

**UFRRJ**

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

**TESE**

**Fixação Biológica de Nitrogênio em Leguminosas  
Forrageiras Tropicais**

**Mayan Blanc Amaral**

**2023**



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

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM LEGUMINOSAS  
FORRAGEIRAS TROPICAIS**

**MAYAN BLANC AMARAL**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Bruno José Rodrigues Alves**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutora**,  
Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia- Ciência do Solo, Área de  
Concentração em Biologia do Solo.

Seropédica, RJ  
Outubro de 2023

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

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

A485m	<p>Amaral, Mayan Blanc, 1989- Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas forrageiras tropicais / Mayan Blanc Amaral. – Seropédica, 2023. 85 f. : il.</p> <p>Orientador: Bruno José Rodrigues Alves. Tese (Doutorado). – – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia Ciência do Solo, 2023.</p> <p>1. Amendoim-forrageiro. 2. Desmódio. 3. Guandu. 4. Macrotiloma. 5. Bactérias simbióticas. I. Alves, Bruno José Rodrigues, 1966-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Agronomia- Ciência do Solo III. Título.</p>
-------	---

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.**

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



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA (CIÊNCIAS DO SOLO)



**HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO Nº 16 / 2023 - CPGACS (12.28.01.00.00.27)**

**Nº do Protocolo: 23083.067722/2023-71**

**Seropédica-RJ, 06 de outubro de 2023.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

INSTITUTO DE AGRONOMIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO**

**MAYAN BLANC AMARAL**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, Área de Concentração em Biologia do Solo.

TESE APROVADA EM 06/10/2023.

Bruno José Rodrigues Alves. Dr. Embrapa Agrobiologia

(Orientador)

Irene da Silva Coelho. Dra. UFRRJ

Jerri Édson Zilli. Dr. Embrapa Agrobiologia

Enderson Petrônio de Brito Ferreira. Dr. Embrapa Arroz e Feijão

Luc Felicianus Marie Rouws. Dr. Embrapa Agrobiologia

*(Assinado digitalmente em 10/10/2023 15:01 )*

IRENE DA SILVA COELHO  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DMIV (12.28.01.00.00.00.54)  
Matrícula: 1815763

*(Assinado digitalmente em 10/10/2023 15:08 )*

JERRI EDSON ZILLI  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 927.881.579-91

*(Assinado digitalmente em 20/12/2023 09:36 )*

LUC FELICIANUS MARIE ROUWS  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 014.563.806-56

*(Assinado digitalmente em 18/10/2023 11:55 )*

ENDERSON PETRÔNIO DE BRITO FERREIRA  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 693.429.465-34

*(Assinado digitalmente em 11/10/2023 13:55 )*

BRUNO JOSE RODRIGUES ALVES  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 681.282.827-00

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **16**, ano: **2023**, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO**, data de emissão: **06/10/2023** e o código de verificação: **abc2de6aff**

## DEDICATÓRIA

Aos meus filhos, Rudhá e Suméh.

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a esta energia positiva que todos chamam de Deus e a minha família pelo compartilhamento de bons momentos e apoio.

À UFFRJ e a Embrapa Agrobiologia, e a todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo (Departamento de Solos) por compartilharem conhecimentos e contribuírem para a formação de bons profissionais.

Ao financiamento recebido pelo Procisur/Fontagro/Ministério da Indústria Primária da Nova Zelândia, por meio do projeto “Intensificación sostenible de sistemas ganaderos con leguminosas: Plataforma de cooperación Latinoamericana y del Caribe”

Ao CNPq pelas bolsas concedidas desde a iniciação científica até o doutorado.

A todos os funcionários da Embrapa Agrobiologia.

A ESSUL-Ceplac pelo acolhimento e apoio incondicional na execução das atividades, em especial a Dra. Cláudia Rezende, o amigo Joselito, Crispim “Carreirinha” e Diego “Galego”.

Ao Diego Alves, pelo companheirismo e apoio na vida.

Aos amigos que participaram das coletas, disciplinas e almoços científicos, em especial, ao Erinaldo, tia Kerly, Maura, Gabi, Edevaldo, Jaqueline, Israel e Camilla.

Aos agrônomos Thiago Neves, Caroline Feder, Tamiris Lopes e Alisson pelo apoio nos trabalhos de tese e pelos momentos de discussões científicas que tanto contribuíram.

À minha primeira orientadora, Dra. Vera Lúcia Baldani pela iniciação na carreira científica, pela amizade e por ter contribuído com a idealização da tese.

Ao meu orientador Dr. Bruno Alves pela orientação para a realização do trabalho e apoio em todas as etapas do trabalho.

Ao pesquisador Dr. Jerri Zilli por contribuir com toda a sua experiência na idealização da tese.

Aos membros da banca examinadora, pela disposição em analisar o trabalho.

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

## BIOGRAFIA

Mayan Blanc Amaral nasceu no município de Teófilo Otoni - MG, no dia 10 de novembro de 1989. Em 2008 concluiu o ensino médio concomitante ao curso técnico em Agropecuária no Instituto Federal Baiano em Guanambi, Bahia. Em 2009 ingressou no curso de graduação em Engenharia Florestal na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), concluindo-o em 2014. Em 2011, iniciou sua carreira científica na Embrapa Agrobiologia, sob orientação da Dra. Vera Lúcia Divan Baldani, durante o período de graduação foi bolsista de Iniciação Científica do CNPq e da Funarbe. Em março de 2015 foi aprovada em primeiro lugar no Mestrado do Curso de Pós-graduação em Agronomia - Ciência do Solo (CPGA-CS), na UFRRJ, concluindo-o em fevereiro de 2017. Em março de 2019 foi aprovada novamente em primeiro lugar no Doutorado do CPGA-CS, na UFRRJ e ingressou no Curso de Especialização (*latu sensu*) em Estatística Aplicada em março de 2020 com conclusão em novembro de 2021.

## RESUMO

AMARAL, Mayan Blanc. **Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas forrageiras tropicais**. 2023. 101p. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2023.

O Brasil se destaca na pecuária mundial na produção de gado de corte e leite, em sua maioria em sistema extensivo. As leguminosas forrageiras quando consorciadas com gramíneas podem aumentar o aporte de nitrogênio e a produtividade da pastagem, sem a necessidade de adubação nitrogenada sintética. Em estudos anteriores, algumas espécies de leguminosas permitiram a formação de consórcios eficientes com *Urochloa brizantha* cv Marandu, como *Grona heterocarpa* subsp *ovalifolia* cv Itabela (Syn. *Desmodium ovalifolium*), *Arachis pintoii* cv. Belmonte e Mandobi, e *Macrotyloma axillare* cv. Java, as duas primeiras espécies, estoloníferas e mais persistentes no consórcio, e a última de crescimento volúvel. No entanto, ainda existe uma baixa difusão da tecnologia pelos pecuaristas, muito em função da baixa disponibilidade de sementes comerciais. Em relação aos benefícios do consórcio, não se sabe ao certo qual o grau de dependência das leguminosas em pastagens pela fixação biológica de nitrogênio (FBN), e a mensuração do processo em diferentes locais com diferentes níveis tecnológicos serve de referência acerca do aprimoramento da tecnologia de inoculação, sendo um dos objetivos desta tese. Pastagens consorciadas com estas leguminosas foram avaliadas no Bioma Mata Atlântica através da técnica da abundância natural de  $^{15}\text{N}$ . Adicionalmente, outros objetivos da tese foram avaliar a contribuição de bactérias simbióticas e microrganismos associativos na promoção de crescimento dessas espécies de leguminosas forrageiras e no incremento da fixação biológica de nitrogênio. Visando melhorar a recomendação de inoculantes para pastagens, foram realizados testes de eficiência das estirpes rizobianas depositadas na Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia (CRB). Resultados da quantificação da FBN em campo demonstraram que as pastagens apresentam grau de fixação biológica nitrogênio diferentes e que variaram ao longo do ano. Apesar das leguminosas forrageiras serem consideradas promíscuas, apresentam diferentes graus de associação simbiótica com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* sp. A leguminosa *M. axillare* se destaca como responsiva a inoculação e há incrementos também com a coinoculação de microrganismos promotores de crescimento vegetal principalmente associados com efeitos na biomassa das raízes.

**Palavras-chave:** Amendoim-forrageiro. Desmódio. Guandu. Macrotiloma. Bactérias simbióticas. Coinoculação.

## ABSTRACT

AMARAL, Mayan Blanc. **Biological nitrogen fixation in tropical forage legumes.** 2023.101p. Thesis (Doctorate in Agronomy, Soil Science). Institute of Agronomy, Federal Rural University of Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2023.

Brazil stands out in global livestock production, particularly in beef and dairy cattle, predominantly in extensive systems. Forage legumes, when intercropped with grasses, can increase nitrogen input and pasture productivity without the need for synthetic nitrogen fertilization. In previous studies, some legume species allowed the formation of efficient intercropping systems with *Urochloa brizantha* cv. Marandu, such as *Grona heterocarpa* subsp. *ovalifolia* cv. Itabela (Syn. *Desmodium ovalifolium*), *Arachis pintoi* cvs. Belmonte and Mandobi, and *Macrotyloma axillare* cv. Java, with the first two species being stoloniferous and more persistent in the intercropping system, and the last one having a twining growth habit. However, there is still low diffusion of this technology among livestock farmers, mainly due to the low availability of commercial seeds. Regarding the benefits of intercropping, it is not yet known to what extent legumes in pastures depend on biological nitrogen fixation (BNF), and measuring this process in different locations with different technological levels provides reference points for improving inoculation technology, which is one of the objectives of this thesis. Pastures intercropped with these legumes were evaluated in the Atlantic Forest biome using the natural abundance technique of  $^{15}\text{N}$ . Additionally, other objectives of the thesis included evaluating the contribution of symbiotic bacteria and associative microorganisms in promoting the growth of these forage legume species and increasing biological nitrogen fixation. To improve the recommendation of inoculants for pastures, efficiency tests were conducted on rhizobial strains deposited in the Embrapa Agrobiology Culture Collection (CRB). Field quantification results of BNF demonstrated that pastures exhibit different levels of biological nitrogen fixation, which varied throughout the year. Although forage legumes are considered promiscuous, they exhibit different degrees of symbiotic association with bacteria of the genus *Bradyrhizobium* sp. The legume *M. axillare* stands out as responsive to inoculation, and there are also increases with the co-inoculation of plant growth-promoting microorganisms, mainly associated with effects on root biomass.

**Keywords:** Biological Nitrogen Fixation. Asian ticktrefoil. Perennial horsegram. Forage-peanut.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Temperatura e precipitação mensal durante as coletas em Itabela, BA..... 21
- Figura 2.** Análise de Componentes Principais das variáveis amostradas durante as 4 estações para avaliação da contribuição da FBN em pastagens consorciadas em Itabela, Bahia. NDFA= Nitrogênio oriundo da fixação e C= Carbono em %. K=Potássio e P= Fósforo em  $\text{mg L}^{-1}$ . Mg= Magnésio, Ca=Cálcio, H + Al= Acidez Potencial em  $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$ ..... 30
- Figura 3.** Árvore filogenética das sequências de gene 16S rRNA (~1500 pb), incluindo a estirpes-tipo depositadas no banco de dados do NCBI. A filogenia foi baseada em agrupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e modelo Kimura usando o programa MEGA 6.1. Números localizados nos ramos indicam que a porcentagem de 1000 sub-amostras (bootstrap). A escala representa o número de mutações pela posição dos nucleotídeos..... 46
- Figura 4.** Árvore filogenética baseado nas sequências de recA rRNA gene (~ 500 pb), incluindo as bactérias-tipo depositadas no banco de dados NCBI. A filogenia foi baseada no grupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e o modelo Kimura utilizando o programa MEGA 6.1. Números localizados nos ramos indicam que a porcentagem de 1000 sub-amostras (bootstrap). A escala representa o número de mutações pela posição dos nucleotídeos..... 48
- Figura 5.** Vista parcial dos experimentos em delineamento em blocos ao acaso aos 30 dias após o plantio. .... 60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Identificação dos consórcios amostrados em Itabela, BA. ....	20
<b>Tabela 2.</b> Massa fresca de parte aérea (MFPA), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), massa seca de nódulos (MSN) e número de nódulos (NN) em plantas de <i>Grona heterocarpa</i> cv. Itabela inoculada com diferentes estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio. ....	23
<b>Tabela 3.</b> Dados do N acumulado no tecido vegetal e abundância natural de <sup>15</sup> N em plantas de <i>G. heterocarpa</i> inoculado com estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> . ....	24
<b>Tabela 4.</b> Eficiência simbiótica de bactérias diazotróficas inoculadas em <i>Macrotyloma axillare</i> cv. java na massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), massa seca de nódulo (MSN) e nodulação (NN). ....	25
<b>Tabela 5.</b> Dados do N acumulado no tecido vegetal e abundância natural de <sup>15</sup> N em plantas de <i>Macrotyloma axillare</i> cv. Java. ....	26
<b>Tabela 6.</b> Massa seca disponível de gramíneas (Gram), leguminosas (Leg), ervas espontâneas (inv) e percentual de leguminosas (LG) para a massa seca disponível em pastagens consorciadas durante as quatro estações do ano, em diferentes locais (L) em Itabela, BA. ....	27
<b>Tabela 7.</b> Dados médios da análise de fertilidade do solo de diferentes localidades (L) com pastagens consorciadas amostradas durante o ano, em Itabela, BA. ....	28
<b>Tabela 8.</b> Contribuição da fixação biológica de nitrogênio durante as quatro estações do ano, em pastagens consorciadas em Itabela, BA. ....	29
<b>Tabela 9.</b> Análise química de terra proveniente das áreas plantadas com <i>Arachis pintoi</i> e <i>Grona heterocarpa</i> em Itabela, BA e com <i>Macrotyloma axillare</i> em Seropédica, RJ. ....	38
<b>Tabela 10.</b> Identificação dos isolados oriundos de nódulos de plantas de <i>A. pintoi</i> e <i>G. heterocarpa</i> com base na similaridade do gene recA com estirpes oriundas do NCBI. ...	43
<b>Tabela 11.</b> Inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio inoculadas em <i>Arachis pintoi</i> cv. Mandobi nas variáveis massa de parte aérea seca (MSPA), massa de raiz seca (MSR), massa de nódulos secos (MSN) e número de nódulos (NN). ....	44
<b>Tabela 12.</b> Inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio inoculadas em <i>Grona heterocarpa</i> cv. Itabela nas variáveis massa de parte aérea seca (MSPA), massa de raiz seca (MSR), massa de nódulos secos (MSN), número de nódulos (NN). ....	44
<b>Tabela 13.</b> Número de nódulos (NN), massa seca de nódulo (MSN), nitrogênio acumulado na parte aérea (N), massa seca de raiz (MSR) e massa seca de parte aérea (MSPA), de <i>M. axillare</i> inoculada com estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> em um experimento em casa-de-vegetação. ....	49
<b>Tabela 14.</b> Avaliação da competitividade rizobiana no número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), nitrogênio acumulado na parte aérea (N), massa seca de raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA) de <i>M. axillare</i> inoculada com estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> sp. em um experimento em vaso Leonard modificado. ....	51
<b>Tabela 15.</b> Abundância Natural ( <sup>15</sup> N), Percentual de nitrogênio derivado da fixação (Ndfa), N total acumulado na parte aérea (N), e nitrogênio derivado da fixação biológica de nitrogênio (N FBN) de <i>M. axillare</i> inoculado com estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> . ....	52
<b>Tabela 16.</b> Análise de fertilidade do solo proveniente de um Argissolo utilizado como substrato nos experimentos de coinoculação de microrganismos promotores de crescimento vegetal em casa de vegetação em Seropédica, RJ. ....	59

<b>Tabela 17.</b> Tratamentos de inoculação cruzada utilizados no experimento. ....	62
<b>Tabela 18.</b> Inoculação com rizóbios recomendados para <i>Arachis pintoi</i> , <i>Grona heterocarpa</i> e <i>Macrotyloma axillare</i> e microrganismos promotores de crescimento vegetal <i>Azospirillum brasilense</i> (A), <i>Torulaspora indica</i> (Y) nas variáveis massa da parte aérea seca (MSPA), massa da raiz seca (MSR), número de nódulos (NN) e massa de nódulos seca (MSN). ..	65
<b>Tabela 19</b> Abundância Natural de Delta <sup>15</sup> N (δ <sup>15</sup> N ‰), percentual de nitrogênio derivado da FBN (Ndfa%) e nitrogênio derivado da FBN acumulado na parte aérea (NdFBN) de <i>Macrotyloma axillare</i> após 60 dias após o plantio, inoculado com BR3101 <i>Bradyrhizobium spp.</i> e (A) <i>A. brasilense</i> e (Y) <i>T. indica</i> em casa-de-vegetação.....	66
<b>Tabela 20.</b> Eficiência simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio e (A) <i>Azospirillum brasilense</i> em <i>Macrotyloma axillare</i> cv. Java na massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), nodulação (NN), massa seca de nódulos (MSN) e N acumulado na parte aérea (Npa).....	67
<b>Tabela 21.</b> Incremento em biomassa (g) durante o primeiro e segundo corte das leguminosas forrageiras <i>A. pintoi</i> , <i>G. heterocarpa</i> , <i>C. cajan</i> e <i>M. axillare</i> em inoculação cruzada com bactérias nodulantes e <i>Azospirillum baldaniorum</i> .....	67

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Panorama da Pecuária Brasileira .....	3
2.3 Espécies Forrageiras Utilizadas no Trabalho.....	8
2.4 Perspectiva do Uso de Inoculantes em Leguminosas Forrageiras.....	11
2.5 Abundância Natural de <sup>15</sup> N como Forma de Quantificação do N no Sistema Solo-Planta .....	12
3. CAPÍTULO I CONTRIBUIÇÃO DA FBN PARA A NUTRIÇÃO DE LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS NÃO-INOCULADAS COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS, PRESENTES EM PASTAGENS .....	14
3.1 RESUMO.....	15
3.2 ABSTRACT.....	16
3.3 INTRODUÇÃO .....	17
3.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	19
3.4.1 Determinação do Valor B.....	19
3.4.2 Contribuição da FBN em pastagens consorciadas com leguminosas forrageiras em propriedades rurais de Itabela, BA.....	20
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
3.5.1 Experimento Valor B: <i>Grona heterocarpa</i> e <i>Macrotyloma axillare</i> .....	23
3.5.2 Contribuição da FBN em pastagens consorciadas com leguminosas forrageiras ..	26
3.6 CONCLUSÕES .....	32
4. CAPÍTULO II ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS EM LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS.....	33
4.1 RESUMO.....	34
4.2 ABSTRACT.....	35
4.3 INTRODUÇÃO .....	36
4.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	38
4.4.1 Isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio em <i>Arachis pintoi</i> , <i>Macrotyloma axillare</i> e <i>Grona heterocarpa</i> .....	38
4.4.2 Análises filogenéticas.....	40
4.4.3 Eficiência simbiótica das estirpes bacterianas .....	40
4.4.4 Ensaio da avaliação de rizóbios selecionados de <i>M. axillare</i> em condições não-estéreis.....	41
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.5.1 Análise Molecular de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio.....	43
4.5.2 Eficiência simbiótica de estirpes rizobianas em <i>A. pintoi</i> e <i>G. heterocarpa</i> .....	43
4.5.3 Isolamento de Microsimbiontes em <i>Macrotyloma axillare</i> e caracterização dos isolados.....	45

4.5.4 Eficiência simbiótica das estirpes bacterianas em macrotiloma .....	49
4.5.5 Avaliação de competitividade dos rizóbios simpátricos e alopátricos.....	50
4.6 CONCLUSÕES .....	53
5. CAPÍTULO III INOCULAÇÃO DE CONSÓRCIOS DE MICRORGANISMOS EM LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS.....	54
5.1 RESUMO.....	55
5.2 ABSTRACT.....	56
5.3 INTRODUÇÃO .....	57
5.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	59
5.4.1 Consórcio de Microrganismos Promotores de Crescimento em Leguminosas Forrageiras em Casa-de-Vegetação.....	59
5.4.2 Seleção de consórcios rizobianos em leguminosas forrageiras.....	61
5.4.3 Experimento de inoculação cruzada em leguminosas forrageiras .....	61
5.4.4 Análise estatística.....	63
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.5.1 Experimentos com consórcios de microrganismos promotores de crescimento em leguminosas forrageiras .....	64
5.5.2 Seleção de consórcios rizobianos em leguminosas forrageiras.....	66
5.5.3 Experimento de inoculação cruzada em leguminosas forrageiras .....	67
5.6 CONCLUSÕES .....	69
6. CONCLUSÕES FINAIS .....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A pecuária é um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro e consequentemente da economia nacional. O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, criado majoritariamente em pastagens. É o segundo maior produtor de carne, mas o maior exportador, e é sexto maior produtor de leite do mundo. Há aproximadamente 160 milhões de hectares de pastagens no Brasil, dos quais 80% são monocultivos com espécies de *Urochloa* (syn. *Brachiaria*) (USDA, 2020), e deste total, cerca de 38% estão em um grau intermediário de degradação, e 14,3%, severamente degradados (MAPBIOMAS, 2021). 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 (N) (CORSI; NUSSIO, 1993), além de ser perdido principalmente por formas voláteis por meio das excreções dos animais (BODDEY et al., 2004). Sua reposição em níveis insuficientes, ou a rara fertilização com N, explica ser este nutriente o que mais limita a recuperação da pastagem (OLIVEIRA et al., 2001).

Os altos custos de aquisição de fertilizantes nitrogenados, e a crescente preocupação com a poluição dos recursos hídricos e da atmosfera pelo uso desses insumos, associado ao elevado custo energético para sua obtenção, tem estimulado a busca de alternativas sustentáveis (AMADO et al., 2002). Dentre essas alternativas, o uso de leguminosas forrageiras em pastagens consorciadas viabiliza o aporte de N através da fixação biológica de  $N_2$  (FBN), sem a necessidade do uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos.

