, R.A. (Eds.) Simpósio Sobre Ecossistemas das Pastagens, 2, 1993. Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: FUNEP: UNESP, 1993, p.216-245.

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

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

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

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

MENDONÇA, S. A. Avaliação Agronômica e modo de reprodução de Híbridos Intraespecíficos de *Brachiaria decumbens*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu, 2012.

MONTEIRO, M.C.C.; LUCAS, E.D.; SOUTO, S.M. Estudo de seis espécies forrageiras do gênero *Brachiaria*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 9, n. 3, p. 17-20, mar. 1974.

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

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

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

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

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

NUNES, S.G.; BOOK, A. PENTEADO, M.I. de O.; GOMES, D. T. *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. Campo Grande – MS: Embrapa – CNPQC, 1984. 31 p. (EMBRAPA – CNPQC. Documentos, 21).

OCDE-FAO *Perspectivas Agrícolas 2015-2024*. Disponível em <<https://www.fao.org.br/download/PA20142015CB.pdf>> Acessado 08/06/2015 às 14h.

OLIVARES, F.L., JAMES, E.K., BALDANI, J.I., DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe diseasesusceptible and resistant varieties of sugar cane by endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytologist* 135: p 723-737. 1997.

OLIVEIRA, P. P. A.; OLIVEIRA, W. S.; BARIONI, W. J.; Produção de forragem e qualidade de *B. brizantha* cv. Marandu com *Azospirillum brasilense* e fertilizada com nitrogênio. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. 2007 6 p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Circular Técnica 54).

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

POLY, F.; MONROZIER, L.J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, v.152, p.95-103, 2001.

PORTES, TA. A.; CAVALHO, S. I. C.; KLUTHCOUSKI, J. Aspectos fisiológicos das plantas cultivadas e análise de crescimento da braquiária consorciada com cereais. (Physiological aspects of crop plants and growth analysis of *Brachiaria* intercropped with cereals). In: Kluthcouski, J.; Stone, L. F.; Aidar, H. (eds) *Integração lavoura-pecuária*, pp. 305-329. Brasil: Embrapa Arroz e Feijão. 2003.

REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria spp.*, em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, MG, v. 28, n. 1, p.103-113, 2004.

REIS JUNIOR, F. B.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S. Restriction of 16S23S intergenic rDNA for diversity evaluation of *Azospirillum amazonense* isolated from different *Brachiaria spp.* *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, p. 431-438, 2006.

REIS, V. M.; PEDRAZA, R. O.; TEIXEIRA, K. R. S. Diversidade e relação filogenética de espécies do gênero *Azospirillum*. *Embrapa Agrobiologia Documentos 273*, p. 14. Seropédica, RJ, 2010.

RODRIGUES-DA-SILVA, R.; FILGUEIRAS, T. S. Gramíneas (Poaceae) da Área de Relevante Interesse Ecológico (ARIE) "Santuário de Vida Silvestre do Riacho Fundo", Distrito Federal, Brasil. *Acta Bot. Bras.* [online]. 2003, vol.17, n.3, pp. 467-486. ISSN 1677-941X.

RODRIGUES, L. R.; BALDANI, V. L.D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 41, n. 2, p. 275-284. 2006.

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

RUSSEL, E. W. *Soil conditions and plant growth*. 9 ed. London, 1961. 265p.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659p.

SANTOS, C. S. A. Capim Marandu submetido à inoculação com bactérias diazotróficas associativas em Latossolo Vermelho de Cerrado. *Dissertação (Mestrado)*. Universidades Federal do Mato Grosso. Instituto de Ciências Agrárias e Tecnologias, Programa em Engenharias Agrícolas. Rondonópolis. 69p. 2013.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. *Plant and Soil*, v. 172, n. 2, p. 261 – 269, 1995.

SATURNINO, K. C.; MARIANI, T. M.; BARBOSA-FERREIRA, M.; BRUM, K. B.; FERNANDES, C. E. S.; LEMOS, R. A. A. Intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em ovinos confinados. *Pesq. Vet. Bras.* [online]. 2010, vol.30, n.3, pp. 195-202.

SEIFFERT, N.F. Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria*. Campo Grande, MS, Embrapa - CNPQC, 1980. 83p. (EMBRAPA - CNPQC. Circular Técnica, 01).

SENDULSKY, T. Chave para identificação de *Brachiaria*. *J. Agroceres*, 5(56):4-5, 1977.

SERRÃO, E. A. D., SIMÃO NETO, M. Informações sobre duas espécies de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* na Amazônia: *B. decumbens* Stapf e *B. ruziziensis* Germain et Evrard. Belém, Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Norte (IPEAN. Série: Estudos sobre forrageiras na Amazônia, v.2, n.1), 1971. 31p.

SILVA, F. de A. S. e. & AZEVEDO, C. A. V. de. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006.p.393-396.

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

SILVA, M. C. P. da. Seleção de estirpes eficientes para fixação biológica de nitrogênio e promoção de crescimento em plantas da espécie *Brachiaria Brizantha*. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ. Piracicaba. 79p. 2010.

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

SOUZA FILHO, A. P. da S.; DUTRA, S. Resposta da *Brachiaria humidicola* à adubação em campo Cerrado do Estado do Amapá, Brasil. *Pasturas Tropicales*, Cali, v. 13, n. 2, p. 42-45, ago. 1991.

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

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

VALLE, C. B.; EUCLIDES, V. B. P.; MACEDO, M. C. M. Característica das plantas forrageiras do gênero *Brachiaria*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 17. 2000, Piracicaba. Anais... Piracicaba: FEALQ, 2000. p. 65108.

VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; GUTIERREZ, C; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J.-M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.53, p.1979-1983, 2003.

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

VIEIRA, J. M. Espaçamento e densidade de semeadura de *Brachiaria decumbens* Stapf para formação de pastagens. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queirós”, 1974. 160p. Tese de Mestrado.

VILELA, H. Formação de pastagens. Belo Horizonte, EMATER, 1977. 29p. (EMATER. Circular, 1).

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

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. Taxonomic studies of acetic acid bacteria and allied organisms. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16s ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to generic level. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, v.61, p.1244- 1251, 1997.

ZAMBRANO, E. R.; JIMÉNEZ SALGADO, T.; TAPIA HERNÁNDEZ, A. Estudo de bacterias asociadas a orquídeas (Orchidaceae). Lankesteriana, n. 71-2, p. 322-325, 2007.

ZIMMER, A.H.; BARBOSA, R.A. Manejo de Pastagens para Produção Sustentável. In: X Congresso Nacional de Zootecnia, 2005, Campo Grande. Anais X Congresso Brasileiro de Zootecnia, 2005.

8. ANEXOS

8.1. Anexo A

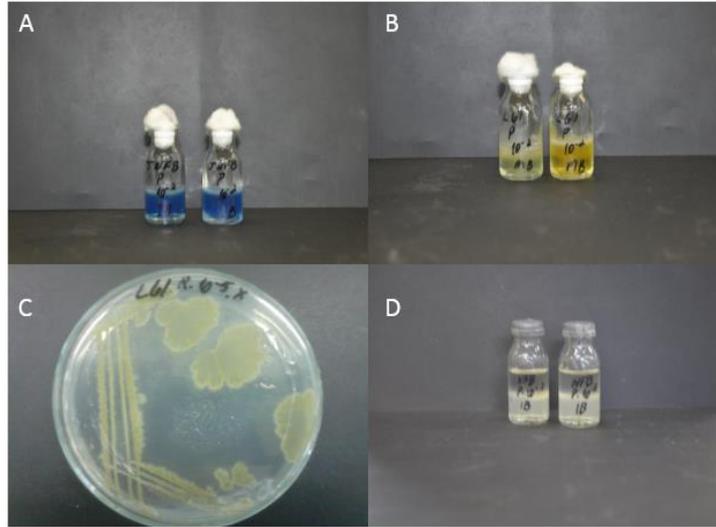


Figura 5. Processo de Purificação: meios semissólidos com as respectivas películas (A) e (B); placa com isolados (C); estoque de isolado puro (D).