A introdução de uma leguminosa forrageira em uma pastagem é uma estratégia para fornecer uma dieta com alto teor protéico para bovinos de corte ou leite, especialmente na estação seca. A decomposição de seus resíduos e a reciclagem do N via excretas (urina e fezes) aumenta a disponibilidade de N no solo para melhor desempenho da gramínea, e por isso a fertilização nitrogenada é reduzida ou mesmo dispensável (SCHULTZE-KRAFT et al., 2018). Isto também mitiga a produção de  $N_2O$  no solo e reduz as emissões de  $CO_2$  associadas à produção e distribuição dos fertilizantes nitrogenados (ZILLI et al., 2020; BODDEY et al., 2020).

Entretanto, mesmo com os resultados positivos comprovados em pesquisa, a utilização do consórcio de gramíneas com leguminosas ainda é raro, especialmente pela dificuldade de manter o sistema estável por longo prazo. Geralmente, relata-se como problemas, a falta de persistência das leguminosas, a exigência de manejo diferenciado em relação às pastagens de gramíneas puras, a necessidade de solos mais férteis, a susceptibilidade a doenças e, ainda, questões de adaptação ao ambiente de produção (REIS JÚNIOR; TEIXEIRA; REIS, 2002).

As leguminosas forrageiras tropicais *Arachis pintoi* (amendoim forrageiro), *Grona heterocarpa* (desmódio) e *Macrotyloma axillare* (macrotiloma ou Java), estudadas nesta tese, apresentam potencial para reforma das pastagens brasileiras. Todas são capazes de formar nódulos e se beneficiarem da FBN, porém, devido aos poucos estudos com essas espécies, não se sabe se a FBN pode ser intensificada por meio de seleção de estirpes mais eficientes e competitivas. A seleção de rizóbios prospectados para compor inoculantes auxiliam no estabelecimento da leguminosa, especialmente se as populações de rizóbio no solo estão em baixo número (SINGLETON et al., 1992). Outro componente ainda menos estudado é a possibilidade de intensificar ainda mais o desenvolvimento da leguminosa por meio da

coinoculação com microrganismos promotores de crescimento vegetal, os quais podem induzir a maior produção de raízes e antecipação da nodulação, significando numa maior tolerância da planta à condição de estresses ambientais, e conseqüentemente, da maior contribuição da fixação biológica de N<sub>2</sub> para o sistema (CEREZINI et al., 2016; JESUS et al., 2018). Assim, a hipótese que se plantea é que a FBN em leguminosas forrageiras pode ser amplificada pela seleção de bactérias diazotróficas simbióticas eficientes, processo que pode ser maximizado pela coinoculação com microrganismos promotores de crescimento.

Dessa forma, o objetivo desta tese foi selecionar rizóbios capazes de promover a maior eficiência simbiótica para leguminosas forrageiras, e, também, microrganismos associativos para promoção de crescimento vegetal, visando maximizar a contribuição da FBN para as plantas.

A tese foi organizada em capítulos. No primeiro, quantificou-se a fixação biológica de nitrogênio em pastagens consorciadas de *A. pintoi* e *G. heterocarpa* já estabelecidas visando avaliar a existência de potencial incremental no processo em condições de campo, atividade que exigiu uma etapa preliminar de aprimoramento da técnica de abundância natural de <sup>15</sup>N para quantificar a FBN. No segundo capítulo, trabalhou-se com o isolamento e a caracterização de rizóbios em *Arachis pintoi*, *Grona heterocarpa* e *Macrotyloma axillare*, para compor inoculantes para essas espécies. No terceiro, avaliou-se a inoculação mista de microrganismos promotores de crescimento vegetal em *A. pintoi*, *C. cajan*, *G. heterocarpa* e *M. axillare*, visando intensificar o crescimento das plantas e a contribuição da FBN.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Panorama da Pecuária Brasileira

O setor agropecuário mundial tem buscado atender à crescente demanda por alimentos, e em contrapartida, a expansão do rebanho bovino deve ocorrer sem que novas áreas tenham que ser convertidas de florestas para pastagens. Isto se deve ao intuito de se intensificar o uso de áreas de pastagens cultivadas, pela combinação de uso otimizado de insumos, melhoria de técnicas de manejo, incremento da suplementação alimentar e utilização de sistemas de produção em integração (ALVES et al., 2017).

A pecuária Brasileira caracteriza-se por ser quase que exclusivamente extensiva, utilizando plantas forrageiras no pastejo direto (PAULINO; PAULINO, 2003). Nos últimos 36 anos, a área recoberta por pastagem teve um crescimento de 39,1%. Entretanto, dos cerca de 154,9 Mha cobertos por pastagens cultivadas em monocultivo, principalmente com gramíneas do gênero *Urochloa* (syn. *Brachiaria*), cerca de 52,2 % encontram-se em algum grau de degradação devido ao manejo inadequado do sistema solo-planta-animal e ao gerenciamento ineficiente da atividade. Tudo isso predispõe à degradação das pastagens e ao aumento dos impactos negativos sobre o ambiente (erosão, assoreamento de rios, etc.) (BARCELLOS et al., 2008) e conseqüentemente, a baixa taxa de ocupação animal de cerca de 0,9 UA ha<sup>-1</sup> (MAPBIOMAS, 2021).

A grande área de pastagem recoberta, quase em monocultivo, em solos de baixa fertilidade aliado ao manejo inapropriado causa grande risco à pecuária brasileira. 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).

Entre os nutrientes que são mais exportados pelos 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; NUSSIO, 1993).

Oliveira et al. (2007) demonstraram que a baixa disponibilidade de N no solo é o que mais limita o crescimento das pastagens em degradação. Esse processo de redução das reservas de N do solo está relacionado com as perdas de N que ocorrem a partir dos dejetos (urina e fezes) depositados no solo e pela exportação via animal (BODDEY et al., 2004). O metabolismo dos ruminantes apresenta uma baixa eficiência na assimilação do nitrogênio ingerido via gramíneas. Segundo Ball e Ryden (1984) cerca de 90% de todo o N ingerido pelos animais retorna ao solo na forma de fezes e urina. Este retorno do nutriente poderia servir de forma de recomposição da fertilidade do solo, entretanto, as perdas são muito elevadas. De acordo com Ferreira et al. (2000), cerca de 34 a 80% do nitrogênio presente na urina e 10% do depositado nas fezes são perdidos por lixiviação ou volatilização da amônia.

Muitos pesquisadores buscam encontrar uma forma de contornar o problema das perdas de N no sistema de pastagens e assim diminuir ou controlar sua degradação. As formas minerais desse elemento, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, são altamente solúveis e facilmente perdidas por volatilização de amônia, lixiviação ou por redução do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a formas gasosas (N<sub>2</sub>O e N<sub>2</sub>), pelo processo de desnitrificação. Muitas vezes, dependendo do sistema de manejo utilizado, as aplicações de adubo nitrogenado beneficiam a produtividade vegetal somente em curto prazo, tornando-se, para o caso das pastagens extensivas, inviável economicamente (BODDEY et al., 1993), muito embora, a reposição do N se torna indispensável para a longevidade da pastagem. A fertilização nitrogenada é um dos recursos mais utilizados para reposição de N nas pastagens, porém tem um impacto ambiental considerável, além do impacto econômico mencionado anteriormente.

Apesar da grande contribuição para a produção a pasto, o uso de leguminosas forrageiras em pastagens no Brasil ainda é muito limitado. Atualmente, no entanto, existem claros sinais que essa situação esteja mudando e existe renovado interesse por leguminosas (BARCELLOS et al., 2008). Esse interesse e potencialidade pouco explorada, deve ser suportado por informações técnicas que forneçam aos produtores uma visão crítica e realista das vantagens e desvantagens do uso dessas plantas (ZIMMER et al., 2012).

## 2.2 Consórcios de Leguminosas e Gramíneas

Andrade et al. (2009) atribuíram o insucesso das pastagens consorciadas no Brasil, ao fato de inicialmente a adoção de um manejo baseado em pastagens consorciadas com leguminosas de clima temperado, como por exemplo, trevos com hábito de crescimento prostrado, com pueraria (crescimento volúvel) e/ou estilosantes (ereto) que pouco contribuíram para o êxito da prática.

Estudos pioneiros com leguminosas em pastagens tropicais foram realizados na Austrália motivados pela menor qualidade de forragem de gramíneas tropicais do que gramíneas em clima temperado. As leguminosas seriam uma fonte suplementar de proteína e adição de N aos solos tropicais. No entanto, baseado em experiências acumuladas nas últimas décadas, o papel das leguminosas forrageiras na sustentabilidade das pastagens foi ampliado. Os benefícios são decorrentes de 3 características principais das leguminosas: i) Fixação Biológica de nitrogênio; ii) atributos nutricionais da forragem capazes de impactar positivamente a nutrição e a sanidade dos animais; iii) compostos bioativos (ANDRADE et al., 2009).

No Brasil, os estudos com leguminosas forrageiras foram intensificados na década de 70-80 em instituições de pesquisa nacionais que culminaram com a obtenção de cultivares de estilosantes, amendoim-forrageiro e leucena que possuem maiores informações compiladas. Outras forrageiras, como guandu, macrotiloma e soja-perene apresentam potencial para serem implementadas em cultivos mistos (PAULINO et al., 2006; GIMENES et al. 2017).

Existe uma relação positiva entre a compatibilidade de espécies e a facilidade de manejo do pastejo da pastagem, ou seja, quanto maior a compatibilidade do consórcio, maiores as possibilidades de desenvolvimento de indicadores de manejo do pastejo que sejam flexíveis e de fácil adoção e ainda assim eficientes em assegurar a produtividade e estabilidade das pastagens, bem como, a lucratividade da atividade pecuária (ANDRADE et al., 2009).

O consórcio de amendoim-forrageiro (*Arachis pintoi* cv. Belomonte) com grama-estrela-roxa (*Cynodon nlemfuensis* cv. Lua) é classificado como um modelo de alta grau de compatibilidade em regiões tropicais (ANDRADE, 2010; ANDRADE et al., 2009; ANDRADE; FERREIRA; CASAGRANDE, 2015). Os benefícios atribuídos ao consórcio incluem a complementaridade das espécies que apresentam arranjo diferenciado -grama-estrela-roxa no dossel superior e o amendoim no dossel inferior, a utilização da luz, a palatabilidade de ambas as espécies e o favorecimento em períodos de déficit hídrico, pois o amendoim-forrageiro é sombreado diminuindo as taxas de evapotranspiração e estresse térmico e o amendoim-forrageiro com capacidade de ajustar sua arquitetura ao pastejo e tolerância ao encharcamento e ao sombreamento, capacidade de se associar com rizóbios fixadores de N<sub>2</sub>, dentre outros.

O estabelecimento inicial lento desta leguminosa forrageira, que pode levar até um ano para colonizar toda área, pode ser solucionado adotando no primeiro ano, a gramínea com outra leguminosa de crescimento inicial rápido, como, o estilosantes ou o feijão guandu. Amendoim-forrageiro cultivar Belomonte é adaptada a condições de clima tropical úmido e com estabelecimento vegetativo (estolonífero), no entanto, o lançamento de outros genótipos vem sendo realizados, com maiores produções de sementes e adaptadas às condições da região Norte

ao Sul do Brasil, como recentemente a cultivar BRS Mandobi em 2019 com boa produção de sementes a variedade Oquira que apresenta propagação por mudas e tolerante ao déficit hídrico.

Nas condições de cerrado são relatados êxito no consórcio de *U. brizantha* com *Grona incanum*, *U. humidicola* com *G. heterocarpa* CIAT 350, *U. dictyoneura* cv. Llanero, *U. humidicola* e *U. ruziziensis* com *Arachis pintoi* CIAT 17434 (cv. Maní Forrajero perenne), *U. brizantha* cv. Marandu associa-se bem com *G. heterocarpa*, *C. brasilianum*, *C. macrocarpum*, *Calopogonium mucunoides*, *P. phaseoloides* e *A. pintoi*. Outros exemplos de êxito são reportados com o uso de *Stylosanthes guianensis* e *A. pintoi* com *U. brizantha*, *U. decumbens*, *Andropogon gayanus*, *M. maximum* (PAULINO et al., 2006). No caso do *Stylosanthes*, existem cultivares tolerantes à antracnose, dentre os quais figuram o *Stylosanthes* cv. Campo Grande (80% de *S. capitata* e 20% *S. macrocephala*) lançada em 2000, pela Embrapa Gado de Corte vem sendo utilizada cada dia mais em todo território nacional.

Pastagens consorciadas entre leguminosas forrageiras de porte arbustivo ou arbóreo tem maior persistência quando consorciadas com gramíneas, principalmente, devido a separação física entre os componentes, o que implica em menor competição entre as espécies bem como, a longevidade por se tratar de uma espécie florestal. A espécie *Leucaena* tem sido utilizada amplamente em pastagens consorciadas tropicais, principalmente na Austrália (MULLEN et al., 2005). No Brasil, o Instituto de Zootecnia vem desenvolvendo estudos agrônomicos com várias espécies de *Leucaena*, *L. leucocephala* e *L. diversifolia*, tanto para uso como banco de proteína ou em faixas nas pastagens para serem pastejadas assim que atingirem a altura de 1,50 m com 10 dias de ocupação e 36 a 42 dias de repouso. A exemplo do alcançado com soja perene cv. Malawe, almeja-se identificar genótipos de leucena e guandu, de galactia e de outras leguminosas promissoras tolerantes a solos ácidos, com baixos teores de cálcio e altas concentrações de alumínio (PAULINO et al., 2006).

Até o momento não existem dados da área total recoberta por pastagens cultivadas no mundo em consórcio com leguminosas. No entanto, baseado na lista produzida pela Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO; [www.feedipedia.org](http://www.feedipedia.org)) existem 169 espécies de leguminosas utilizadas na alimentação animal, desde plantas com hábito herbáceo a lenhoso.

Alguns benefícios alcançados pela utilização de leguminosas e gramíneas consorciadas em pastagens incluem: (I) aumento da fertilidade do solo, principalmente nitrogênio *via* FBN para o sistema solo-pastagem-animal e diminuição da necessidade de insumos externos (CANTARUTTI et al., 2002) e (II) O aumento no fornecimento de proteína bruta e melhora da digestibilidade da forragem principalmente no período de estiagem.

Em um estudo realizado em condição de cerrado, o consórcio entre *Stylosanthes guianensis* cv. mineirão e *U. ruziziensis* propiciou a longevidade da pastagem permitindo um maior ganho animal por área e contínuo ganho por peso. O experimento foi conduzido durante o inverno em Uberaba em que as chuvas são escassas e apresentou uma redução na oferta da pastagem de 25% a para 20%, no entanto, devido às raízes profundas a leguminosa se manteve verde sendo preferida pelos animais. O consórcio superou em 4 toneladas ha<sup>-1</sup> a produção de forragem quando comparado ao monocultivo de *U. ruziziensis* sem adubação nitrogenada, o que pode ter sido resultado de uma melhor reciclagem da liteira (AYARZA et al., 1997).

As emissões de metano decorrente da fermentação entérica em ruminantes contribuem com as emissões de gases de efeito estufa, entretanto ocorrem reduções nas emissões com dietas de melhor qualidade. As leguminosas mantêm durante o ano seu valor nutritivo de modo mais estável que as gramíneas forrageiras, ou seja, eficiência mais elevada no uso de nutrientes, em ambiente ruminal. Leguminosas com altos níveis de proteína e menores porcentagens de fibra tem comportamento similar ao da adição de um concentrado a uma dieta de baixa qualidade

(baixa digestibilidade, com baixo teor de proteína e carboidratos solúveis (BENCHAAR et al., 2001; POSSENTI, 2006).

Paciullo et al. (2003) avaliaram a produção e a qualidade da massa de forragem de *U. decumbens* em monocultivo e consorciada com *S. guianensis* e observaram que a utilização da leguminosa contribui para o aumento da quantidade e melhoria da qualidade da forragem disponível.

Resultados semelhantes foram obtidos por Schunke et al. (2000), que apontaram um aumento de até 35% no crescimento da Braquiária e aumento de 16,4% do N presente na palha produzida.

Maior ganho de peso vivo dos animais, a presença de leguminosas, na proporção de 20 a 40% de leguminosas em pastagens, é responsável por aumentos da ordem de 30% e 20% nas produções de leite e carne, respectivamente.

Leguminosas forrageiras, como o *Macrotyloma axillare*, reduz ou inibe a formação de fêmeas adultas e afeta o desenvolvimento de *Meloidogyne javanica* após a penetração das raízes o que implicaria numa menor incidência em áreas susceptíveis (MIAMOTO et al., 2020).

Cultivos mistos propiciam a pastagem uma capacidade de funcionar, dentro dos limites de um ecossistema natural, para sustento da produtividade biológica, manutenção e melhoria da qualidade ambiental e promoção do vigor das plantas e da saúde dos animais (DORAN; PARKIN, 1994), além de propiciar uma diminuição das perdas de solo por processos erosivos (ZIMMER, 2012). Vários benefícios foram propostos, como: a maior diversidade e abundância de insetos polinizadores, principalmente abelhas no consórcio quando comparado a gramíneas em monocultivo (WOOD et al., 2013).

O consórcio com leguminosas forrageiras pode aumentar o fornecimento de nitrogênio em pastagens. Estas apresentam maior eficiência no processo de FBN em função da formação dos nódulos radiculares que podem contribuir para o aporte de N na planta e aproveitamento deste pelas gramíneas.

O aporte de N às pastagens pela FBN por leguminosas contribui para a sustentabilidade do sistema de produção com valores que podem variar de 40 a 280 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (DE LIMA FILHO et al., 2014).

Aspectos sobre a baixa adoção de pastagens consorciadas foram delineados por Barcellos et al. (2008): (I) portfólio de cultivares pequeno; (II) custo elevado de sementes; (III) a persistência sob pastejo é limitada, (IV) o estabelecimento lento e (v) porque o real papel que elas podem desempenhar nos sistemas de produção é pouco conhecido.

A baixa disponibilidade de sementes implica em maiores custos de comercialização, no entanto, a partir do momento em que os benefícios da utilização de leguminosas para alimentação animal for mais difundida entre os pecuaristas haverá uma maior disponibilidade de sementes. Uma outra alternativa, está relacionada com a escolha por espécies ou manejo que propiciem a ressemeadura natural (PAULINO et al., 2006) ou por espécies estoloníferas que persistem por mais tempo, como *Arachis pintoi* ou *Grona heterocarpa*.

A baixa persistência pode ser oriunda de um pastejo intenso ou períodos de descanso longos que reduzem a participação das leguminosas na composição botânica. O manejo adequado pode ser alcançado visando o favorecimento da leguminosa, mas sem comprometer a produtividade das gramíneas, como por exemplo, a seleção de espécies compatíveis para o consórcio, a adubação diferenciada na faixa da leguminosa, entre outras (PAULINO et al., 2006).

Algumas espécies de leguminosas apresentam substâncias antinutricionais e não devem exceder a proporção recomendada, como por exemplo, proporções maiores do que 50% no pasto com leucena apresenta uma produção de taninos e de aminoácidos não proteicos (mimosina) que ocasiona disfunções metabólicas, como perda de pelos, salivação e perda de

peso, especialmente em ruminantes ainda não adaptados, pode ainda provocar disfunção da atividade de reprodução em vacas (ANDRADE et al., 2009).

Gimenes et al. (2017) relatam sobre a necessidade de estudos específicos para estimar a faixa ideal de participação das leguminosas na massa forrageira em gramíneas tropicais e leguminosas em pastagens mistas.

Existem também poucos estudos sobre insetos-praga ou doenças de leguminosas utilizadas como forragem, na adubação verde ou em consórcio gramíneas e leguminosas, devido ao fato das plantas apresentarem pragas e doenças diferentes, aumentam a complexidade do manejo do sistema o que pode influir na baixa aceitabilidade pelos pecuaristas, além da falta de incentivos financeiros (DE LIMA FILHO et al., 2014).

Dentre estas, informações sobre a viabilidade financeira e sustentabilidade econômica da atividade são importantes para nortear as decisões dentro da fazenda, apesar de escassas na literatura. A viabilidade econômica é o principal atributo na adoção de uma tecnologia pelos produtores rurais, no entanto, geralmente os trabalhos técnicos na área de ciências agrárias avaliam a viabilidade técnica das pastagens consorciadas, pouca atenção tem sido dada aos estudos sobre a viabilidade econômica (SOARES et al., 2015).

A sustentabilidade econômica dos consórcios depende de fatores não controlados pelo pecuarista, como flutuações nos preços pagos pelo leite e carne e por fatores controlados como, nível tecnológico do produtor, manejo, melhoramento do rebanho e das pastagens, capacitação dos trabalhadores, etc.

No Brasil a produção pecuária se concentra nos estados do centro-oeste e norte do país. A produtividade dos pastos é geralmente baixa devido a criação de forma extensiva sem a reposição dos nutrientes que são exportados pelos animais e solos geralmente de fertilidade baixa, no entanto, mudanças no manejo podem desonerar custos de produção e torná-las mais sustentáveis, cumprindo com acordos ambientais de mitigação de gases de efeitos estufa.

O uso de fertilizantes e corretivos pelos pecuaristas é muito limitado, apesar de ser uma maneira efetiva de repor nutrientes no sistema e, potencialmente, garantir a sustentabilidade do sistema de produção. Essa reposição insuficiente de nutrientes certamente é um dos principais fatores que explica o crescente processo de degradação das pastagens (BARCELLOS et al., 2008).

Nos sistemas intensivos de criação, os gastos diretos com fertilizantes podem representar mais de 60 % do custo de produção, implicando ainda custos agregados com transporte, armazenamento, aplicação, aquisição de animais (pela maior lotação) e outros insumos, além de uma eficiente gestão da produção e utilização da forragem produzida. As leguminosas podem contribuir, associada a outras tecnologias, para minimizar os reflexos diretos e indiretos desse cenário, em escala local e nacional, por conta dos distintos serviços que, potencialmente, podem desempenhar, não se restringindo apenas às cadeias de produção de carne e leite (BARCELLOS et al., 2008).