8.2. Anexo B

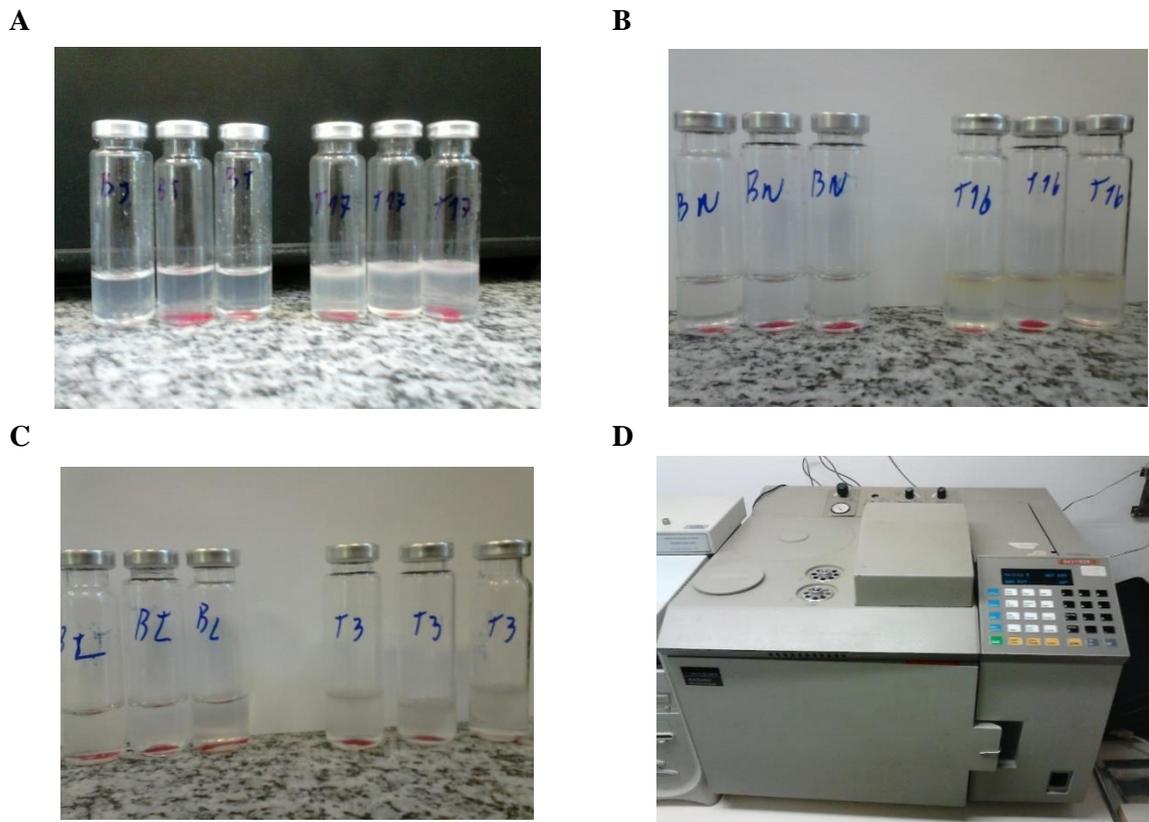


Figura 6. Frascos com isolados usados para redução de acetileno (ARA) (A), (B) e (C); equipamento utilizado.

8.3. Anexo C

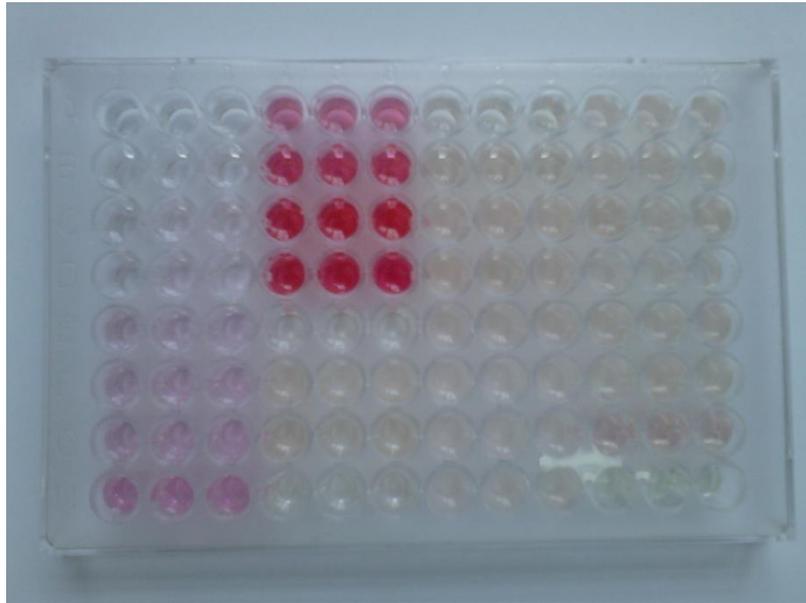


Figura 7. Microplaca com curva padrão e os 15 isolados acrescidos dos três padrões.

8.4. Anexo D

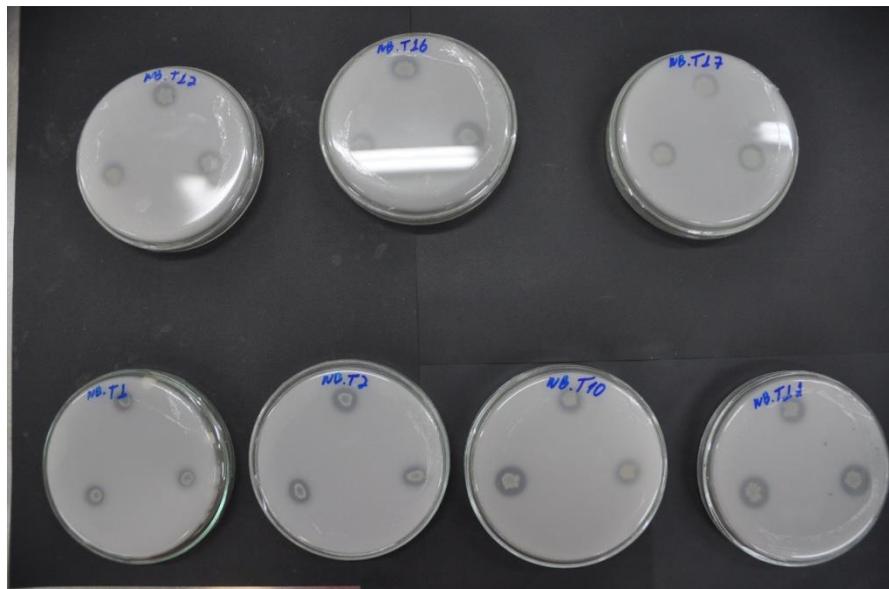


Figura 8. Placas de Petri com isolados, usadas para análise da solubilização de fosfato.

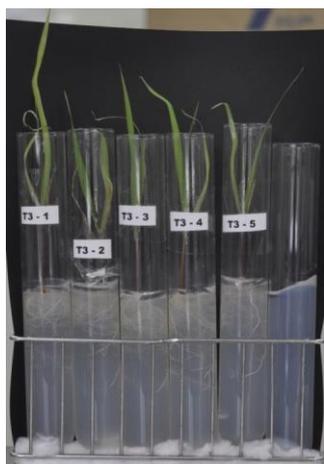
8.5. Anexo E



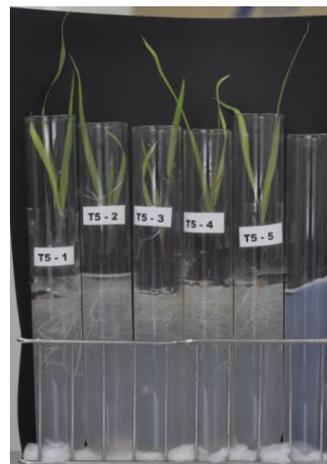
Figura 9. Montagem do experimento.

8.6. Anexo F

A)



B)



C)



D)



Figura 10. Três principais tratamentos que diferiram estatisticamente: T3 = L2 (A); T5 = L4 (B); T11 = J6 (C). E mais: T19 = Testemunha (D).

8.7. Anexo G

Tabela 8. Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros avaliados.