Trabalhos conduzidos em fazendas, na região de Uberlândia, em solos arenosos e argilosos, compararam a recuperação da pastagem com e sem leguminosa. A inclusão do estilosantes Mineirão nas pastagens degradadas de *U. decumbens* e *U. ruziziensis* foi responsável por aumento no ganho diário de peso de novilhas nelore e na produtividade da pastagem. Considerando um incremento de 4,5 @ por hectare por ano, a inclusão do Mineirão foi economicamente rentável (VILELA et al., 1999).

Kichel et al. (2006) conduziram um experimento sobre diferentes processos de recuperação de pastagens degradadas em Coxim, MS durante três anos consecutivos e concluíram que todas as alternativas de recuperação utilizadas no estudo resultaram em aumentos na produção, receita bruta e margem líquida, na média dos três anos de avaliações. A pastagem recuperada, com preparo do solo, com terraços, com adubação, plantio consorciado de *U. brizantha* e *Stylosanthes ssp.* cv. Campo Grande e com manejo recomendado pela

Embrapa foi mais relevante a partir do segundo ano e no terceiro ano equiparou-se aos tratamentos com adubação completa na produtividade e foi superior na margem líquida. Cabe destacar que estes tratamentos, ao final das avaliações, apresentavam melhor cobertura do solo, menor escoamento de água e menores taxas de perdas de solo (DEDECEK et al., 2006) e menor presença de invasoras em relação aos demais tratamentos (KICHEL et al., 2006).

Manzano et al. (1988) avaliaram a viabilidade da utilização de guandu como volumoso na dieta de engorda intensiva de 45 novilhas da raça Canchim em confinamento. Entre os tratamentos, o guandu participou com 55% a 65% da matéria seca das rações. Os autores concluíram que o guandu picado fornecido no cocho proporcionou custos de produção mais baixos por quilograma de ganho de peso vivo, em relação aos animais mantidos em confinamento.

Sales et al. (2020) avaliaram a viabilidade econômica da pecuária de corte em duas fazendas de 200 ha cada, com nível tecnológico avançado em pasto consorciado de capim-humidícola e amendoim-forrageiro cv. Mandobi no estado do Acre em sistema de recria de gados da raça nelore. O sistema de produção integra as atividades de recria e engorda, com compra de bezerros Nelore de alto padrão racial, com peso à desmama de 210 kg e taxa de mortalidade média de 0,5%. Não foram considerados os custos de formação dos pastos e introdução da leguminosa, por se tratar de uma área já estabelecida há mais de 8 anos. Ambos os pastos foram adubados com 100 kg ha de NPK (10-30-10). A duração do processo de cria dependeu do tipo de pasto, sendo de 21,5 meses (655 dias) para os animais que permaneceram no pasto puro de humidícola, enquanto para os animais que permaneceram no pasto consorciado foi de 13 meses (397 dias). O ganho de peso diário foi calculado em 0,369 kg e 0,622 kg para pasto solteiro e consorciado, respectivamente. A renda líquida apresentou os valores de R\$ 165.190,51 e R\$ 263.407,60 para os animais do pasto solteiro e consorciado, respectivamente. Isto representou um desempenho econômico do pasto consorciado 60% superior que o pasto solteiro. Destarte, proporcionou um retorno do empreendimento correspondente a 24% em pasto solteiro e de 38% em pastos consorciados. O custo de produção para obtenção de uma arroba de carne (CUP) foi calculado em R\$ 107,69 para os animais do pasto solteiro e R\$ 96,75 no pasto consorciado, esse fato classificou os sistemas avaliados como economicamente viáveis.

Em outro estudo de caso em Paranaíba-PR, num período de cinco anos avaliou-se pastagens de coastcross em monocultura e consorciado com amendoim-forrageiro, sem e com adubação nitrogenada (100 e 200 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio ao ano). O pasto foi mantido a mesma altura de pastejo em 17 cm de altura, pastejado com novilhas de peso inicial de 170 kg. Não houve diferença no desempenho animal, porém os tratamentos diferiram quanto à taxa de lotação, os melhores resultados foram obtidos nos tratamentos adubados. Em relação a viabilidade financeira, o tratamento consorciado apresentou melhor resultado do que quando comparado com os tratamentos adubados com nitrogênio (GOMES, 2008).

O tratamento consorciado apresentou um rendimento de R\$ 391,02 ha<sup>-1</sup>, enquanto o tratamento de coastcross + 200 kg ha<sup>-1</sup>, consórcio + 200 kg ha<sup>-1</sup> e consórcio + 100 kg ha<sup>-1</sup>, obtiveram respectivamente os rendimentos líquidos de R\$ 327,36 ha<sup>-1</sup>, 315,56 R\$ ha<sup>-1</sup> e R\$ 268,04 ha<sup>-1</sup>. Outros parâmetros econômicos como taxa de retorno e o tempo de retorno para pagar os investimentos (payback), também foram melhores no consórcio sem adubação (GOMES, 2008).

### **2.3 Espécies Forrageiras Utilizadas no Trabalho**

O gênero *Arachis* é originário da América do Sul, com cerca de 80 espécies encontradas no Brasil, Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai.

*A. pintoi* é uma leguminosa herbácea perene, de crescimento rasteiro, estolonífera, com 20 a 40 cm de altura. Possui raiz pivotante que cresce em média até cerca de 30 cm de profundidade. As folhas são alternas glabras, mas com pêlos sedosos nas margens. O caule é ramificado, cilíndrico, ligeiramente achatado com entrenós curtos e estolões que podem chegar a 1,5 cm de comprimento. A floração é indeterminada e contínua, com as inflorescências axilares em espiga. Cálice bilabiado pubescente com um lábio inferior simples e um lábio superior amplo com quatro dentes pequenos no ápice, proveniente da fusão de quatro sépalas.

A corola é formada por um estandarte de cor amarela, com asas também amarelas e delgadas. A quilha é pontiaguda, curvada e aberta ventralmente na base, muito delgada, e de cor amarelo claro.

O fruto é uma cápsula indeiscente que contém normalmente uma semente, às vezes duas e raramente três sementes que se desenvolve dentro do solo.

O amendoim forrageiro se adapta bem a altitudes desde o nível do mar até cerca de 1.800 m, e desenvolve-se bem quando a precipitação é superior a 1.200 mm. Não é muito tolerante a períodos secos prolongados, embora nas condições de cerrado. É uma leguminosa bem adaptada a solos ácidos, de baixa a média fertilidade. Tem exigência moderada em fósforo, sendo, no entanto eficiente na absorção deste elemento quando em níveis baixos no solo. Existem informações de elevada atividade de fungos micorrízicos associados ao seu sistema radicular.

Em Itabela (BA), tem se obtido boa produção de matéria seca e persistência na pastagem, com adubações anuais de 20 kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ha. Adapta-se bem em solos de textura franca, sendo medianamente tolerante ao encharcamento. Resultados preliminares indicam bom nível de reciclagem de nitrogênio em pastagens com amendoim forrageiro. Há registros da espécie fixar de 80 a 120 kg de N ha ano<sup>-1</sup> (FISHER; CRUZ, 1994).

Em Lavras (MG), um experimento de dois anos avaliando o consórcio de *A. pintoi* e *U. brizantha*, observaram que o aporte de N via FBN ou via fertilização nitrogenada promove a conservação das reservas de N no solo, a leguminosa no entanto, teria um aporte intermediário de N no solo de 109 kg de N ha ano<sup>-1</sup> quando comparado ao N fertilizante e que devido ao estabelecimento inicial lento desta leguminosa, e a introdução de uma outra leguminosa, como o *Cajanus cajan*, de estabelecimento inicial mais rápido poderia favorecer a transferência de N para o sistema (HOMEM et al., 2021).

No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) recomenda a inoculação de duas estirpes (BR 1432 e BR 1433), no entanto com base em resultados em experimentos em condições axênicas. Vale ressaltar que apesar de *Arachis pintoi* se associar simbioticamente com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* sp., existe um grau de especificidade entre estirpes. De Sá et al. (2019) em um estudo de diversidade em *A. pintoi* observaram que a maioria das estirpes nativas isoladas do solo de Itabela (BA) e de Lavras (MG) foram consideradas mais eficientes na nodulação e promoção do crescimento das plantas do que as estirpes atualmente aprovadas pelo MAPA como inoculantes para a cultura (SÁ et al., 2019).

*Grona heterocarpa* é uma leguminosa forrageira perene, originária da Ásia. A planta é um subarbusto que atinge até um metro de altura. O caule se apresenta praticamente livre de pêlos, exceto nas extremidades, onde ocorre uma pilosidade fina e sedosa. Os nós inferiores do caule, quando em contacto com o solo, enraízam-se facilmente. As folhas são trifoliadas, com folíolos ovais, sendo o terminal maior que os laterais. As flores são púrpuras ou rosa-escuro, tornando-se azuladas após a completa abertura.

*G. heterocarpa* surge como uma alternativa para a melhoria das pastagens cultivadas, devido ao seu bom valor nutritivo e capacidade de incorporar expressivas quantidades de N ao solo (100 a 160 kg ha ano<sup>-1</sup>). Seu melhor desempenho ocorre em regiões úmidas com precipitações entre 1.200 e 2.500 mm anuais. Apresenta elevada resistência à seca e ao sombreamento, porém moderada tolerância ao fogo.

*G. heterocarpa* possui grande adaptação a solos de baixa fertilidade natural, sendo capaz de atingir 80% de seu rendimento máximo de forragem sob 80% de saturação de alumínio e 2 mg P kg de solo<sup>-1</sup>, além de ser tolerante ao manganês tóxico. No entanto, o crescimento pode ser incrementado pela elevação do pH através da calagem. Em solos com baixa disponibilidade de P, responde à adubação fosfatada. É uma leguminosa promíscua, nodulando intensamente com as estirpes nativas de rizóbios, porém sua capacidade de transferência de N ao sistema solo-planta é baixa nas condições da Amazônia Ocidental e os rendimentos de forragem estão em torno de 8 a 12 e, 4 a 5 t/ha de matéria seca, respectivamente para os períodos chuvoso e seco (COSTA et al., 2001). O que contrapõem os dados obtidos por Santos et al. (2023) comparando a introdução de *G. heterocarpa* com a adubação nitrogenada de 150 kg N ha<sup>-1</sup> na produção de forragem e ganho de peso animal em pastagens de *U. brizantha* cv. *marandu* em Itabela, Bahia observaram que a inclusão da leguminosa na pastagem teve o mesmo impacto na produção de gado de corte que a adubação anual com 150 kg N ha<sup>-1</sup>.

Seus teores de tanino são relativamente elevados, quando comparados com os de outras leguminosas forrageiras tropicais, o que pode resultar em menor consumo, notadamente durante o período chuvoso. Toleram moderadamente a desfolhação e recupera-se bem quando submetido a pastejo controlado, não devendo ser rebaixado a menos de 15 cm acima do solo (COSTA, 2001).

A macrotiloma [*Macrotyloma axillare* (E. Mey.) Verdc.] é uma leguminosa herbácea (MORRIS, 2008; GIMENES et al., 2017). A partir de testes de campo em Gana realizados em contrastes de fertilidade do solo, *M. axillare* apresentou o melhor desempenho quando em cultivo solteiro ou consorciado com diferentes espécies de gramíneas (BARNES, 1995). No Brasil, o consórcio de *M. axillare* e pastagem de capim Guiné foi importante para melhorar a proteína disponível para o gado de forma semelhante à pastagem de capim puro fertilizado com N em um sistema de fertilização menos intensificado (FRANCISQUINI JUNIOR et al., 2020).

*M. axillare* é uma planta herbácea, liana, perene e volúvel, com origem na África tropical, possui excelente estabelecimento e persistência sob pastejo, rápido desenvolvimento vegetativo, ótima rebrota, principalmente após geada, boa consorciação com capins de hábitos entouceirados, bom valor nutritivo e boa produção e disseminação natural por sementes (Gov. SP, 2008).

*M. axillare* pode apresentar rendimentos de matéria seca de 10 t/ha/ano, embora, em terras férteis e com irrigação, possa chegar a 16 t/ha/ano e teor de proteína bruta entre 12 e 23% (COOK et al., 2005). No Brasil, em 2004, foi lançado o cultivar Java ou Jade, desenvolvido pelo Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, cruzando os cultivares Archer e Guatá e selecionando-os para maior produção de matéria seca e de sementes, baixos níveis de tanino nas folhas e maior resistência a pragas e doenças. Tem apresentado bons resultados em consórcio com *B. brizantha* cv. Victoria, e *Panicum maximum* cvs. Tanzânia, Mombaça e Massai (COOK et al., 2005). Guandu (*Cajanus cajan*) é uma espécie originária do continente africano e bem adaptada ao Brasil, possui amplo propósito podendo ser utilizada na alimentação humana, forragem e na adubação verde. No caso específico do potencial forrageiro, pode atingir 114 t MS ha ano<sup>-1</sup>. Sendo disponibilizado aos animais sob a forma de pastejo direto, em corte e distribuição aos animais em cocho ou em faixas. Apesar de se associar com rizóbios nativos do solo, a inoculação com rizóbios do grupo Caupi proporciona maiores rendimentos que podem proporcionar 139,6 kg de N ha<sup>-1</sup> (PEREIRA, 1985).

O gênero *Bradyrhizobium* foi considerado um microssimbionte de *Macrotyloma* spp. (TRINICK, 1982; APPUNU et al., 2011; MOHAMMED; JAISWAL; DAKORA, 2019). Mais especificamente, a espécie *M. axillare* foi capaz de nodulação com estirpes de *B. japonicum*, *B. elkanii* e *B. yaunmingense* (HASSEN; BOPAPE; TRYTSMAN, 2014).

Estudos de inoculação com diferentes estirpes de rizóbio mostraram resultados contrastantes quando inoculados em *M. axillare*, com a estirpe CB756 se destacando na

nodulação e no crescimento (HERRIDGE; ROUGHLEY, 1976), mas essa estirpe se mostrou um problema porque alguns tipos de colônia são ineficazes (BLUMENTHAL; STAPLES, 1993). Dependência excepcionalmente baixa de FBN (14%) por *M. axillare* foi encontrada através da técnica de abundância natural de  $^{15}\text{N}$  (MWANGI, 2020).

As respostas variáveis de *M. axillare* crescendo na dependência de FBN sugerem que o uso de inoculante pode ser uma estratégia de sucesso para incrementar o crescimento da planta; no entanto, poucos esforços foram feitos até o momento para procurar uma simbiose eficiente.

## 2.4 Perspectiva do Uso de Inoculantes em Leguminosas Forrageiras

Leguminosas forrageiras são capazes de se associar com uma gama de rizóbios do solo pouco efetivos. Ganhos da inoculação são evidenciados, no entanto, variações nas respostas da inoculação em condição de campo podem estar relacionadas com a alta competição com os rizóbios nativos do solo que são efetivos em nodular a planta e ineficientes em fixar nitrogênio e competem com o inoculante de estirpes elites o que contribui para a baixa difusão de inoculantes rizobianos entre os pecuaristas.

A variação nos padrões de respostas entre diferentes populações de *Bradyrhizobium* selecionadas pelos genótipos das plantas pode estar associado ao fato de espécies rizobianas apresentarem uma especificidade hospedeira principalmente em relação aos tipos de exsudatos liberados para atração dos microssimbiontes (ex., flavonóides) e no caso das espécies não-rizobianas pode estar relacionado com a capacidade destas bactérias de infectar as raízes das plantas durante o cordão de infecção ou entrarem por cicatrizes na raiz podendo ter um efeito benéfico, neutro ou negativo. No entanto, geralmente as leguminosas apresentam compatibilidade com um grupo restrito de rizóbios, mediante mecanismos de seleção tanto pela planta quanto pelo rizóbio.

Bancos ativos de germoplasma de plantas poderiam incorporar em seus programas de melhoramento, a seleção de genótipos mais responsivos a FBN. Esta técnica foi fundamental para o êxito no programa de melhoramento de genótipos de soja para o cerrado atrelado à inoculação com estirpes de rizóbios adaptados a estas condições (HUNGRIA; MENDES, 2015; RIGG et al., 2021). Este tipo de estratégia pode ser vantajoso em sistemas de cultivos mistos (com duas ou mais espécies vegetais) sendo cultivadas ao mesmo tempo ou em locais com histórico de cultivo com espécies rizobianas competitivas, mas pouco eficientes já estabelecidas.

A seleção de um inoculante rizobiano que pudesse ser recomendado para uma ampla faixa de leguminosas assim como já é realizado na Austrália, poderia contribuir para o êxito da tecnologia no Brasil.

Rigg et al. (2021) em um estudo inédito com leguminosas forrageiras perenes, avaliaram a compatibilidade cruzada de 5 estirpes utilizadas como inoculantes comerciais recomendadas para leguminosas forrageiras em cultivares novas ou já estabelecidas na Austrália.

Os autores concluíram que as estirpes recomendadas como inoculante possuem a capacidade de nodular mais de uma espécie forrageira. As respostas variaram de acordo com a cultivar e a espécie analisada, no entanto, 3 estirpes utilizadas (CC283b de *R. leguminosarum* bv. trifolii, TA1 e WSM1325 de *R. leguminosarum* bv. trifolii) apresentaram uma ampla resposta entre as espécies analisadas.

No entanto, a quantidade de N fixado foi menor do que as estirpes recomendadas para as espécies, até mesmo variando a nível de cultivar dentro de uma mesma espécie. Foram apresentados padrões de especificidade para as leguminosas avaliadas, até mesmo a nível de cultivar, sendo que *Medicago sativa* cultivar Lucerne 7 foi restrita a estirpe recomendada como inoculante, enquanto *Medicago sativa* cultivar Lucerne Titan 9 apresentou abrangência hospedeira.

Thral et al. (2011) examinaram a diferença entre estirpes simpátricas (isoladas e inoculadas no mesmo hospedeiro) ou alopátricas (isoladas de hospedeiros diferentes e testados em outro hospedeiro) oriundas dos mesmos locais com 8 leguminosas nativas da Austrália. De acordo com o estudo realizado, não existe um padrão de resposta entre as leguminosas em relação a eficácia simbiótica entre estirpes alopátricas ou simpátricas, no entanto, existem leguminosas generalistas que se beneficiam da simbiose de ambas as estirpes (alopátricas ou simpátricas), apenas de estirpes simpátricas ou apenas de estirpes alopátricas. Portanto, para a seleção de estirpes rizobianas, inicialmente podem ser realizados estudos sobre o comportamento das leguminosas avaliadas em relação a eficácia simbiótica.

Além da seleção de rizóbios, os resultados promissores da coinoculação apresentados em leguminosas de interesse agrícola, como feijão-comum (HUNGRIA et al., 2013; JESUS et al., 2018) e da soja (HUNGRIA, 2011; HUNGRIA; MENNA; DELAMUTA, 2015) podem ser replicados para as leguminosas forrageiras, entretanto, estudos devem ser realizados para atestar a viabilidade desta prática.

As estirpes bacterianas quando coinoculadas podem resultar numa melhoria da simbiose, como estímulo da nodulação através da produção de flavonóides e isoflavonóides (BURDMAN; KIGEL; OKON, 1997), aumento da resistência a condições adversas como seca, salinidade e compostos tóxicos (BASHAN; DE-BASHAN, 2010); além de serem capazes de melhorar a saúde da planta e/ou aumentar a produtividade quando coinoculadas com a estirpe rizobiana (DE LA FUENTE et al., 2002; ANNAPURNA et al., 2013; TARIQ et al., 2014).

## **2.5 Abundância Natural de $^{15}\text{N}$ como Forma de Quantificação do N no Sistema Solo-Planta**

Para que se possa avaliar com precisão a contribuição da fixação biológica de nitrogênio é necessário o uso de técnicas específicas. A composição do ar atmosférico apresenta aproximadamente 78% de N na forma elementar ( $\text{N}_2$ ) e disponível indiretamente para as plantas (UNKOVICH et al., 2008). Este N presente no ar atmosférico é composto por dois isótopos, estáveis, com abundância constante. O isótopo  $^{14}\text{N}$  representa 99,6337% dos átomos de N, e o isótopo  $^{15}\text{N}$ , 0,3663% (MARIOTTI, 1983). A diferença na massa atômica dos dois isótopos ( $^{14}\text{N}$  e  $^{15}\text{N}$ ) é um fator que leva à discriminação isotópica durante as transformações envolvidas na dinâmica do N no sistema solo-planta, tornando o solo e os tecidos dos vegetais que suprem suas necessidades nitrogenadas do N disponível no solo, levemente enriquecidos com o isótopo  $^{15}\text{N}$ , em comparação à abundância natural deste isótopo no ar atmosférico (SHEARER; KOHL, 1989).

No entanto, estes enriquecimentos ocorrem em valores extremamente pequenos, sendo convencionalmente expresos em unidas delta  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ). Neste caso, o ar é a referência, e por isso possui zero delta  $^{15}\text{N}$ . Espécies vegetais capazes de suprir sua nutrição nitrogenada com o N do ar atmosférico apresentarão valores de delta  $^{15}\text{N}$  próximos de zero, ou seja, a abundância natural do isótopo  $^{15}\text{N}$  presente no tecido destas plantas vai ser próxima da abundância de  $^{15}\text{N}$  do ar, ou 0,3663% atom  $^{15}\text{N}$ . De modo contrário, espécies vegetais não fixadoras ou de baixa eficiência para a FBN apresentarão valores de delta  $^{15}\text{N}$  próximos aos do solo (URQUIAGA; CRUZ; BODDEY, 1992; URQUIAGA et al., 2012).

A técnica da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  visa quantificar o N derivado do processo de FBN, assumindo a premissa básica de que as plantas fixadoras e não fixadoras absorvam N do solo com a mesma relação  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  no tempo e em profundidade (SHEARER; KOHL, 1989).

O N derivado da FBN é calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$Ndfa = \frac{(\delta^{15}N_{PTNF} - \delta^{15}N_{PTF})}{((\delta^{15}N_{PTNF}) - B)} \times 100$$

Onde %Ndfa é a porcentagem de N derivado da FBN,  $\delta^{15}N_{PTNF}$ , o valor de delta  $^{15}N$  do solo obtido através da planta testemunha utilizada como referência. E  $\delta^{15}N_{PTF}$  o valor de delta  $^{15}N$  da espécie forrageira avaliada.

B, o valor do fracionamento isotópico de  $^{15}N$  ao se considerar somente a parte aérea da planta, sendo obtido a partir da fórmula:

$$\text{Valor B} = \frac{(N_{PA} \times \delta^{15}N_{PA}) - (N_S \times \delta^{15}N_S)}{(N_{PA} - N_S)}$$

Onde,  $N_{PA}$  e  $N_S$  são, respectivamente, o total de N na parte aérea e na semente;  $\delta^{15}N_{PA}$  e  $\delta^{15}N_S$  são, respectivamente, os valores de abundância natural de  $^{15}N$  na parte aérea e na semente. O N da semente corresponde a quantidade de N da semente alocada na parte aérea, algo difícil de estimar com precisão, mas que se aceita como sendo 50% do total de N da semente (OKITO et al., 2004).

### **3. CAPÍTULO I**

## **CONTRIBUIÇÃO DA FBN PARA A NUTRIÇÃO DE LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS NÃO-INOCULADAS COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS, PRESENTES EM PASTAGENS**

### 3.1 RESUMO

Sistemas consorciados com leguminosas e gramíneas podem contribuir para a reforma de pastagens degradadas através do aporte de N ao sistema via FBN, e a técnica da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  pode ser utilizada para mensurar a quantidade de nitrogênio aportado aos sistemas. Para a determinação do N acumulado *via* FBN é necessário a determinação do valor B, o valor do fracionamento isotópico de  $^{15}\text{N}$  ao se considerar somente a parte aérea da planta. Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar o valor B para *Grona heterocarpa* cv. Itabela e *Macrotyloma axillare* cv. Java e avaliar o potencial de *A. pintoii* e *G. heterocarpa* para consórcios já estabelecidos em pastagens existentes ao longo do bioma Mata Atlântica. Os experimentos para determinação do valor B foram conduzidos em casa-de-vegetação em condição estéril utilizando vaso Leonard com 250 mL de solução nutritiva com reposição semanal, sem adição de N. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com 4 repetições. Os tratamentos foram: estirpes rizobianas recomendadas pelo MAPA para as espécies utilizadas, estirpes de bactérias rizobianas oriundas da coleção de culturas - CRB e um consórcio destas bactérias rizobianas isoladas de nódulos radiculares em Itabela, BA e Seropédica, RJ e um tratamento controle, sem inoculação, como forma de comparação. Os experimentos foram coletados e as variáveis MSPA, MSR, NN e MSN foram determinadas. Para a avaliação da FBN em campo, foram realizadas 4 coletas em consórcios já estabelecidos em Itabela, BA no período de um ano com o intuito de mensurar a contribuição da FBN para o aporte de N em pastagens consorciadas com gramíneas e *Grona heterocarpa* ou *Arachis pintoii* utilizando uma amostragem aleatória simples com 6 repetições por área, cada repetição consistiu em amostras de 1 m x 1 m sendo determinada a biomassa disponível no momento da coleta, a proporção de leguminosas, gramíneas e espécies espontâneas dentro do quadrado. Além disso, foram coletadas espécies testemunhas (não-fixadoras) nos locais amostrados. Foram ainda coletados amostras de terra com o auxílio de um trado holandês na profundidade de 0-20 cm com o intuito de avaliar a fertilidade. A massa seca das plantas (parte aérea, raiz e nódulos) foi processada para a determinação do N total e  $^{15}\text{N}$ . O estudo da inoculação das estirpes oriundas do isolamento apresentou incrementos comparáveis às estirpes já recomendadas pelo MAPA para estas leguminosas e os valores B da parte aérea destas leguminosas nas condições em que as plantas absorveram apenas o nitrogênio oriundo da FBN foram de -1,17 para *M. axillare*, -1,62 para *Grona heterocarpa*. Dos consórcios avaliados em campo o valor de FBN variou em relação a espécie de leguminosa, estação do ano e fertilidade do solo. O consórcio de Mombaça e *G. heterocarpa* apresentou maiores contribuições da leguminosa.

**Palavras-chave:** Valor B. Abundância Natural de  $^{15}\text{N}$ . Pastagens Consorciadas. Mata Atlântica. Rizóbios indígenas.

### 3.2 ABSTRACT

Systems intercropped with legumes and grasses can contribute to the reform of degraded pastures through the supply of N to the system *via* NBF, and the  $^{15}\text{N}$  natural abundance technique can be used to measure the amount of nitrogen supplied to the systems. To determine the accumulated N *via* NBF, it is necessary to determine the B value, the isotopic fractionation value of  $^{15}\text{N}$  when considering only the shoots of the plant. Therefore, this work aimed to determine the B value for *Grona heterocarpa* cv. Itabela and *Macrotyloma axillare* cv. Java and evaluate the potential of *A. pintoii* and *G. heterocarpa* for consortia already established in existing pastures throughout the Atlantic Forest biome. The experiments to determine the B value were carried out in a greenhouse under sterile conditions using a Leonard pot with 250 mL of nutrient solution with weekly replacement, without the addition of N. The experimental design was in randomized blocks with 4 replications. The treatments were: rhizobial strains recommended by MAPA for the species used, strains of rhizobial bacteria from the CRB culture collection and a consortium of these rhizobial bacteria isolated from root nodules in Itabela, BA and Seropédica, RJ and a control treatment, without inoculation, as comparison. The experiments were collected and the variables MSPA, MSR, NN and MSN were determined. To evaluate NBF in the field, 4 collections were carried out in consortia already established in Itabela, BA over a period of one year with the aim of measuring the contribution of NBF to the N supply in pastures intercropped with grasses and *Grona heterocarpa* or *Arachis pintoii* using simple random sampling with 6 replications per area, each replication consisted of a 1 m x 1 m, determining the biomass available at the time of collection, the proportion of legumes, grasses and species spontaneous within the square. In addition, control (non-fixing) species were collected in the sampled locations. Soil samples were also collected with the aid of a Dutch auger at a depth of 0-20 cm in order to evaluate soil fertility. The dry mass of plants (aerial part, roots and nodules) was processed to determine total N and  $^{15}\text{N}$ . The study of the inoculation of strains from isolation showed increases comparable to the strains already recommended by MAPA for these legumes and the B values of the legume shoots under conditions in which the plants absorbed only nitrogen from NBF were -1.17 for *M. axillare*, -1.62 for *Grona heterocarpa*. Of the consortia evaluated in the field, the NBF value varied in relation to the legume species, season and soil fertility. The consortium of Mombaça and *G. heterocarpa* presented greater contributions from the legume.

**Keywords:** Value B. Natural Abundance of  $^{15}\text{N}$ . Intercropped Pastures. Atlantic forest. Indigenous rhizobia.

### 3.3 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca mundialmente na produção de carne e leite, porém a maior parte do rebanho é conduzida em sistema de produção extensivo. São pastagens que em média apresentam lotação animal inferior a 1 unidade animal (1 UA = 450 kg peso vivo) ha<sup>-1</sup>, o que se explica, principalmente, pelo descontrole na lotação animal frente a disponibilidade de forragem, e a subfertilização (CARDOSO et al., 2020). Em consequência, mais de 100 milhões de hectares de pastagens se encontram em degradação moderada a severa (LAPIG-UFG, 2023).

Oliveira et al. (2001) demonstraram que o vigor das pastagens pode ser melhorado fortemente com a fertilização nitrogenada, sendo este o nutriente mais limitante em pastagens em degradação, seguido do fósforo e potássio. De fato, o fertilizante nitrogenado é raramente utilizado em sistemas extensivos. Combinadas com um manejo animal baseado na disponibilidade de forragem, doses de N da ordem de 90 kg ha<sup>-1</sup> já permitiriam elevar fortemente a produtividade, sem decuidar da fertilização com P e K, e calagem, porém o alto custo dos fertilizantes é um limitante (CARDOSO et al., 2020).

Uma solução muito conhecida, porém, raramente utilizada para incrementar a entrada de N em sistemas de pastagens é a utilização de leguminosas forrageiras. Quando associadas a pastagens, podem aumentar a oferta de nitrogênio e a produtividade animal, sem a necessidade de adubação nitrogenada (CANTARUTTI et al., 2002; PEREIRA et al., 2020).

Espécies de leguminosas como *Grona heterocarpa* (desmódio) e *Arachis pintoi* (amendoim forrageiro) apresentam alto potencial para consórcio em pastagens por possuírem hábito de crescimento estolonífero que permite a propagação tanto por sementes quanto por estolão, ou por rizoma, e por serem mais adaptadas às condições de pastoreio (TAMELE et al., 2020). Outra leguminosa com alto potencial para uso em pastagens é *Macrotyloma axillare* com propagação por semente, hábito volúvel, boa rusticidade e produção de biomassa. Resultados recentes em ambiente do Bioma Mata Atlântica mostram que pastagens fertilizadas com doses de N entre 120 a 150 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> ou consorciadas com amendoim forrageiro (PEREIRA et al., 2020) e desmódio (SANTOS et al., 2023) apresentam desempenho semelhante, sendo possível dispensar o uso do N se o consórcio com essas leguminosas for adotado.

A substituição da fertilização nitrogenada da pastagem pelo estabelecimento de consórcios com leguminosas requer maiores cuidados no manejo, e, tão importante quanto, garantir eficiência no processo de fixação biológica de N<sub>2</sub> (FBN) associado à leguminosa. Nestas condições, a leguminosa funciona como uma fonte de proteína para o animal, e também deve garantir o suprimento de uma quantidade de N anual que seja pelo menos igual a quantidade exportada com a produção animal (carne e leite) somada às perdas de N que ocorrem no sistema, para evitar que a pastagem degrade (HOMEM et al., 2021).

Muitas dessas leguminosas conseguem estabelecer simbioses com estirpes de rizóbio presentes no solo, porém os poucos resultados existentes indicam que simbioses ineficientes podem ocorrer (ALVES et al., 2000), e que a seleção de estirpes pode intensificar a FBN para a leguminosa (DE SÁ et al. 2019). Além disso, a eficiência da FBN no campo é frequentemente mais baixa que em condições controladas, como, em casa-de-vegetação, o que pode ser explicado por limitações como períodos de estiagem, baixa fertilidade, pastejo intensivo, dentre outros, e também pelas estirpes nativas do solo apresentarem baixa eficiência quando comparadas a inoculação de estirpes elite de rizóbio. Não obstante, a rara utilização de consórcios por questões culturais e pela falta de sementes no mercado desmotiva o desenvolvimento de inoculantes com estirpes de rizóbio para as diferentes espécies de leguminosas.

Considerando que o aporte de N ao sistema depende não só do manejo para manter uma biomassa significativa da leguminosa, mas também da associação eficiente com bactérias

diazotróficas e uma alta contribuição de FBN nas áreas onde a leguminosa está presente, é importante quantificar a FBN, ou pelo menos ter indicações de sua magnitude, o que requer técnicas analíticas avançadas.

A técnica da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  não necessita da utilização de fertilizantes enriquecidos com este isótopo, e é quantificada em função da razão natural entre os isótopos  $^{15}\text{N}$  e  $^{14}\text{N}$ , considerando-se as diferenças dessa razão entre o ar atmosférico e o solo. O ar atmosférico apresenta uma concentração relativamente constante de 0,3663% de  $^{15}\text{N}$ , sendo considerado uma referência para a técnica. Em geral, os solos apresentam uma razão isotópica  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  maior que a do ar, devido a dinâmica do N entre formas orgânicas, minerais e voláteis. Como as diferenças são muito pequenas, convencionou-se expressar o valor de abundância natural de  $^{15}\text{N}$  em unidades delta que é igual a mil vezes o resultado da diferença entre a razão isotópica de determinado compartimento e a razão isotópica da referência (ar), dividida pela razão da referência. Assim, o ar, por ser a referência, apresenta 0 delta, e o solo, por acumular mais  $^{15}\text{N}$ , apresenta valores de delta, em geral, positivos que podem alcançar naturalmente valores da ordem de 15 deltas (BODDEY et al., 2004). Logo, plantas que crescem com dependência da FBN são menos enriquecidas naturalmente em  $^{15}\text{N}$  já que o N derivado do ar dilui o N absorvido do solo.

Uma situação que dificulta quantificar a FBN é o fracionamento isotópico que ocorre entre a parte aérea e as estruturas radiculares das plantas. Os nódulos, por exemplo, retêm o  $^{15}\text{N}$  quando o N é transferido para as raízes e daí para a parte aérea. Como a parte aérea das plantas é amostrada para quantificar a FBN, é necessário realizar uma correção. O valor B representa o fator de fracionamento isotópico de  $^{15}\text{N}$  na transferência de N-FBN para a parte aérea da leguminosa, que é utilizado na quantificação da contribuição do FBN para uma determinada espécie de leguminosa (UNKOVICH et al., 2008). Este valor pode variar em função da espécie, genótipo ou da estirpe bacteriana associada, e espera-se que seja suficientemente robusto para a espécie de leguminosa, mesmo que mais de uma espécie de rizóbio possa realizar simbiose com estas plantas. Uma estratégia a ser utilizada visando um valor B de maior robustez é o crescimento destas plantas em meio de crescimento sem N (UNKOVICH et al., 2008).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi aprimorar a técnica de abundância natural de  $^{15}\text{N}$  para quantificar a FBN em três leguminosas de alto potencial para formação de pastagens consorciadas, por meio da determinação do valor B, e aplicar a técnica para avaliar a dependência das leguminosas pela FBN em consórcios estabelecidos em pastagens, condição em que o processo poderia estar ocorrendo pela nodulação com bactérias nativas do solo.

## 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.4.1 Determinação do Valor B

Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, RJ. Foram utilizados vasos de Leonard (VINCENT, 1970), com substrato de areia e perlita na proporção 1:1 (v/v). No início do experimento, foram adicionados 250 mL de água destilada autoclavada.

Três conjuntos de vasos foram utilizados, um para a leguminosa *Grona heterocarpa* cv Itabela (desmódio), outro para *Macrotyloma axillare* cv Java (macrotiloma), e um terceiro para *Arachis pintoii* cv Mandobi. Foram feitas duas tentativas para crescer *A. pintoii* nos vasos de Leonard, porém sem sucesso. Em uma terceira tentativa houve sucesso, mas as análises indicaram uma possível contaminação dos vasos. Por isso, serão relatados apenas os experimentos com desmódio e macrotiloma.

Para o plantio, as sementes de ambas leguminosas foram imersas por 1 min em álcool 70%, enxaguadas 2 vezes em água destilada e imersas em hipoclorito de sódio por 1 min, e em seguida foram submetidas a 10 lavagens sucessivas com água destilada estéril para a desinfestação. Foram semeadas quatro sementes por vaso com posterior desbaste, deixando-se apenas 2 plantas por vaso.

Com a finalidade de testar a capacidade da nodulação em condições naturais foi utilizado um tratamento contendo um consórcio microbiano composto por isolados bacterianos em áreas cultivadas com macrotiloma em Seropédica, RJ.

O tratamento de inoculação para o experimento com plantas de desmódio compreendeu o uso das estirpes BR 2217, BR 2203 oriundas da coleção de culturas e da estirpe 3D oriunda do isolamento realizado conforme o Capítulo II desta tese) de *Bradyrhizobium* sp. Para macrotiloma, foram usadas as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. BR 3101, BR 14193, BR 14182, BR 14219 e BR 14173 e um tratamento com a mistura destas estirpes. Um tratamento controle, sem inoculação, foi incluído para cada leguminosa.

O tratamento de inoculação foi realizado no vaso. Cada plântula foi inoculada com 0,5 ml de suspensão bacteriana das estirpes listadas, sendo que o tratamento de referência foi com o uso das estirpes recomendadas pelo MAPA, BR 2217 para desmódio, e a estirpe BR 3101 para macrotiloma.

Uma colônia pura de cada estirpe crescida em YMA com vermelho congo foi repicada com o auxílio de uma alça de platina para o meio YM líquido sem indicador e incubadas em shaker a 30° C com agitação constante de 160 rpm, por 6 dias.

Uma semana após a germinação, a água contida nos vasos foi substituída pela solução de Norris (YATES et al., 2016) com um quarto da concentração de sais recomendada, sem adição de N. A força da solução (concentração de sais) foi aumentando gradualmente a cada semana, metade da concentração na segunda semana e a concentração total a partir da terceira semana.

As plantas foram coletadas aos 60 dias após o plantio, separando-se a parte aérea da raiz e nódulos. Em seguida, a parte aérea e as raízes foram secas em estufa a 65° C. No caso dos nódulos foram desidratados em sílica gel até a estabilização do peso para a determinação da matéria seca. Após a secagem, as amostras foram finamente moídas em moinho tipo Wiley (peneiras de 2 mm), e posteriormente em moinho de rolos similar ao descrito por Arnold e Schepers (2004).

As análises de N total nos tecidos, assim como as de abundância natural de <sup>15</sup>N, foram realizadas em um analisador elementar CHN (ECS 4010, Costech, USA) acoplado a espectrômetro de massas de razão isotópica (Delta V, Thermo Scientific, Alemanha).

O valor B que é a abundância natural de  $^{15}\text{N}$  do material da parte aérea da leguminosa, e indica o grau de fracionamento isotópico decorrente das reações de translocação interna do N derivado da FBN foi calculado pela fórmula:

$$\text{Valor } B = \frac{(N_{PA} \times \delta^{15}N_{PA}) - (N_S \times \delta^{15}N_S)}{(N_{PA} - N_S)}$$

Onde,  $N_{PA}$  e  $N_S$  são, respectivamente, o total de N na parte aérea e na semente;  $\delta^{15}N_{PA}$  e  $\delta^{15}N_S$  são, respectivamente, os valores de abundância natural de  $^{15}\text{N}$  na parte aérea e na semente. Assumiu-se que a quantidade de N da semente não utilizada pela planta foi desprezível.

### 3.4.2 Contribuição da FBN em pastagens consorciadas com leguminosas forrageiras em propriedades rurais de Itabela, BA

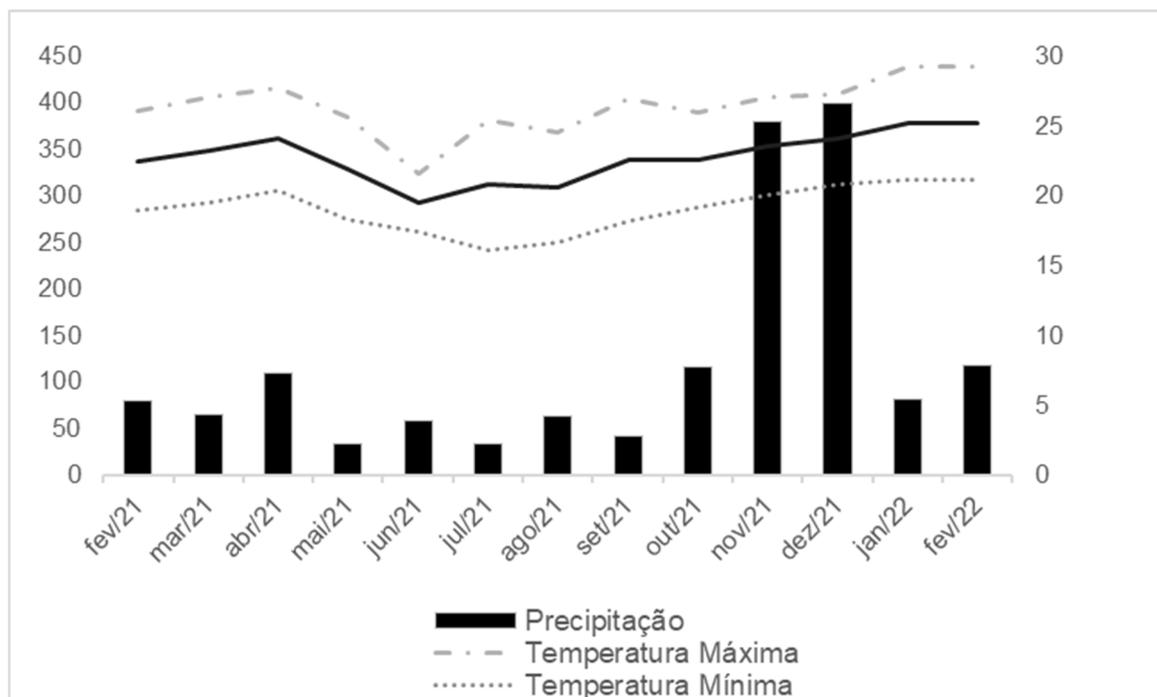
A dependência das leguminosas forrageiras pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) foi estimada aplicando-se a técnica da abundância natural de  $^{15}\text{N}$ . Na aplicação desta técnica, o valor de delta  $^{15}\text{N}$  do N disponível do solo foi determinado por meio da análise de plantas de espécies consideradas como referência, ou seja, espécies não leguminosas crescendo espontaneamente na área e que conhecidamente não recebem contribuição significativa da FBN (UNKOVICH et al., 2008).

As amostragens foram conduzidas em propriedades rurais de Itabela, BA e nas áreas experimentais da Estação de Zootecnia do Extremo Sul (Essul) da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - CEPLAC, localizada em Itabela-Bahia ( $16^{\circ}39'S$  e  $39^{\circ}30'O$ ) (Tabela 1). Não foram encontradas áreas experimentais ou comerciais com a leguminosa macrotiloma, exceto a área experimental da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, cuja avaliação da dependência das plantas pela FBN fazia parte de uma dissertação conduzida no mesmo período (BORRÉ, 2023).