Análise de variância da massa fresca da parte aérea				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	18	0,09541	0,00530	6,5944 **
Resíduo	76	0,06109	0,00080	
Total	94	0,15651		
Análise de variância da massa seca da parte aérea				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	18	0,00370	0,00021	5,5573 **
Resíduo	76	0,00281	000004	
Total	94	0,00651		
Análise de variância da massa fresca das raízes				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	18	0,22656	0,01259	6,7933 **
Resíduo	76	0,14082	0,00185	
Total	94	0,36738		
Análise de variância da massa seca das raízes				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	18	0,00078	0,00004	4,6335 **
Resíduo	76	0,00071	0,00001	
Total	94	0,00149		
Análise de variância da área das raízes				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	18	16411758,10566	911764,33920	
Resíduo	76	17914160,17971	235712,63394	
Total	94	34325918,28537		
Análise de variância do volume de raízes				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	18	80267,87475	4459,32638	3,9197 **
Resíduo	76	86463,95021	1137,68356	
Total	94	166731,82496		
Análise de variância do comprimento de raízes				
FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	18	22788968,95189	1266053,83066	3,5267 **
Resíduo	76	27283330,87520	358991,19573	
Total	94	50072299,82708		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

8.8. Anexo F – Soluções Utilizadas

Solução salina para diluição seriada

K_2HPO_4	sol. 10%	1 ml
$MgSO_4$	sol. 10%	0,5 ml
NaCl	sol. 10%	0,2 ml
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	sol. 1%	0,5 ml
FeEDTA	sol. 1,64%	1 ml
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		0,5 ml
Ajustar o pH para 6,5 com solução de H_2SO_4 a 5% ; Completar para 1000 ml com água destilada.		

Soluções Solução salina para diluição seriada

$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,200 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,235 g
H_3BO_3	0,280 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,008 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,024 g
Completar para 200 ml com água destilada.	

Solução de Hoagland's para tubos

KH_2PO_4	sol. 1 M	1 ml
K_2HPO_4	sol. 1 M	1 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	sol. 1 M	2 ml
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	sol. 1 M	0,172 g
Solução de elementos menores para tubos		1 ml
Sol. de Ferro(*)		1 ml
Água destilada		1000 ml
pH 6,5 – 7,0		
(*) 1,21 g Na_2H_2EDTA /100 ml de água destilada, misturar bem e adicionar 0,6 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$.		

Solução de elementos menores para tubos

H ₃ BO ₃	2,86 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08 g
N _a 2M _o O ₄ .2H ₂ O	0,02 g
Completar para 1000 ml com água destilada.	

8.9. Anexo I – Meios de Cultura Utilizados

Meio NBRIP (NAUTIYAL, 1999)

Glicose	10 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g
KCl	0,2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 g
Ajustar o pH para 7; Para a formação do precipitado adicionar 100 ml K ₂ HPO ₄ (10%), 50 ml CaCl ₂ (10%) ou 5g L ⁻¹ de Ca ₃ (PO ₄) ₂ ; Adicionar 15g L ⁻¹ de agar para meio sólido; Completar com água destilada para 1000 ml.	

Meio Batata

Batata	200 g
Ácido málico	2,5 g
Açúcar cristal	2,5 g
Solução de micronutrientes para meio de cultura	2 ml
Solução de vitamina para meio de cultura	1 ml
Completar para 1000 ml com água destilada e colocar o agar por último.	

Meio JNFB

Ácido Málico		5 g
K ₂ HPO ₄	sol.10%	6 ml
KH ₂ PO ₄	sol.10%	18 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol.10%	2 ml
NaCl	sol.10%	1 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	sol. 1%	2 ml
FeEDTA	sol. 1,64%	4 ml
Azul de bromotimol 0,5% em 0,2N de KOH	2 ml	
Solução de micronutrientes para meio de cultura	2 ml	
Vitamina para meio de cultura	1 ml	
KOH	4,5 g	
Ajustar o pH para 5,8; Completar para 1000 ml com água destilada.		

Meio LGI

Açúcar cristal		5 g
K ₂ HPO ₄	sol.10%	2 ml
KH ₂ PO ₄	sol.10%	6 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol.10%	2 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	sol.10%	2 ml
FeEDTA	sol.1,64%	4 ml
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	sol.0,1%	2 ml
Azul de bromotimol 0,5% em 0,2N de KOH	5 ml	
Vitamina para meio de cultura	1 ml	
Ajustar o pH para 6,0 – 6,2 com H ₂ SO ₄ sol. 5%; Completar para 1000 ml com água destilada.		

Meio NFB

Glicose		2g
Ácido málico		2g
Peptona bacteriológica		1,5g
Extrato de levedura		2g
K ₂ HPO ₄		0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O		0,5g
Ácido glutâmico		1,5g
Ajustar o pH com solução de KOH a 10% pH 6,8 Completar para 1000 ml com água destilada		