**Tabela 1.** Identificação dos consórcios amostrados em Itabela, BA.

Local	Consórcio	Gramínea	Leguminosa
1	Essul, Ceplac, exp. Tássia	<i>Urochloa brizantha</i>	<i>A. pintoi</i>
2	Fazenda Sul Bahia	<i>U. brizantha</i>	<i>G. heterocarpa</i>
3	Fazenda Sul Bahia	<i>U. brizantha</i>	<i>A. pintoi</i>
4	Essul, Ceplac	<i>Megathyrsus maximum cv. Mombaça</i>	<i>G. heterocarpa</i>
5	Essul, Ceplac, próx. escritório	<i>U. brizantha cv. Marandu</i>	<i>A. pintoi</i>
6	Fazenda Pinguim	<i>U. brizantha</i>	<i>G. heterocarpa</i>
7	Essul, Ceplac, piquete 1	<i>U. humidicola cv. Llanero</i>	<i>A. pintoi</i>
8	Essul, Ceplac, José Ribeiro	<i>U. humidicola</i>	<i>G. heterocarpa</i>
9	Essul, Ceplac, próx. dormitório	<i>U. brizantha cv. Piatã</i>	<i>A. pintoi</i>
10	Fazenda Arizona, Eucalipto	<i>U. brizantha cv. Marandu</i>	<i>G. heterocarpa</i>
11	Fazenda Palmares, Eucalipto	<i>U. brizantha</i>	<i>G. heterocarpa</i>
12	Fazenda Palmares, consórcio	<i>U. brizantha</i>	<i>G. heterocarpa</i>

As áreas das pastagens de *Urochloa* spp. consorciadas com *A. pintoii* ou com *G. heterocarpa* encontram-se no bioma Mata Atlântica e o clima local é uma transição entre os tipos Af e Am, segundo a classificação de Köppen, com precipitação anual de 1311 mm e temperatura média de 25°C, sem estação seca definida (Figura 1).



**Figura 1.** Temperatura e precipitação mensal durante as coletas em Itabela, BA.

Predominam os solos dos tipos Latossolo Amarelo distrocoeso e Argissolo Amarelo distrocoeso, com textura arenosa na superfície e com o teor de argila aumentando ao longo do perfil, sendo ácidos e de baixa fertilidade natural, e o fósforo é o elemento mais limitante (REZENDE et al., 2021).

As coletas foram feitas em pastagens de *Megathyrsus maximum* ou de *Urochloa* spp. consorciadas com *A. pintoii* ou *G. heterocarpa*. Foram realizadas 4 coletas ao longo do ano: abril/21 (Outono), julho/21 (Inverno), setembro/2021 (Primavera) e fevereiro/22 (Verão) nas áreas comerciais, e adicionalmente em áreas da estação experimental ESSUL da Ceplac em Itabela, BA.

Foi realizada uma amostragem das plantas de leguminosas (desmódio ou amendoim-forrageiro), gramíneas e outras espécies espontâneas quando presentes, totalizando 6 repetições em cada consórcio. A área amostrada foi estabelecida com um quadrado de 1 m x 1 m. Após a coleta do material vegetal, 2 amostras simples de solo na profundidade de 0 a 20 cm foram coletadas dentro de cada quadrado, totalizando 12 amostras simples com o auxílio de um trado holandês e acondicionadas em sacos plásticos para compor uma amostra composta e posterior determinação da análise química de terra segundo Teixeira et al. (2017).

Adicionalmente, foram coletadas nas pastagens pelo menos duas espécies consideradas não-fixadoras de N<sub>2</sub> existentes na área.

As espécies selecionadas como plantas referência foram a vassourinha-de-botão (*Spermacoce verticillata*), margaridão (*Sphagneticola trilobata*), tiririca (*Cyperus rotundus*), malva-branca (*Sida cordifolia*) encontrada na área que foram amostradas de forma composta (7 plantas), segundo a metodologia descrita em Unkovich et al. (2008). Nessas propriedades, além da coleta das plantas, foi avaliado o percentual da leguminosa na matéria seca disponível.

Após a coleta, o material foi encaminhado para a Estação ESSUL da Ceplac onde teve a massa fresca das plantas determinada e, após 72h de secagem em estufa, a determinação da massa seca. Foram determinadas a biomassa seca disponível e o percentual de leguminosas na pastagem (%). O material foi pré-moído em moinho tipo Wiley (peneiras de 2 mm) e posteriormente levadas para moinho de rolagem, por dois dias, até a pulverização (ARNOLD; SCHEPERS, 2004). Com as amostras processadas, determinou-se o conteúdo de N e a abundância natural de  $^{15}\text{N}$  para estimar a quantidade total de N aportada pela leguminosa derivada da FBN (SHEARER; KOHL, 1989).

A abundância natural de  $^{15}\text{N}$  foi determinada usando um espectrômetro de massa de razão isotópica de fluxo contínuo (Delta V Advantage acoplado a um analisador elementar Flash 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) para análise do teor de N, análises realizadas no Laboratório “John M. Day” de Isótopos Estáveis da Embrapa Agrobiologia.

A contribuição da FBN foi estimada empregando-se a fórmula (SHEARER; KOHL, 1989):

$$\%Ndfa = \frac{(\delta^{15}\text{N}_{PTNF} - \delta^{15}\text{N}_{PTF})}{((\delta^{15}\text{N}_{PTNF}) - B)} \times 100$$

Onde %Ndfa é a porcentagem de N derivado da FBN;  $\delta^{15}\text{N}_{PTNF}$ , o valor de delta  $^{15}\text{N}$  do solo obtido através da planta testemunha utilizada como referência; e  $\delta^{15}\text{N}_{PTF}$ , o valor de delta  $^{15}\text{N}$  da espécie forrageira avaliada. A letra B é o valor do fracionamento isotópico de  $^{15}\text{N}$  ao se considerar somente a parte aérea da planta (dados obtidos do estudo preliminar para *G. heterocarpa*) e conforme sugerido por Unkovich et al. (2008) para *A.pintoi*.

Por se tratar de uma pesquisa exploratória e seguir as orientações metodológicas que contemplam estudos de casos múltiplos, ou seja, as áreas escolhidas foram diferenciadas pelos sistemas de produção adotados, isso implica em não generalização de seus resultados, porém servem como suporte e ferramenta para outros estudos, já que não foram considerados “unidades de amostragem” (FERREIRA; NEUMANN; HOFFMANN, 2013). Diante disso, em cada uma das áreas avaliadas, foi realizada uma estatística descritiva de todos os resultados, obtendo-se a média e desvio padrão.

As variáveis porcentagem de N derivado da FBN (% FBN) e o resultado da análise química da terra foram usadas para uma análise de Componentes Principais (PCA) visando identificar relações que pudessem explicar as variações de % FBN determinadas ao longo do ano (primavera, verão, outono e inverno). O PCA foi calculado com a matriz de correlação, pois as variáveis foram expressas em diferentes unidades e apresentadas na forma de setas no gráfico do PCA.

### 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.5.1 Experimento Valor B: *Grona heterocarpa* e *Macrotyloma axillare*

As plantas de desmódio quando inoculadas apresentaram incrementos positivos na acumulação de biomassa, sendo que as estirpes 3D e BR 2203 foram superiores a estirpe BR 2217, recomendada como inoculante para esta espécie, exceto para a nodulação que foi superior (Tabela 2). Esta leguminosa forma nódulos muito pequenos, o que explica os baixos valores de massa seca de nódulos.

São poucos os estudos que avaliaram o desempenho de desmódio em condições de casa-de-vegetação, e em geral as plantas passam por cortes antes da avaliação de produção e nodulação, o que cria uma diferença importante em relação ao presente estudo. Os resultados encontrados por Alves et al. (2000), crescendo o desmódio em areia e solução nutritiva, mostraram uma massa seca de nódulos que chegou a 120 mg por planta aos 56 dias de crescimento, porém contados após um corte inicial quando as plantas estavam estabelecidas. Segundo esses autores, a produção de matéria seca de parte aérea ultrapassou 2g por planta. Em outro estudo, com plantas que sofreram 4 ou 8 cortes a cada 56 ou 28 dias, respectivamente, o número médio de nódulos por planta foi de 88, em média, ressaltando-se que, neste caso, o estudo foi conduzido em solo (SILVA et al., 2010).

No presente estudo, as plantas não inoculadas não nodularam, e apresentaram os mais baixos resultados de massa seca de parte aérea e de raízes, embora não tenham sido diferentes do tratamento com inoculação com a estirpe BR 2217 (SEMIA 6208). Esses resultados sugerem baixa eficiência da estirpe BR 2217, o que é reforçado pela pequena acumulação de N na parte aérea da planta, mais de 10 vezes inferior aos tratamentos com inoculação com as estirpes 3D e BR 2203. Os trabalhos realizados por Alves et al. (2000) e Silva et al. (2010) utilizaram as estirpes BR 2212 (SEMIA 6208) e BR 2214 (SEMIA 6209) e obtiveram resultados satisfatórios da inoculação das estirpes recomendadas pelo MAPA. É importante ressaltar o baixo desempenho, no presente estudo, das plantas inoculadas com a estirpe BR 2217 recomendada pelo MAPA para desmódio, indicando que o maior número de nódulos não repercutiu em atividade de FBN expressiva, ao contrário dos demais tratamentos inoculados.

**Tabela 2.** Massa fresca de parte aérea (MFPA), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), massa seca de nódulos (MSN) e número de nódulos (NN) em plantas de *Grona heterocarpa* cv. Itabela inoculada com diferentes estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio.

Tratamentos	MSPA	NPA	MSR	mg planta <sup>-1</sup>	
				MSN	NN
Controle	21,5 b	11,67b	26,75 ab	-	-
BR 2203	75 a	119,53 a	49,5 a	<0,001 b	16,5 b
3D	66 a	142,87 a	47 a	<0,001 b	9,25 bc
BR 2217	38 ab	51,66 b	20,5 b	5 a	36,25 a
Média	40	81,43	35	1,67	15,56
CV (%)	51	51	39	40	43

\*Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de probabilidade. Dados médios de 4 repetições.

Em geral, a parte aérea das plantas apresentou valores negativos de abundância natural de <sup>15</sup>N (Tabela 3), o que é esperado como resultado de um processo gradativo de discriminação isotópica na medida em que o N é transferido dos nódulos e raízes para a parte aérea

(UNKOVICH et al., 2008). De fato, as raízes apresentaram valores de delta  $^{15}\text{N}$  positivos, indicando uma acumulação do isótopo mais pesado na parte subterrânea. Uma exceção foi o tratamento controle que apresentou valores negativos também nas raízes, embora menos negativos do que na parte aérea, reforçando o que já foi demonstrado por outros autores (OKITO et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2008; PAUFERRO et al., 2010) que a transferência do N entre os órgãos da planta também passa por discriminação isotópica.

As plantas inoculadas com as estirpes 3D e BR 2203 apresentaram as mais altas concentrações de N na parte aérea e maior acumulação de N nesses tecidos, apesar de não terem sido analisados estatisticamente, devido as análises não serem realizadas em repetições verdadeiras (apenas réplicas biológicas) em comparação com os tratamentos controle e inoculado com a estirpe BR 2217, indicando que os valores de delta  $^{15}\text{N}$  negativos na parte aérea referem-se a uma contribuição de N oriundo do ar (Tabela 3).

O valor B médio da parte aérea foi em média de  $-1,62 \pm 0,38$  ‰, e refere-se à discriminação do isótopo  $^{15}\text{N}$  entre a parte subterrânea e a parte aérea das plantas de desmódio, devendo ser utilizado na equação para calcular a %FBN, pois não existem outros estudos que tenham determinado o valor B para *G. heterocarpa* (Tabela 3).

**Tabela 3.** Dados do N acumulado no tecido vegetal e abundância natural de  $^{15}\text{N}$  em plantas de *G. heterocarpa* inoculado com estirpes de *Bradyrhizobium*.

Tratamento	Tecido	Teor de N	Delta $^{15}\text{N}$
		%	
BR 2217	Parte Aérea	0,941	-1,29
BR 2203	Parte Aérea	1,711	-1,65
3D	Parte Aérea	1,8	-1,73
Controle	Parte Aérea	0,543	-1,976
BR 2217	Raiz	1,702	0,348
BR 2203	Raiz	1,513	0,703
3D	Raiz	1,262	1,009
Controle	Raiz	0,891	0,41
BR 2217	Nódulo	2,011	-3,165
BR 2203	Nódulo	3,549	1,374
3D	Nódulo	6,111	6,576
Controle	Nódulo	-	-

Tratamento	Acúmulo de $\text{N}_{\text{PA}}$
	mg planta $^{-1}$
BR 2217	35,76
BR 2203	128,32
3D	118,8

Estirpes	Valor $\text{B}_{\text{PA}}$
BR 2217	-1,22
BR 2203	$-1,64 \pm 0,35$
3D	$-1,72 \pm 0,39$

As plantas de macrotiloma inoculadas com a estirpe BR 14193 apresentaram desempenho superior às demais plantas inoculadas para a maioria das variáveis. A inoculação da estirpe BR 14193 promoveu um rendimento da massa seca da parte aérea (MSPA) 99% e de massaseca de raiz (MSR) 94% superior ao tratamento não inoculado. A estirpe BR 14182 se assemelhou a BR 14193 na massa seca do nódulo (MSN), mas não significou ganhos de biomassa de planta semelhantes. A inoculação com a estirpe BR 14173 e com o consórcio de todas as estirpes não diferiram do tratamento não inoculado. Todos os tratamentos inoculados promoveram nodulação, porém não diferiram entre si (Tabela 4).

Curiosamente, o tratamento com consórcio de estirpes, simulando o solo, não promoveu aumento de MSPA, o que foi algo inesperado, visto que a hipótese inicial era que este tratamento poderia simular condições de campo, quando mais de uma estirpe de rizóbio coloniza as raízes.

**Tabela 4.** Eficiência simbiótica de bactérias diazotróficas inoculadas em *Macrotyloma axillare* cv.java na massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), massa seca de nódulo (MSN) e nodulação (NN).

Tratamento	MSPA	MSR	MSN	NN
	g planta <sup>-1</sup>		mg planta <sup>-1</sup>	
Não inoculado	0,03 c	0,011 b	0 b	0 b
Consórcio	0,24 c	0,046 b	0,015 b	36,50 a
BR14173	0,06 c	0,022 b	0,017 b	40,25 a
BR14219	1,77 b	0,223 a	0,105 a	79,50 a
BR14193	3,08 a	0,256 a	0,161 a	56,75 a
BR14182	1,46 b	0,155 a	0,134 a	109 a
Média	1,10	0,12	0,07	53,66
CV (%)	70	57	67	36

O teor de N na parte aérea das plantas de macrotiloma foi maior nos tratamentos com inoculação (Tabela 5). Essas plantas inoculadas apresentaram o valor de delta <sup>15</sup>N negativo, em comparação ao controle, com delta <sup>15</sup>N positivo. Em geral, raízes e nódulos apresentaram valores bem positivos, novamente confirmando a existência de uma discriminação do isótopo <sup>15</sup>N no processo de partição entre parte aérea e subterrânea. O valor B médio encontrado para a parte aérea foi de -1,17 (Tabela 5).

Os valores B encontrados para as leguminosas estudadas estão próximos dos valores encontrados na literatura para leguminosas tropicais, ou seja, valores próximos de -1 delta <sup>15</sup>N. No entanto, foram um pouco diferentes dos valores obtidos por outros autores, tal como revisado por Unkovich et al. (2008), os quais listaram os valores de -1,83 para *M. axillare* e -1,14 para *G. intortum*.

Os estudos realizados por outros autores demonstram que variações no valor B podem ser encontradas em função do estágio de crescimento da planta, variedade utilizada e do inoculante microbiano utilizado (ARAÚJO; PLASSARD; DREVON, 2008; PAUFERRO et al., 2010; PACHECO et al., 2020). Com relação ao crescimento, o problema diminui conforme a planta se estabelece no campo, pois a influência das sementes se torna menos importante (PACHECO et al., 2020). Da mesma forma, no campo, dificilmente a planta se encontra nodulada por uma única estirpe, e assim possíveis efeitos individuais são menos prováveis.

**Tabela 5.** Dados do N acumulado no tecido vegetal e abundância natural de  $^{15}\text{N}$  em plantas de *Macrotyloma axillare* cv. Java.

Tratamento	Tecido	Teor de N	Delta $^{15}\text{N}$
		%	
BR14182	Parte Aérea	2,67	-1,14
BR14193	Parte Aérea	2,61	-0,86
BR14219	Parte Aérea	2,79	-0,87
Consórcio	Parte Aérea	1,97	-1,3
Controle	Parte Aérea	0,78	1,34
BR14182	Raiz	1,75	0,26
BR14193	Raiz	2,21	0,75
BR14219	Raiz	1,79	0,26
Consórcio	Raiz	1,66	0,97
Controle	Raiz	1,24	2,81
BR14182	Nódulos	6,26	5,21
BR14193	Nódulos	6,88	5,87
BR14219	Nódulos	6,01	6,28
Consórcio	Nódulos	5,74	3,29
Controle	Nódulos	-	-

Tratamento	Acúmulo de $\text{N}_{\text{PA}}$
	$\text{mg planta}^{-1}$
BR14219	7240
BR 14182	3456
BR 14193	7333
Consórcio	592

Estirpes	Valor $\text{B}_{\text{PA}}$
BR14219	-0,94±0,15
BR 14182	-1,19±0,25
BR 14193	-0,89±0,14
Consórcio	-1,66±0,39
<b>Média</b>	<b>-1,17±0,29</b>

### 3.5.2 Contribuição da FBN em pastagens consorciadas com leguminosas forrageiras

A taxa de ocupação de leguminosas nas pastagens mostrou-se bastante variável ao longo das estações do ano, havendo maior proporção e estabilidade durante as estações de primavera e verão e principalmente nos locais dentro da estação experimental da Ceplac, com destaque para o consórcio de desmódio e capim mombaça (Tabela 6). Vale ressaltar que durante as coletas não foram feitas adubações nas áreas da Essul-Ceplac, não sendo desprezíveis possíveis efeitos residuais das adubações realizadas anteriormente. Na maioria das Fazendas amostradas observa-se que a leguminosa desmódio é preferida pelos pecuaristas devido a maior rusticidade da espécie e fácil manejo. Excetuando-se as pastagens consorciadas da Essul-Ceplac, o amendoim-forrageiro, de forma pouco expressiva, foi encontrado apenas em um consórcio com braquiária na Fazenda Sul-BA. Em outros locais, o amendoim-forrageiro foi encontrado apenas compondo o paisagismo das fazendas. Em termos médios anuais, a proporção de leguminosas na biomassa disponível variou entre, aproximadamente, 15 e 50%, indicando boas condições de manejo.

**Tabela 6.** Massa seca disponível de gramíneas (Gram), leguminosas (Leg), ervas espontâneas (inv) e percentual de leguminosas (LG) para a massa seca disponível em pastagens consorciadas durante as quatro estações do ano, em diferentes locais (L) em Itabela, BA.

L**	Primavera				Verão				Outono				Inverno			
	Gram	Leg	Inv	LG	Gram	Leg	Inv	LG	Gram	Leg	Inv	LG	Gram	Leg	Inv	LG
	Mg ha <sup>-1</sup>				Mg ha <sup>-1</sup>				Mg ha <sup>-1</sup>				Mg ha <sup>-1</sup>			
			%				%				%				%	
1	1,63±0,28	1,1±0,42	0,08±0,10	44	1,63±0,12	1,53±0,29	0,30±0,12	48	1,18±0,28	1,4±0,19	0,38±0,21	47	1,8±0,29	1,5±0,39	0,04±0	47
2	0,99±0,57	1,05±0,24	0,45±0,96	48	1,68±0,16	1,14±0,30	0,26±0,42	34	1,87±0,57	0,64±0,24	-	26	2,21±0	0,71±0	-	2
3	1,35±0,28	0,98±0,31	-	43	1,35±0,23	0,98±0,21	0,16±0	43	1,29±0,28	0,56±0,31	0,26±0,18	27	2,71±0	4,42±0	-	22
4	1,86±1	2,38±0,31	-	53	1,67±0,21	3,23±0,67	-	56	3,25±1,00	1,29±0,31	-	28	4,23±1,2	2,4±0,61	0,03±0	51
5	1,63±0,40	0,24±0,09	-	15	1,7±0,86	0,57±0,16	0,22±0	30	1,43±0,40	0,27±0,09	-	16	1,67±0,21	0,2±0,05	0,17±0,05	17
6	1,59±0,15	1,73±0,34	-	51	1,26±0,22	1,17±0,18	0,09±0,05	48	1,04±0,15	0,78±0,34	-	43	1,37±0,78	1,5±0,34	-	53
7	2,34±0,29	0,44±0,12	0,15±0	16	1,98±0,34	1,25±0,12	0,30±0,06	35	1,92±0,29	0,31±0,12	-	14	1,93±0,35	0,3±0,06	0,26±0,02	15
8	2,63±0,54	0,49±0,18	0,32±0,16	17	2,52±0,36	1,68±0,61	0,58±0,14	42	1,6±0,54	0,29±0,18	0,24±0,14	14	2,26±0,20	0,9±0,22	0,25±0,1	27
9	2,28±0,40	0,39±0,04	-	16	2,13±0,27	1,39±0,11	-	42	2,11±0,40	0,24±0,04	-	10	1,9±0,24	0,9±0,36	-	17
10	1,23±0,33	0,4±0,15	-	29	0,46±0,13	0,7±0,06	-	59	1,87±0,33	0,48±0,15	-	20	1,69±0,61	0,8±0,35	-	41
11	1,14±0,1	1,82±0,61	-	41	3,27±0,50	2,39±0,94	-	41	3,72±1,11	1,26±0,61	-	25	1,4±0,26	2,2±0,28	-	55
12	4,73±0,28	1,14±0,19	-	27	1,18±0,11	0,78±0,11	-	41	1,71±0,28	1,29±0,15	-	43	1,91±0,48	2,5±0,40	-	60

\*Valores médios de 6 repetições. \*\*1. Essul; 2. Faz. Sul BA, desmódio; 3. Faz. Sul BA, amendoim; 4. Essul; 5. Essul; 6. Faz. Pinguim; 7. Essul; 8. Essul; 9. Essul; 10. Faz. Arizona; 11. Faz. Palmares-consórcio; 12. Fazenda Palmares, eucalipto;

Em relação as análises de fertilidade do solo, observa-se que nas áreas há pouca variação no pH e nos teores de nutrientes, exceto o teor de P que foi maior no consórcio com Mombaça e desmódio o que pode explicar um melhor estabelecimento da leguminosa. O teor de cálcio também foi diferenciado entre as áreas, superando 2 cmol cm<sup>-3</sup> apenas em quatro locais amostrados (Tabela 7). O mesmo ocorreu no consórcio de amendoim e dictioneura, que mesmo com maiores teores de fósforo não houve uma maior % de leguminosas na área, nem mesmo de biomassa, valendo ressaltar que no local havia o pastoreio esporádico de vacas leiteiras (Tabela 7).

**Tabela 7.** Dados médios da análise de fertilidade do solo de diferentes localidades (L) com pastagens consorciadas amostradas durante o ano, em Itabela, BA.

L**	pH	%C	H+Al	Al+3	Ca+2	Mg+2	P	K
	unidade	%	cmolc dm <sup>-3</sup>			mg L <sup>-1</sup>		
1	5,23±0,1	1,03±0,1	3,59±0,7	0,16±0,1	1,23±0,2	0,50±0,1	3,40±0,9	36,33±8,11
2	5,34±0,3	1,125±0,34	3,97±0,7	0,17±0,1	1,49±0,8	0,8925±0,2	3,86±0,5	48,6±15,24
3	5,02±0,4	1,01±0,1	4,12±0,3	0,44±0,3	1,31±0,5	0,69±0,1	4,03±1,5	73,40±5,88
4	5,42±0,1	1,20±0,1	4,51±0,8	0,08±0,0	2,04±0,4	0,79±0,2	7,02±1,9	53,31±15,6
5	5,08±0,1	1,15±0,2	4,62±0,3	0,19±0,1	1,56±0,2	0,63±0,2	5,15±0,7	60,11±42,7
6	5,32±0,1	1,09±0,1	4,00±0,1	0,15±0,0	1,52±0,2	0,54±0,1	4,96±0,8	58,84±23,5
7	5,12±0,2	0,91±0,1	5,25±0,7	0,26±0,1	1,55±0,4	0,28±0,1	4,84±0,4	20,66±1,53
8	5,41±0,1	1,57±0,3	4,54±0,3	0,07±0,0	2,11±0,2	0,70±0,1	5,23±1,4	70,10±2,46
9	5,63±0,1	1,12±0,2	3,01±0,6	0,005±0,0	3,12±0,1	0,82±0,2	6,24±2,2	51,57±18,3
10	5,24±0,3	0,96±0,1	3,62±0,6	0,15±0,1	1,23±0,1	0,43±0,1	4,42±0,8	49,49±11,6
11	5,25±0,1	1,07±0,1	4,27±0,6	0,18±0,1	1,75±0,4	0,72±0,1	5,42±1,7	41,60±19,7
12	5,39±0,3	1,40±0,4	4,64±1,3	0,09±0,1	2,14±0,7	0,76±0,2	5,66±1,2	63,05±16,8

\*Valores médios de 4 repetições. pH (água); P (Mehlich 1); Al (titulação). \*\*1. Essul; 2. Faz. Sul BA, desmódio; 3. Fazenda Sul BA, amendoim-forrageiro; 4. Essul, mombaça; 5. Essul; 6. Fazenda Pinguim; 7. Essul; 8. Essul, experimento José Ribeiro; 9. Essul, cv. Piatã e amendoim-forrageiro; 10. Fazenda Arizona; 11. Fazenda Palmares-consórcio; 12. Fazenda Palmares, eucalipto.

Em relação a contribuição oriunda da FBN, os valores percentuais variaram ao longo das estações do ano, sendo que maiores contribuições foram observadas para desmódio. A %Ndfa apresentou menor variação ao longo do ano no consórcio de desmódio com mombaça. Neste consórcio foi observada uma taxa média anual de 96% do N oriundo da FBN, equivalente a uma média de 40,5 kg de N ha<sup>-1</sup> na massa seca de forragem (Tabela 8). Embora não seja possível calcular a entrada anual de N derivada da FBN nessas pastagens com os dados medidos, a contribuição deve ser bem significativa.

Na área de pastagens da ESSUL-Ceplac, dos Santos et al. (2023) constataram que a introdução de desmódio em pastagens de *U. brizantha* cv. Marandu produziu o mesmo impacto na lotação animal e no ganho de peso diário de bovinos de corte que a adubação anual com 150 kg N ha<sup>-1</sup> de pastos exclusivos de Marandu.

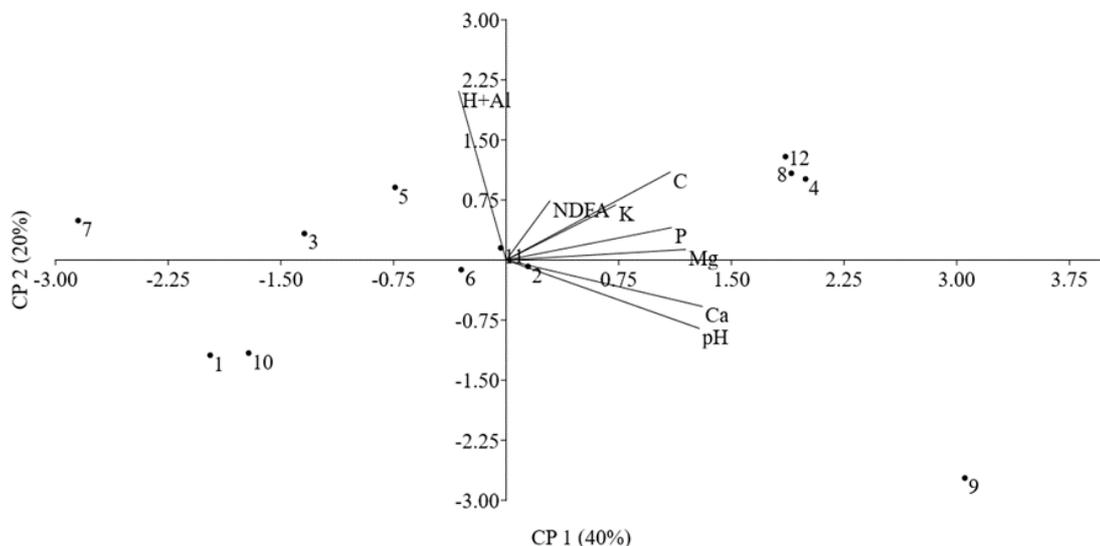
Dados preliminares obtidos por Borré (2023) em um experimento de *U. brizantha* cv. Marandu com *M. axillare* cv. Java apontam contribuição de 85% do N oriundo da FBN, no entanto, essa contribuição variou sazonalmente, contribuindo com 40,10 kg de N na primavera e verão (águas) e 35,23 kg de N no outono e no inverno (seca) o que corrobora com os resultados desta tese.

**Tabela 8.** Contribuição da fixação biológica de nitrogênio durante as quatro estações do ano, em pastagens consorciadas em Itabela, BA.

N	Primavera			Verão			Outono			Inverno		
	<sup>15</sup> N	Ndfa	NFBN	<sup>15</sup> N	Ndfa	NFBN	<sup>15</sup> N	Ndfa	NFBN	<sup>15</sup> N	Ndfa	NFBN
	δ <sup>15</sup> Nptf	%	kg de N ha <sup>-1</sup>	δ <sup>15</sup> Nptf	%	kg de N ha	δ <sup>15</sup> N	%	kg de N ha	δ <sup>15</sup> N	%	kg ha <sup>-1</sup>
1	-1,34	73	11,36	-1,21	72	13,94	-1,43	75	14,54	0,78	55	13,53
2	-1,63	100	14,09	-0,11	79	14,39	-1,55	98	9,48	-0,73	81	14,73
3	0,53	61	13,24	1,01	53	13,07	-0,07	54	7,92	-0,41	59	12,59
4	-1,26	88	30,33	-1,16	90	46,53	-1,73	104	19,06	-1,73	102	66,19
5	-0,35	63	3,89	0,76	48	7,43	0,25	44	2,72	-0,22	57	2,41
6	-0,46	70	17,12	-0,36	70	16,85	-0,15	69	8,48	-1,06	88	23,62
7	-1,03	63	4,93	0,50	55	16,29	-0,35	50	3,71	-1,55	81	5,24
8	-0,03	45	6,79	-0,28	60	18,38	-0,31	57	2,59	0,75	50	7,04
9	-0,03	43	4,99	0,46	49	12,51	-0,09	54	3,37	-1,07	62	9,97
10	1,22	51	5,45	1,54	46	6,07	1,48	36	2,88	-1,54	98	12,45
11	-0,43	79	23,31	-0,27	68	22,45	-1,11	85	14,95	-1,14	91	28,44
12	-1,13	92	14,08	-0,11	66	8,27	-1,42	94	16,82	-0,09	66	72,43

\*Valores médios de 6 repetições. \*\*1. Essul; 2. Fazenda Sul BA, desmódio; 3. Fazenda Sul BA, amendoim-forrageiro; 4. Essul, mombaça; 5. Essul; 6. Fazenda Pinguim; 7. Essul; 8. Essul, experimento José Ribeiro; 9. Essul, cv. Piatã e amendoim-forrageiro; 10. Fazenda Arizona; 11. Fazenda Palmares-consórcio; 12. Fazenda Palmares, eucalipto.

Numa tentativa de entender os efeitos das diferentes variáveis no desempenho da FBN nas leguminosas estudadas, aplicou-se uma análise de componentes principais (Figura 2). Aproximadamente, 60% da variabilidade dos dados foi encontrada nos dois primeiros componentes. O primeiro componente explicou 40% da variação dos dados e pode ser representado pelas variáveis “nitrogênio oriundo da fixação biológica de nitrogênio” (NDFa) e teores de carbono, e concentrações no solo de K, P, Ca, e Mg, e pH do solo. O segundo componente explicou 20% da variação, sendo associado à acidez potencial (H+Al). Considerando os locais amostrados como tratamentos, observa-se que a fertilidade do solo se relaciona positivamente com os maiores valores de nitrogênio oriundo da FBN em três locais onde o desmódio estava presente, sendo eles, o consórcio com capim mombaça (4), o experimento José Ribeiro (8) e a Fazenda Palmares (12). Considerando o CP2, essas localidades mostraram relação direta com os teores de H+Al, o que está associado não à maior disponibilidade de Al<sup>3+</sup>, mas com o teor de matéria orgânica do solo, expresso aqui como carbono (%). O local 9, definido pelo consórcio da cv Piatã com amendoim (*A. pintoi*) também mostrou relação semelhante com o CP1, porém uma relação inversa com CP2.



**Figura 2.** Análise de Componentes Principais das variáveis amostradas durante as 4 estações para avaliação da contribuição da FBN em pastagens consorciadas em Itabela, Bahia. NDEA= Nitrogênio oriundo da fixação e C= Carbono em %. K=Potássio e P= Fósforo em  $\text{mg L}^{-1}$ . Mg= Magnésio, Ca=Cálcio, H + Al= Acidez Potencial em  $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ .

Como se constata na Tabela 8, as variações de pH foram pequenas entre locais, porém em uma faixa entre 5,0 e 5,5, sendo os menores valores responsáveis por concentrações de  $\text{Al}^{+3}$  próximas de  $0,2 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ , ou superiores, forma que é detrimental para o crescimento da planta, e conseqüentemente para a acumulação de N pela FBN. A disponibilidade de P também é prejudicada com a redução do pH, condição frequentemente associada a menores concentrações de bases no solo. Isso explica a relação direta entre FBN, disponibilidade de bases, pH e teor de P encontrado no estudo.

De acordo com Bonilla e Bolaños (2009), o fósforo é um nutriente limitante comum para o crescimento de leguminosas em solos tropicais. Íons fosfato são requeridos na etapa de nodulação, e mais ainda no processo de FBN. Em termos de energia, a FBN é um processo muito demandante, excedendo 16–18 mol de ATP por mol de  $\text{N}_2$  fixado. Dessa forma, a disponibilidade de P no solo deve ter uma relação direta com o desempenho das leguminosas forrageiras em pastagens, especialmente no ambiente altamente competitivo de um consórcio com gramíneas em condições de baixo suprimento anual via aplicação de fertilizantes (ALMEIDA et al., 2000; ARAÚJO e MACHADO, 2018). Bonilla e Bolaños (2009) também destacam o papel do cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) como um segundo elemento crucial na FBN, sendo necessário para a formação de nódulos ao influenciar a sinalização entre plantas e bactérias. Estudos indicam que a atividade dos genes nod aumenta com o aumento da disponibilidade de  $\text{Ca}^{+2}$  para o crescimento da planta, permitindo aumento na síntese de flavonoides, essenciais para esse processo.

Não restam dúvidas sobre os efeitos limitantes da deficiência de P para o crescimento de ambos, rizóbios e leguminosas. Entretanto, estudos mostram que mecanismos de adaptação em solos deficientes em P, como: (i) homeostase de P nos nódulos, ocorrendo a alocação de P para os nódulos; (ii) alterações na morfologia da raiz (raízes proteóides) ou associação com fungos micorrízicos; (iii) aquisição do P pela superfície do nódulo; e (iv) remobilização de P de fontes orgânicas (Hussain, 2017) podem estar ocorrendo nas condições estudadas. Outros efeitos, podem estar presentes, embora não constatado para as espécies em estudo. Sulieman; Schulze; Tran (2013) confirmam que a eficiência da FBN é dependente dos níveis de P

encontrados no solo, porém observaram que a estirpe 2011 de *S. meliotti* apresentava eficiência simbiótica alta com *M. trunculata*, e baixa, com *M. sativa* em condições limitantes de P. O inverso ocorria em condição de suprimento normal de P. Segundo esses autores, os resultados de alta eficiência da simbiose em *M. trunculata* estariam relacionados com a habilidade da espécie em aumentar os níveis de malato em baixas doses de N, garantindo maior eficiência no sistema fixador.

Esses resultados reforçam que o estabelecimento bem sucedido de consórcios com leguminosas é dependente de boas condições de fertilidade do solo, não bastando apenas introduzir a leguminosa no sistema. Mmbaga et al. (2014) investigaram a relação da formulação de inoculantes a base de rizóbios combinados com a suplementação com P e K, como forma de viabilizar a FBN e a nutrição de leguminosas. Os autores demonstraram que quando o P é suplementado ocorreu aumento na absorção de outros nutrientes, como N, P, K, Ca, Mg, Zn, Cu, Mn, Fe e Na. Consideraram também como co-benefícios que o fornecimento de matéria orgânica rica em P e K pode contribuir para a atividade biológica do solo, e conseqüentemente, com a absorção de nutrientes pelas plantas através de mudanças na estrutura e química do solo.

### 3.6 CONCLUSÕES

Na ausência de mais estudos que determinem valor B para *G. heterocarpa*, o valor mais indicado é de -1,62 ‰, único existente para ser usado na aplicação da técnica de abundância natural de <sup>15</sup>N para quantificar a contribuição da FBN para a leguminosa, número desenvolvido neste estudo. Para *M. axillare*, o valor B recomendado a partir do presente estudo é de -1,17 ‰.

As diferenças em resposta de nodulação e crescimento das leguminosas *G. heterocarpa* e *M. axillare*, produzidas em vasos de Leonard sob tratamentos de inoculação com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* sp., indicam boas possibilidades para o desenvolvimento de inoculantes para aumento da eficiência da FBN no campo. No entanto, a contribuição da FBN para pastagens estabelecidas em áreas comerciais e experimentais com gramíneas forrageiras consorciadas com *G. heterocarpa* e *A. pintoii* varia consideravelmente em função da biomassa existente da leguminosa e das condições de fertilidade do solo, especialmente a disponibilidade de P e Ca<sup>+2</sup>, e conteúdo de matéria orgânica. São fatores que afetam tanto a dependência da planta pelo N da FBN (%Ndfa) quanto a biomassa disponível e devem ser considerados para o sucesso de uso de inoculantes para leguminosas forrageiras na implantação dos consórcios.

## **4. CAPÍTULO II**

### **ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS EM LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS**

#### 4.1 RESUMO

A introdução de uma leguminosa forrageira em uma pastagem tropical pode diminuir a necessidade de adubação nitrogenada, desde que a fixação biológica de N<sub>2</sub> (FBN) contribua com o suficiente para compensar o N exportado. *Arachis pintoi*, *Grona heterocarpa* e *Macrotyloma axillare* são leguminosas adequadas para compor pastagens mistas e a hipótese do trabalho é que o isolamento de rizóbios indígenas a partir de raízes e da rizosfera é a forma de se obter um inoculante eficiente para maximizar a FBN para essas leguminosas. Nódulos (*A. pintoi*, *G. heterocarpa* e *M. axillare*) e solo da rizosfera (*M. axillare*) foram coletados em pastagem consorciada com capim. Adicionalmente o solo da rizosfera foi usado em um ensaio usando *M. axillare* como planta isca utilizando vasos Leonard contendo uma mistura de vermiculita e areia. Um total de seis, oito e dez bactérias oriundos de *A. pintoi*, *G. heterocarpa* e *M. axillare* foram obtidos, respectivamente. Os isolados foram utilizados em experimentos para avaliar as respostas de inoculação em leguminosas forrageiras em condições de casa de vegetação para as quais foram medidos a nodulação, o crescimento das plantas e o acúmulo de N na parte aérea. Análises filogenéticas baseadas em 16S rRNA e recA posicionaram todas as estirpes rizobianas dentro do gênero *Bradyrhizobium*, algumas delas não descritas previamente. A estirpe BR14182 foi considerada a mais promissora para inoculação de *M. axillare*, devido ao alto acúmulo de matéria seca e N na parte aérea das plantas. Uma das estirpes recomendadas para *A. pintoi*, a estirpe BR 1432 foi mais eficiente do que BR 1433 e do que o consórcio de isolados oriundos de Itabela, BA em *A. pintoi*. Estirpes rizobianas oriundas da coleção de culturas CRB foram mais eficientes que o consórcio de isolados oriundos de Itabela, BA e tão eficientes quanto a estirpe recomendada BR 2217 para *G. heterocarpa* em acumular N na parte aérea destas plantas. Este estudo fornece a primeira análise da diversidade de *Bradyrhizobium* nodulando *G. heterocarpa* e *M. axillare* no Brasil e forneceu evidências do papel da inoculação no incremento da simbiose planta-rizóbio em leguminosas forrageiras.

**Palavras-chave:** *Arachis pintoi*. *Grona heterocarpa*. *Macrotyloma axillare*. Inoculante rizobiano. Nodulação.

## 4.2 ABSTRACT

The introduction of a forage legume into a tropical pasture should decrease the need for N fertilizer, provided biological N<sub>2</sub> fixation (BNF) contributes enough to compensate for exported N. *Arachis pintoi*, *Grona heterocarpa* and *Macrotyloma axillare* are suitable legumes for composing mixed pastures and our hypothesis is that the isolation of indigenous rhizobia from roots and rhizosphere is the way of achieving an efficient inoculant to maximize BNF to these legumes. Nodules (*A. pintoi*, *G. heterocarpa*, *M. axillare*) and rhizosphere soil (*M. axillare*) taken from and *M. axillare* grown in a mixed pasture with palisade grass were sampled and used in a trap host assay using Leonard jars containing a mixture of vermiculite and sanG. A total of six, eight and ten bacteria from *A. pintoi*, *G. heterocarpa* and *M. axillare*, respectively. The isolates were then used in experiments to evaluate the inoculation responses on forage legumes in greenhouse conditions to which nodulation, plant growth and shoot N accumulation were measured. Phylogenetic analyses based on 16S rRNA and *recA* placed all strains within the genus *Bradyrhizobium*, some of them not previously described. The strain BR14182 was considered the most promising for inoculation of *M. axillare*, due to the high accumulation of dry matter and N in shoots. The recommended strain BR1432 was more efficient than the other recommended strain BR1433 and the consortium of isolates from Itabela, BA on *A. pintoi*. Rhizobian strains from the collection of cultures CRB were more efficient than the consortium of isolates from Itabela, BA and as efficient as the recommended strain BR 2217 for *G. heterocarpa* in accumulating N in shoots. Strain BR14182 was considered the most promising for *M. axillare* inoculation, given the high dry matter and N accumulation in plant shoots. This study provides the first analysis of *Bradyrhizobium* diversity nodulating *G. heterocarpa* and *M. axillare* in Brazil and provided evidence of the role of inoculation in incrementing the plant-rhizobium symbiosis in forage legumes.

**Keywords:** *Arachis pintoi*. *Grona heterocarpa*. *Macrotyloma axillare*. Rhizobia Inoculant. Nodulation.

### 4.3 INTRODUÇÃO

O uso de leguminosas forrageiras consorciadas com gramíneas atrelado a um manejo adequado e reposição de nutrientes pode proporcionar maior longevidade às pastagens com maior produtividade, além de significar um avanço para sistemas mais sustentáveis (BODDEY et al., 2020). Dentre as leguminosas forrageiras com potencial para consórcio em leguminosas estão *A. pintoi* e *G. heterocarpa* com hábito de crescimento estolonífero que proporciona o estabelecimento tanto por sementes quanto por estolões (TAMELE et al., 2020) e *M. axillare* uma espécie promissora devido a sua rusticidade (GIMENES et al., 2017).

*A. pintoi* é originário da América do Sul. A simbiose com rizóbios viabiliza o aporte de 80 a 120 kg de N ha ano<sup>-1</sup> (FISHER; CRUZ, 1994). *Grona heterocarpa* é uma forrageira perene nativa da Ásia (JIN et al. 2019). Essa leguminosa está simbioticamente associada a bactérias diazotróficas que contribuem com quantidades significativas de N para o solo (154 kg ha ano<sup>-1</sup>) (DE LIMA FILHO et al., 2014). No entanto, o valor de N contribuído para o sistema depende não apenas do manejo para manter uma biomassa significativa da leguminosa, mas também da associação eficiente com bactérias diazotróficas e a alta contribuição da FBN nas áreas onde a leguminosa está presente. *M. axillare* é uma leguminosa herbácea (MORRIS, 2008) indicada para compor pastagens mistas (GIMENES et al., 2017).

A partir de testes de campo em Gana realizados em condições contrastantes de fertilidade do solo, *M. axillare* apresentou o melhor desempenho quando cultivado sozinho ou combinado com diferentes espécies de gramíneas (BARNES, 1995). No Brasil, formar uma pastagem mista de *M. axillare* com capim-guiné foi importante para melhorar a proteína disponível para o gado comparável a uma pastagem de capim puro fertilizado com N em um sistema de adubação menos intensificado (FRANCISQUINI JUNIOR et al., 2020).

Espécies de *Bradyrhizobium* foram encontradas como microssimbiontes de *Arachis pintoi* (SÁ et al. 2019), *Grona heterocarpa* (Delamuta et al., 2015) e *Macrotyloma* spp. (TRINICK, 1982; APPUNU et al., 2011; MOHAMMED; JAISWAL; DAKORA, 2019).

Mais especificamente, a espécie *M. axillare* foi capaz de nodular com estirpes de *B. japonicum*, *B. elkanii* e *B. yaunmingense* (HASSEN; BOPAPE; TRYTSMAN, 2014). Estudos de inoculação de *M. axillare* com diferentes estirpes mostraram resultados contrastantes. A estirpe CB756 foi superior a outras em nodulação e crescimento (HERRIDGE; ROUGHLEY, 1976), embora algumas colônias desta estirpe fossem ineficazes (BLUMENTHAL; STAPLES, 1993). Uma dependência excepcionalmente baixa de FBN (14%) de *M. axillare* foi relatada quando avaliada usando a técnica de abundância natural <sup>15</sup>N em um solo de alta fertilidade (MWANGI, 2020).

A resposta variável à inoculação de *M. axillare* quando em crescimento totalmente dependente de FBN sugere que o uso do inoculante pode ser uma estratégia bem sucedida para aumentar o crescimento das plantas. No entanto, pouco esforço foi feito até o momento para buscar uma simbiose eficiente. No Brasil, há a recomendação de que uma estirpe (BR 3101, *B. elkanii*) isolada de *Galactia striata* (Jacq.) Urb., oriunda de uma seleção entre algumas estirpes de uma coleção de *Bradyrhizobium*, possa ser utilizada para *M. axillare*, mas esta recomendação não é muito confiável devido à abordagem limitada utilizada (testes realizados em condição estéril).

A hipótese deste trabalho foi que rizóbios indígenas isolados das raízes e do solo da rizosfera de *A. pintoi*, *G. heterocarpon* e *M. axillare* podem alcançar uma simbiose mais eficiente e servir de base para a produção de inoculantes para as leguminosas. Conforme apontado por Sadowsky e Graham (1998), uma forma de obtenção de rizóbios é através de sua multiplicação em nódulos que posteriormente decompõem e os liberam no solo. Se as plantas noduladas em um solo de baixa fertilidade estiverem bem desenvolvidas, as chances de que os nódulos hospedem estirpes eficientes são altas.

Para buscar uma estirpe competitiva e eficiente para *A. pintoi*, *G. heterocarpon* e *M. axillare*, o presente estudo baseou-se no isolamento e caracterização de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> de nódulos amostrados em campo e solo rizosférico para avaliar seu desempenho como potenciais inoculantes para as leguminosas.

## 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.4.1 Isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio em *Arachis pintoi*, *Macrotyloma axillare* e *Grona heterocarpa*

Plantas de *A. pintoi* e *G. heterocarpa* foram coletadas em áreas da Estação de Zootecnia da Ceplac, em Itabela, BA. As plantas de *Macrotyloma axillare* foram coletadas em áreas do Instituto de Zootecnia da UFRRJ em Seropédica, RJ. Amostras de solo foram secas ao ar, peneiradas em malha de 2 mm e encaminhadas para o Laboratório de Química Agrícola em Seropédica, RJ para a determinação da fertilidade (Tabela 9).

**Tabela 9.** Análise química de terra proveniente das áreas plantadas com *Arachis pintoi* e *Grona heterocarpa* em Itabela, BA e com *Macrotyloma axillare* em Seropédica, RJ.

Solo	pH	H+Al	Al	Ca	Mg	K	P
	Unid	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>			mg L <sup>-1</sup>		
<i>A. pintoi</i>	5,42	4,57	0,09	2,33	0,58	62,42	6,4
<i>G. heterocarpa</i>	5,54	4,54	0,05	2,66	0,51	71,5	21,49
<i>M. axillare</i>	6,16	1,57	0	2,29	1,13	55,98	4,1

As plantas foram acondicionadas em sacos plásticos com solo e conduzidas ao Laboratório de Ecologia Microbiana na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, RJ.

As bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> foram provenientes da área de pastagem de cinco anos composta por *M. axillare* consorciada com braquiária (*Urochloa brizantha* cv. Marandu), localizada em Seropédica, RJ, Brasil (22 ° 47 '04.4 "S e 43 ° 41 '10 .2 "W, 26 m). A área estava sob pastejo de gado Nelore em sistema contínuo.

O solo da pastagem é um Planossolo Típico do qual as amostras da camada de 0-20 cm apresentaram pH (água) 6,16, H + Al (acetato de cálcio pH 7,0) 1,57 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, Ca<sup>+2</sup> 2,29 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, Mg<sup>+2</sup> 1,13 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, disponível P (Mehlich 1) 4 mg dm<sup>-3</sup> e K<sup>+</sup> 56 mg dm<sup>-3</sup> (TEIXEIRA et al., 2017).

Amostras compostas de nódulos de *Macrotyloma axillare* foram coletadas aleatoriamente de cinco plantas bem desenvolvidas seguindo um caminho em zigue-zague ao longo da pastagem mista de leguminosas e gramíneas. As plantas foram coletadas com solo rizosférico aderido às raízes. Esse procedimento foi realizado em cinco áreas diferenciadas na pastagem totalizando 25 plantas removidas. As amostras compostas das cinco áreas foram transferidas para o laboratório em condições ambientais. Posteriormente, o solo da rizosfera foi removido manualmente e peneirado para separação dos nódulos. Quarenta e dois nódulos foram destacados e usados para o isolamento de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub>.

Além da amostragem de campo de plantas de *M. axillare*, um ensaio utilizando macrotiloma como planta isca foi realizado usando amostras de solo rizosférico como inoculante de acordo com Favero et al. (2021). Os vasos Leonard foram preenchidos com aproximadamente 0,6 L de substrato composto por cascalho e vermiculita (2: 1 v v<sup>-1</sup>) e, a seguir, esterilizados em autoclave. Uma camada de amostra de solo (0,1 L) foi adicionada sobre o substrato já esterilizado em cada frasco e coberto por uma camada superficial de areia fina estéril. O delineamento foi inteiramente casualizado com 7 repetições.

As sementes foram desinfestadas superficialmente por imersão em etanol 70%, hipoclorito de sódio (2,5%) e peróxido de hidrogênio (35%) por 30 s, 1 min e 3 min, respectivamente, seguida de dez lavagens em água destilada estéril. Quinze sementes foram semeadas por vaso e duas semanas após o plantio, as mudas foram desbastadas, restando uma planta por vaso. Um volume de 250 ml de solução Norris estéril livre de nitrogênio (YATES et

al., 2016) foi adicionado semanalmente. As plantas foram colhidas 55 dias após o plantio e todos os nódulos radiculares por amostra foram separados. Vinte e seis nódulos foram destacados e utilizados para o isolamento bacteriano.

Todos os nódulos coletados na amostragem de campo e no ensaio utilizando *M. axillare* como planta isca foram desinfetados por imersão em álcool 70% por 30 s, seguida de imersão em hipoclorito comercial a 20% por 5 min e, em seguida, enxaguados dez vezes em água destilada estéril. Após a desinfecção, os nódulos foram esmagados em placas de Petri contendo meio ágar YM com corante vermelho do Congo. As placas de Petri foram incubadas a 28 °C por 14 dias. Subcultivos sucessivos foram realizados até atingir o número final de isolados.

Os nódulos foram destacados das raízes e desinfetados superficialmente de acordo com metodologia proposta por Vincent (1970) e em seguida 10 nódulos foram selecionados de forma aleatória por espécie vegetal e cada um foi pressionado em placas de Petri contendo meio YMA com vermelho congo (0,25%) com o objetivo de separar rizóbios de possíveis contaminantes. As placas foram incubadas a 28° C por 10 dias e as colônias que não absorveram o indicador foram transferidas para placas de Petri contendo meio YMA com Azul de Bromotimol (0,5% em 0,2 N de KOH: 5 ml) e pH 6,8 incubadas em 28° C por até 10 dias.

Após a purificação dos isolados, as características das colônias foram avaliadas conforme a metodologia proposta por Yano et al. (1993): 1. Tamanho (mm); 2. Características ópticas (translúcida e opaca); 3. Cor (branca, amarela); 4. Forma da colônia (circular ou irregular); 5. Elevação (plana, lente, convexa, pulvinada, umbonada ou umbilicada); 6. Borda (ondulada, lobada, dentada, filamentososa ou inteira); 7. Superfície (lisa, rugosa ou papilada); 8. Produção de muco (escasso, pouco, moderado e abundante); 9. Tempo de crescimento (rápido, até 3 dias ou lento, com 4 dias ou mais); Alteração do pH do meio (ácido, alcalino ou neutro).

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

Os isolados 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.

Dez isolados bacterianos de *M. axillare* foram selecionados para caracterização molecular. A extração dos isolados de DNA genômico foi realizada com o kit Wizard® Genomic DNA purification (Promega®) conforme especificação do fabricante. Os DNAs isolados foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop® e sua integridade foi avaliada com gel de agarose 1% segundo Sambrook e Russell (2000).

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) 50 ng de DNA molde e ambos os iniciadores 27-F (FURUSHITA et al., 2003) e amp2 (WANG; QI; CUTLER, 1993) foram usados para a amplificação da sequência conservada do rRNA 16S gene. As reações foram preparadas usando Taq DNA polimerase (2,5 U); Tampão de reação 5X de Taq DNA polimerase (10 mmol l<sup>-1</sup> de Tris-HCl pH 9 e 50 mmol L<sup>-1</sup> de KCl); MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM); 0,25 mM de dNTP; e 0,5 μM de cada primer e água ultrapura para um volume final de 50 μl. Os ciclos de amplificação foram programados para uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 5 min, por 39 ciclos com 1 min a 95 °C, 60 °C por 90 s e 72 °C por 1 min, seguido por uma extensão final de 72 °C por 5 min.

Os ciclos de amplificação foram programados para uma desnaturação inicial de 95 °C por 5 min, seguida por 34 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 s, recozimento a uma 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.

Adicionalmente, os isolados bacterianos oriundos de *M. axillare* tiveram o DNA foi subsequentemente amplificado usando primers específicos para as regiões que codificam o gene housekeeping, *recA*. Para uma reação de PCR com um volume final de 25 µl, foram utilizados 50 ng de DNA molde: tampão de reação da polimerase de DNA Taq 10X (10 mmol L<sup>-1</sup> de Tris-HCl pH 9 e 50 mmol L<sup>-1</sup> de KCl); 1,5 mmol L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>; 200 µmol L<sup>-1</sup> dNTP com concentrações iguais de dATP, dTTP, dCTP e dGTP; 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen); 25 pmol de cada iniciador: 63-F/504-R (Gaunt et al., 2001).

A reação de amplificação foi realizada em um termociclador PTC 100 (MJResearch, Watertown, MA) com uma desnaturação inicial de 95 °C por 3 min, seguida por 29 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 s, anelamento a uma temperatura de 58 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 30 min. Ao final da reação, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%.

As amostras dos isolados bacterianos oriundos de *A. pintoi*, *G. heterocarpa* e *M. axillare* foram sequenciadas e após os isolados foram depositados e receberam uma identificação com BR no CRB da Embrapa Agrobiologia.

#### 4.4.2 Análises filogenéticas

A árvore filogenética do 16S rRNA (~1300 pb) e *recA* (~500 pb) dos isolados oriundos de *M. axillare* foi construída utilizando o método de Neighbor-joining. O método de bootstrap com 1000 repetições e tem sido avaliada pela topologia das sequências (Felsenstein, 1985).

A distância evolucionária foi calculada utilizando o método Tamura-3-parameter e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA 10 (TAMURA et al., 2013).

Para a comparação, o alinhamento incluiu sequências de estirpes tipo de *Bradyrhizobium* spp. As estirpes *B. elkanii* BR3101 (SEMIA 6149 ou CB 627) e *B. denitrificans* BR 5350 (BTai1) foram incluídas na análise como controles positivos e *Rhizobium tropici* CIAT 899 foi utilizado como um grupo externo para genes 16S rRNA e *recA*. Estas estirpes foram fornecidas pelo Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (<https://www.embrapa.br/agrobiologia/crb-jd>) na Embrapa Agrobiologia.

#### 4.4.3 Eficiência simbiótica das estirpes bacterianas

As estirpes bacterianas que compõem os experimentos de inoculação foram selecionadas com base na caracterização morfológica dos isolados de nódulos de plantas de *Arachis pintoi* oriundas da CEPLAC em Itabela, BA.

As estirpes bacterianas que compõem os experimentos de inoculação foram selecionadas com base na caracterização morfológica dos isolados de nódulos de plantas de *G. heterocarpa* oriundas da CEPLAC em Itabela, BA. Adicionalmente, estirpes depositadas na Coleção de Culturas Johanna Döbereiner (CRB), Seropédica, RJ foram selecionadas para compor o experimento com *Grona heterocarpa*.

As estirpes da coleção de culturas foram selecionadas para avaliar a capacidade funcional em um experimento de casa-de-vegetação. O experimento foi conduzido em vasos Leonard (Vincent, 1970), utilizando substrato pedrisco e vermiculita na proporção (1: 1 v v<sup>-1</sup>). Para a superação da dormência das sementes, a escarificação ácida foi realizada por imersão em ácido sulfúrico concentrado. Em seguida, as sementes foram desinfetadas em álcool 70%, seguido de peróxido de hidrogênio, e lavados sucessivamente em água destilada. Dez sementes foram semeadas por vaso com desbaste subsequente, deixando 3 plantas. A inoculação foi realizada uma semana após o plantio, na época do desbaste, adicionando-se 1 ml de suspensão bacteriana por plântula.

Para a inoculação bacteriana, uma colônia pura de cada estirpe cultivada em YMA com corante vermelho do Congo foi repicada, com o auxílio de uma alça de platina, no meio YM líquido sem indicador e incubada em um agitador a 30 °C com agitação constante de 160 rpm, por 6 dias.

Uma semana após a germinação das sementes, a água contida nos vasos foi substituída por 300 ml de solução nutritiva (ARAÚJO; PLASSARD; DREVON, 2008) com um quarto da concentração recomendada, sem adição de N, exceto no tratamento com N mineral. A concentração da solução foi aumentada gradualmente a cada semana.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com três repetições. O *M. axillare* cv. Java foi submetido a 14 tratamentos: i) inoculação de 10 isolados de *Bradyrhizobium* (BR 14173, BR 14176, BR 14179, BR 14180, BR 14182, BR 14186, BR 14191, BR 14193, BR 14216 e BR 14219). BR 3101 e BR 5350 foram incluídas como estirpes de referência positiva, ii) tratamento não inoculado e iii) tratamento com N mineral (250 mg  $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3 \text{ L}^{-1}$ ).

As plantas foram colhidas 120 dias após a emergência. A parte aérea e as raízes foram separadas e os nódulos destacados e contados. As amostras foram secas em estufa a 65 °C para determinar a proporção do peso da matéria seca. O tecido da parte aérea foi finamente moído em um moinho Wiley para avaliação do teor de N por via seca, em analisador CN. O acúmulo de N foi calculado como o produto do teor de N da parte aérea e a respectiva matéria seca.

Foi testada a normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de O'neill e Mathews (2000)). As variáveis massa seca de nódulos (MSN) e teor de nitrogênio acumulado na parte aérea (N) foram transformadas para que se adequassem ao teste de normalidade e homogeneidade das variâncias, utilizando a fórmula  $\sqrt{x}$ . Os dados foram submetidos à análise da variância (ANAVA) pelo teste F com nível de significância de 5%, dos dados.

Para a análise estatística do número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), O tratamento controle (não inoculado) e o tratamento adubado com nitrogênio mineral foram excluídos da análise por não haver nódulos nas raízes.

As variáveis massa seca de raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA) e o teor de nitrogênio acumulado na parte aérea (N). A diferença entre as médias foi comparada utilizando o teste Scott-Knott (SCOTT; KNOTT, 1974). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software R (R core team v.4.0.5, 2020) pacote Expdes.pt (FERREIRA, 2003).

#### **4.4.4 Ensaio da avaliação de rizóbios selecionados de *M. axillare* em condições não-estéreis**

Os vasos de Leonard foram preenchidos com aproximadamente 0,6 L de substrato composto por pedrisco e vermiculita (2: 1 v v<sup>-1</sup>), e a seguir esterilizados em autoclave segundo Favero et al. (2021). Uma camada de amostra de solo (0,1 L) de um horizonte A de Argissolo foi adicionada sobre o substrato já esterilizado em cada frasco e coberto por uma camada superficial de areia fina estéril. O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado com 4 repetições. A leguminosa *M. axillare* cv. Java foi submetida a 8 tratamentos: I) inoculação de 4 isolados de *Bradyrhizobium* que se destacaram no experimento simbiótico (BR 14176, BR 14182, e BR 14219). As estirpes BR 3262, BR 3101 e BR 5350 também foram incluídas como estirpes de referência positiva, II) tratamento não inoculado e III) tratamento com N mineral (100 mg L<sup>-1</sup> de  $\text{NO}_3\text{NH}_4$ ).

As sementes foram desinfestadas em álcool 70%, seguido de peróxido de hidrogênio, e lavadas com sucesso. Para a inoculação bacteriana, uma colônia pura de cada estirpe cultivada em YMA com corante vermelho do Congo foi elevada com o auxílio de uma alça de platina ao meio YM líquido sem indicador e incubada em um agitador a 30 °C com agitação constante de 160 rpm, por 6 dias. A inoculação foi realizada na semente antes do plantio, adicionando-se 1

ml de suspensão bacteriana ( $10^9$  células  $\text{ml}^{-1}$ ) para cada 20 sementes. Dez sementes foram semeadas por frasco com desbaste subsequente, deixando 2 plantas por vaso.

Uma semana após a germinação das sementes, a água contida nos potes foi substituída por 300 ml de solução nutritiva (ARAÚJO; PLASSARD; DREVON, 2008) com um quarto da concentração recomendada, sem adição de N, exceto no tratamento com N mineral. A concentração da solução foi aumentada gradualmente a cada semana.

As plantas foram colhidas 60 dias após a emergência. A parte aérea e raízes foram separados e os nódulos foram destacados e contados. As amostras foram secas em estufa a  $65^\circ\text{C}$  para determinar a proporção do peso da matéria seca.

Os dados foram submetidos à ANOVA pelo teste F com nível de significância de 5%, e as médias significativamente diferentes foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software R v.0.4.

## 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.5.1 Análise Molecular de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio

Foram obtidos um total de seis isolados de *A. pintoi* e oito isolados de *G. heterocarpa* e 10 isolados de *M. axillare*.

Cerca de 70% dos isolados obtidos de plantas de *Arachis pintoi* apresentaram semelhança na morfologia das colônias (2A, 6A, 4A e 5A) com colônias de coloração branca ou amarela opacas, crescimento lento, com 2 a 4 mm de diâmetro, elevação plana, bordas inteiras, sem a produção de muco e com a alteração do pH do meio para alcalino ou sem alteração. O isolado 1A apresentou colônias com coloração amarela e transparente, com 4 mm de diâmetro, abundante produção de muco e crescimento rápido da colônia e alteração do pH do meio YMA para ácido. O isolado 3A apresentou colônias brancas, circulares, com elevação planas, bordas onduladas e puntiformes (<1mm de diâmetro), crescimento lento, alteração do pH do meio YMA para ácido.

Apenas metade dos isolados das plantas de *Grona heterocarpa* agruparam-se em função da similaridade morfocultural, o que indica uma heterogeneidade maior entre estes isolados. É provável que a baixa similaridade entre os isolados de *Grona heterocarpa* e *Arachis pintoi* oriundos de Itabela, BA indiquem uma alta diversidade em função do histórico da área de sucessivos plantios com leguminosas forrageiras o que pode ser confirmado após a caracterização genética dos isolados.

De acordo com o sequenciamento as estirpes de *Arachis pintoi* e de *Grona heterocarpa* observou-se com base nas sequencias do gene 16 S rDNA que a estirpe BR 14612 (1A) foi similar a *Paraburkholderia sp.* e as estirpes BR 14613 (2A), BR 14614 (4A) e BR 14615(5A) eram pertencentes ao gênero de *Bradyrhizobium* (Tabela 10).

**Tabela 10.** Identificação dos isolados oriundos de nódulos de plantas de *A. pintoi* e *G. heterocarpa* com base na similaridade do gene recA com estirpes oriundas do NCBI.

Isolados	Acesso	Descrição	Max.identidade
BR 14612	CP046607.1	<i>Paraburkholderia contaminans</i>	98,52%
BR 14613	EU255226.1	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	96,35%
BR 14614	EU255226.1	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	96,40%
1D	KF532928.1	<i>Bradyrhizobium iriomotense</i>	96,92%
2D	JN207432.1	<i>Bradyrhizobium genosp</i>	99,55%
3D	JQ809827	<i>Bradyrhizobium genosp</i>	98,00%
4D	JQ809827.1	<i>Bradyrhizobium genosp</i>	97,76%
5D	JQ809817.1	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	99,33%
7D	MH1784691	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	99,55%
8D	KU896535.1	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	100%

### 4.5.2 Eficiência simbiótica de estirpes rizobianas em *A. pintoi* e *G. heterocarpa*

A inoculação auxiliou no maior desenvolvimento das leguminosas estudadas. O tratamento inoculado com a estirpe recomendada BR 1432 para amendoim-forrageiro foi mais eficiente do que o consórcio das estirpes (BR 14612, BR 14613, BR 14614 e BR 14615) e a estirpe BR 1433 na maioria das variáveis analisadas (Tabela 11).

De um modo geral, as estirpes oriundas da coleção de rizóbios do CRB foram mais eficientes do que o consórcio de isolados oriundos de Itabela, BA em promover o crescimento das plantas de *G. heterocarpa*, exceto para a estirpe BR 2203 que apresentou valores

comparáveis ao tratamento sem inoculação. A estirpe BR 2212 apresentou um incremento de 201% em relação à média dos tratamentos na variável MSR e a estirpe BR 2206 apresentou um incremento de 189% em relação à média dos tratamentos na variável MSPA.

Em relação ao acúmulo de N na parte aérea, as estirpes BR2206, BR2208, BR 2212 foram tão eficientes quanto a estirpe recomendada para a cultura BR 2217. No entanto, apenas as estirpes BR 2206 e BR 2212 foram superiores na massa seca de nódulos superiores ao inoculante recomendado, o mesmo comportamento não foi observado para a nodulação (Tabela 12).

**Tabela 11.** Inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio inoculadas em *Arachis pintoi* cv. Mandobi nas variáveis massa de parte aérea seca (MSPA), massa de raiz seca (MSR), massa de nódulos secos (MSN) e número de nódulos (NN).

Tratamento	MSPA	MSR	MSN	NN
	mg vaso <sup>-1</sup>			
Controle	160 a	210 a		-
Consórcio	270 b	300 a	<0,001 b	8,5 b
BR 1433	290 b	290 a	<0,001 b	7,25 b
BR 1432	387 a	540 a	0,05 b	45,75 a
Média	540	340	0,01	15,37
CV (%)	60,65	46,72	53,03	42,37

\*Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de probabilidade. Dados médios de 4 repetições.

**Tabela 12.** Inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio inoculadas em *Grona heterocarpa* cv. Itabela nas variáveis massa de parte aérea seca (MSPA), massa de raiz seca (MSR), massa de nódulos secos (MSN), número de nódulos (NN).

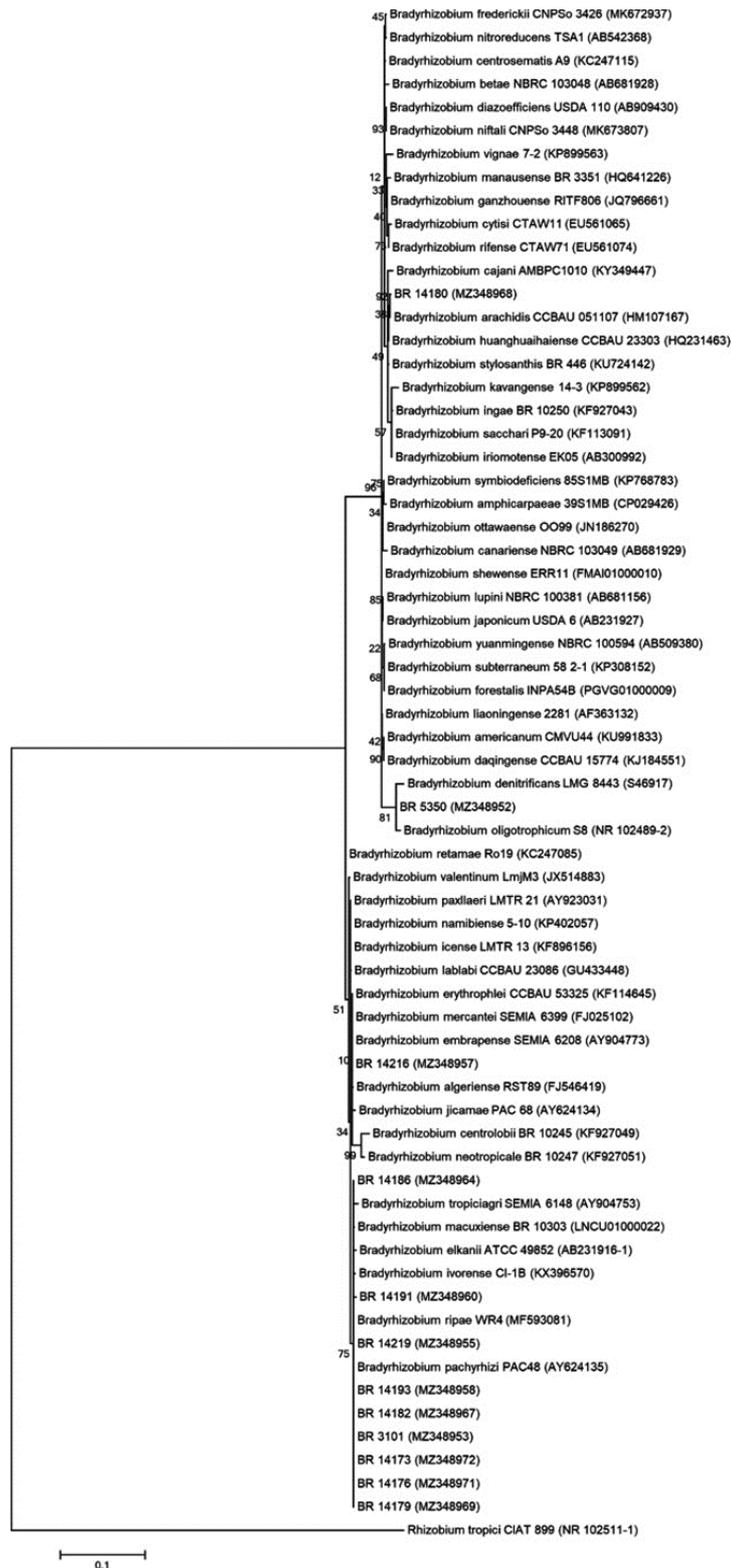
Tratamento	MSPA	MSR	MSN	NN
	mg planta <sup>-1</sup>			
Controle	8 c	16 c	-	-
Consórcio	821 bc	267 bc	77 bc	131,75 ab
BR2203	55 c	47 c	9 c	59,25 b
BR2206	1944 a	479 ab	224 a	265,5 a
BR2208	1883 ab	558 ab	128 abc	143,75 ab
BR2212	1741 ab	622 a	214 a	287,5 a
BR2217	1756 ab	462 ab	206 ab	267 a
Média	1030	310	110	155,43
CV (%)	64		72	75

\*Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de probabilidade. Dados médios de 4 repetições.

### 4.5.3 Isolamento de Microsimbiontes em *Macrotyloma axillare* e caracterização dos isolados

Foram obtidos 10 isolados bacterianos, 4 de *Macrotyloma axillare* cultivados em campo e 6 isolados bacterianos do ensaio usando *M. axillare* como planta isca. A análise taxonômica baseada nas sequências de rRNA 16S das estirpes isoladas de *Macrotyloma axillare* mostrou que elas pertenciam a *Bradyrhizobium* spp. Com base no posicionamento do rRNA 16S, houve a formação de grupos, todos os isolados bacterianos pertencem ao superclado *B. elkanii*, exceto BR14180 que estava mais associado ao superclado de *B. japonicum* (Figura 3).

*Bradyrhizobium* é considerado o grupo de rizóbio mais abundante em solos tropicais (HUNGRIA; MENNA; DELAMUTA, 2015). Ormeño-Orrillo e Martínez-Romero (2019) estimaram aproximadamente 800 espécies dentro do gênero *Bradyrhizobium*, a maioria delas ainda não descritas.



**Figura 3.** Árvore filogenética das sequências de gene 16S rRNA (~1500 pb), incluindo a estirpes-tipo depositadas no banco de dados do NCBI. A filogenia foi baseada em agrupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e modelo Kimura usando o programa MEGA 6.1. Números localizados nos ramos indicam que a porcentagem de 1000 sub-amostras (bootstrap). A escala representa o número de mutações pela posição dos nucleotídeos.

Com base na análise recA, o grupo 1 composto pelas estirpes BR 14173, BR 14176, a estirpe BR 14216 foi semelhante a *B. embrapense*, e BR 14179 foi semelhante a *B. brasilense*. BR 14191 foi semelhante a *B. pachyrhizi*, BR 14193 a *B. ripae* e BR 14186 semelhante a *B. ferriligni*. Além disso, outras três estirpes não puderam ser agrupadas com espécies já descritas dentro do gênero *Bradyrhizobium*, entre elas, destaca-se a BR 14182. As estirpes de referência positivas, BR 3101 foram semelhantes a *B. elkanii* e BR 5350 a *B. denitrificans* (Figura 4).

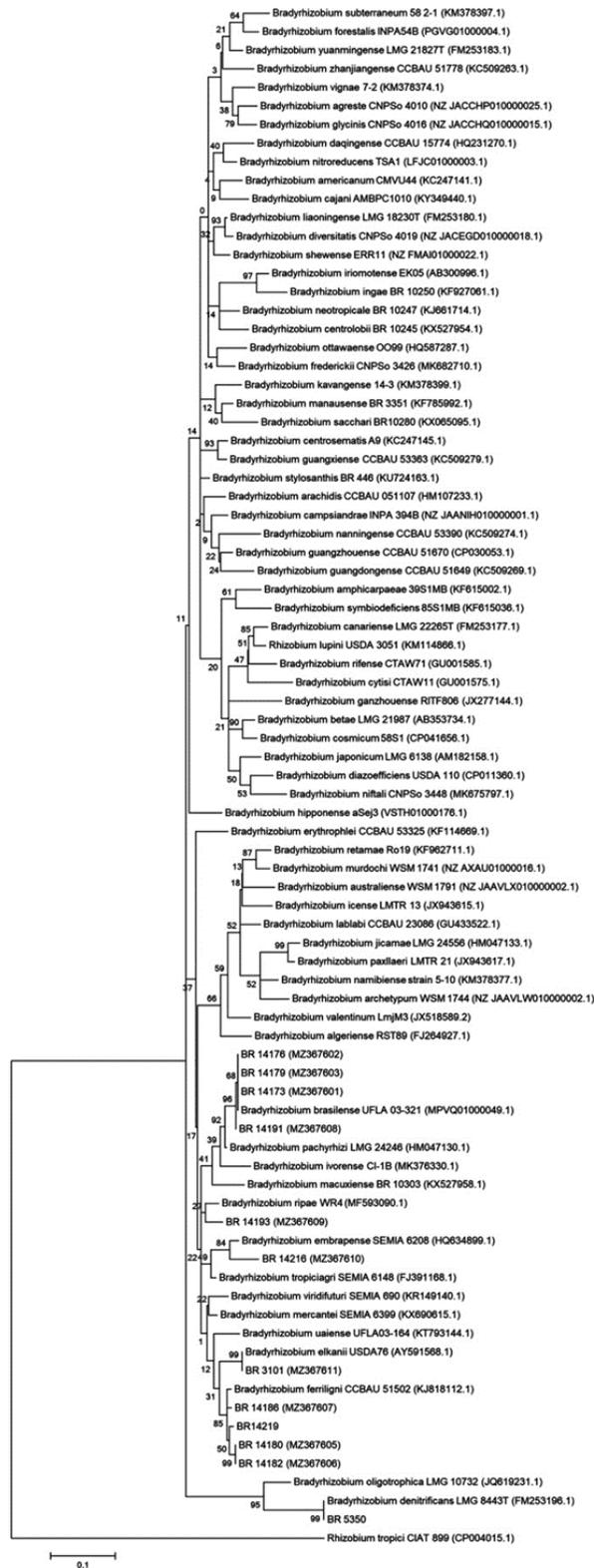
Em estudos de filogenia, o sequenciamento do gene 16S rRNA tem limitações para diferenciar entre espécies próximas dentro do gênero *Bradyrhizobium* (WILLEMS; COOPMAN; GILLIS, 2001) e estudos complementares com vários genes metabólicos (manutenção), por exemplo, recA pode ser usado para detalhamento em nível de espécie (ORMEÑO-ORRILLO; MARTÍNEZ-ROMERO, 2019).

O sequenciamento do gene de recA confirmou que as estirpes indígenas de *Macrotyloma axillare* (Figura 4) exibem potencial para novas espécies. No entanto, uma caracterização genética adicional realizada com base na análise de sequência de múltiplos locus (MLSA) ou tipagem de sequência de múltiplos locus (MLST) de genes de manutenção que codificam proteínas são necessários (CHIBEBA et al., 2017).

Plantas de *Macrotyloma axillare* são consideradas bastante promíscuas quanto à nodulação com rizóbio (HASSEN; BOPAPE; TRYTSMAN, 2014), mas nossos resultados revelaram que há uma ocorrência restrita do superclado *B. elkanii*. A maioria delas era semelhante a *B. brasilense* (3 estirpes), seguida por *B. pachyrizi*, *B. embrapense*, *B. ripae* e *B. ferriligni* (Figura 4).

Além da ocorrência do nódulo de *M. axillare*, *B. brasilense* foi descrito nodulando feijão-caupi (*V. unguiculata*) e *Macroptilium atropurpurem* (COSTA et al., 2017), enquanto *B. embrapense* nodulando *Grona heterocarpa*, uma forragem tropical (DELAMUTA et al., 2015). Além disso, *B. pachyrizi* foi encontrada nodulando *Pachyrizus erosus* (DELAMUTA et al., 2015), *B. ripae* em leguminosas selvagens da Namíbia (BÜNGER et al., 2018) e *B. ferriligni* de nódulos da árvore *Erythropheleum fordii* apresentada na China, Taiwan e Vietnã (YAO et al., 2015).

O recA provou ser eficiente no posicionamento taxonômico da estirpe BR 3101 como *B. elkanii*.



**Figura 4.** Árvore filogenética baseado nas sequências de recA rRNA gene (~ 500 pb), incluindo as bactérias-tipo depositadas no banco de dados NCBI. A filogenia foi baseada no grupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e o modelo Kimura utilizando o programa MEGA 6.1. Números localizados nos ramos indicam que a porcentagem de 1000 sub-amostras (bootstrap). A escala representa o número de mutações pela posição dos nucleotídeos.

#### 4.5.4 Eficiência simbiótica das estirpes bacterianas em macrotiloma

A maioria das estirpes selecionadas foram capazes de nodular *M. axillare* sob condição axênica. As plantas inoculadas com BR 14182 apresentaram 124 nódulos planta<sup>-1</sup> e 65,8 mg nódulos planta<sup>-1</sup> (Tabela 13), enquanto a média geral dessas variáveis foi de 77 nódulos planta<sup>-1</sup> e 37 mg nódulo planta<sup>-1</sup> entre as estirpes.

BR 14182 e BR 5350 forneceram mais de 42 mg de N acumulado nos tecidos da parte aérea. Por outro lado, BR 3101 e BR 14173 não foram capazes de formar uma associação simbiótica efetiva com *Macrotyloma axillare*, fornecendo menos de 0,9 mg de N acumulado na parte aérea (Tabela 13).

A inoculação proporcionou ganhos em MSPA e MSR em relação ao tratamento não inoculado, exceto para BR 3101, BR 14173, BR 14180 e BR 14193 (Tabela 13). Porém, nenhuma das plantas inoculadas atingiu biomassa semelhante à acumulada em plantas fertilizadas com dose equivalente a 105 kg N ha<sup>-1</sup> de N mineral (Tabela 13).

**Tabela 13.** Número de nódulos (NN), massa seca de nódulo (MSN), nitrogênio acumulado na parte aérea (N), massa seca de raiz (MSR) e massa seca de parte aérea (MSPA), de *M. axillare* inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium* em um experimento em casa-de-vegetação.

Tratamento	NN <sup>a,b</sup> NN planta <sup>-1</sup>	MSN <sup>a,b</sup> mg N planta <sup>-1</sup>	N	MSR	MSPA g planta <sup>-1</sup>	MST
Controle	--	--	0,7 c	0,03 c	0,05 c	0,08 c
N mineral <sup>d</sup>	--	--	95,1 a	0,47 a	3,78 a	4,25 a
BR 3101	72 a	15,3 b	2,2 c	0,04 c	0,11 c	0,14 c
BR 5350	67 a	56,0 a	29,2 b	0,18 b	1,38 b	1,57 b
BR 14173	94 a	12,5 b	1,5 c	0,04 c	0,10 c	0,14 c
BR 14176	116 a	28,0 b	27,2 b	0,16 b	1,00 b	1,16 b
BR 14179	39 a	30,1 b	15,4 b	0,13 b	0,84 b	0,97 b
BR 14180	51 a	20,4 b	8,0 c	0,07 c	0,42 c	0,50 c
BR 14182	124 a	65,8 a	20,3 b	0,19 b	1,47 b	1,65 b
BR 14186	60 a	43,3 b	26,8 b	0,18 b	1,14 b	1,32 b
BR 14191	70 a	32,1 b	23,2 b	0,15 b	0,99 b	1,15 b
BR 14193	67 a	20,8 b	18,5 b	0,09 c	0,61 c	0,70 c
BR 14216	102 a	68,0 a	19,2 b	0,14 b	0,94 b	1,08 b
BR 14219	114 a	47,8 a	22,4 b	0,13 b	0,87 b	1,00 b

<sup>a</sup> Valores médios ( $n = 3$ ) seguidos pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ); <sup>b</sup> “Controle” e “N mineral” foram excluídos da análise porque não havia nódulos nas raízes.

<sup>c</sup> 250 mg NO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>.

Os resultados do presente estudo mostraram que os microssimbiontes em *Macrotyloma axillare* estão intimamente relacionados ao gênero *Bradyrhizobium* spp. Todos os isolados tinham características morfológicas semelhantes ao gênero *Bradyrhizobium*, ou seja, crescimento lento e reação alcalina em meios de cultura contendo manitol como fonte de carbono (JORDAN, 1982), também confirmado por caracterização genética (Figura 3 e Figura 4). Existe uma alta diversidade de espécies de *Bradyrhizobium* em nódulos de *Macrotyloma axillare*.

As estirpes nativas obtidas em nosso estudo foram mais eficazes do que a estirpe BR 3101 isolada de *Galactia striata* e recomendada pelo MAPA (Ministério da Agricultura do

Brasil) para as espécies *Galactia striata* e *Macrotyloma axillare* que supostamente eram altamente eficientes (MENNA et al., 2006).

Um resultado semelhante foi encontrado para a estirpe CB 756 (um inóculo comercial de feijão-caupi da África); O rendimento de *M. axillare* foi mais alto quando inoculado com CB 756, não com CB 1024 ou NA 800/1. No entanto, alguns tipos de colônias de CB 756 são ineficazes e, por isso, CB 1024 foi recomendado para a inoculação de *M. axillare* na Austrália (HERRIDGE; ROUGHLEY, 1976; BLUMENTHAL; STAPLES, 1993). Esse fenômeno também ocorre com outras espécies de plantas, como em *Arachis pintoi*, onde a maioria das estirpes nativas isoladas foram consideradas mais eficientes na nodulação e promoção do crescimento das plantas do que as estirpes atualmente aprovadas como inoculantes para a cultura (SÁ et al., 2019).

Nem todos os microssimbiontes apresentam a mesma capacidade de converter o nitrogênio fixado em acúmulo de biomassa, apesar dos resultados promissores, os isolados apresentam uma eficiência relativa baixa, sendo o maior valor encontrado para a estirpe BR 14182 (38%), nas condições estudadas. A biomassa da parte aérea do tratamento nitrogenado foi discrepante em função da alta dose de nitrogênio aplicada sendo que na condição de vaso Leonard (sistema fechado), as perdas por volatilização e desnitrificação são minimizadas.

Estudos sobre *Medicago truncatula* / *Sinorhizobium* (LAGUERRE et al., 2012) e ervilha / *Rhizobium leguminosarum* (WESTHOEK et al., 2017) mostraram que bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> ineficientes podem ser tão compatíveis e competitivas quanto bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> eficientes. Consequentemente, bactérias ineficientes estão frequentemente presentes em uma porção dos nódulos da planta hospedeira (BOIVIN; LEPETIT, 2020). Portanto, a planta e o inoculante para uma associação simbiótica melhorada devem ser selecionados não apenas na eficiência de fixação de N<sub>2</sub>, mas também na competitividade para nodulação (BOURION et al., 2018).

Experimentos sob condições axênicas, por exemplo, vasos de Leonard, são uma boa alternativa para a seleção de estirpes eficazes no acúmulo de N e matéria seca em plantas. Além disso, as linhagens eficazes também devem ser competitivas na colonização e no estabelecimento da simbiose nas condições do solo.

BR5350 intimamente relacionada a *B. denitrificans* foi capaz de nodular e promover ganhos de biomassa em *M. axillare* (Tabela 14). A estirpe BR5350 (BTAi1) foi originalmente isolada do caule da leguminosa aquática *Aeschynomene indica* na África e América do Norte e nodulou raízes e caules de *A.indica* (EAGLESHAM; SZALAY, 1983). Esta estirpe, que compreende bactérias fotossintéticas é simbiótica sem os genes nodABC e fatores Nod (lipochito-oligossacarídeos) (VAN BERKUM; LEIBOLD; EARDLY, 2006; GIRAUD et al., 2007) e sua simbiose é restrita a algumas espécies, incluindo *A. sensitiva* e *A. indica* (GIRAUD; FLEISCHMAN, 2004).

*Macrotyloma* spp. geralmente é efetivamente nodulado por *Bradyrhizobium* do grupo de feijão-caupi não especializado (TRINICK, 1982) e nodula efetivamente com a estirpe comercial CB1024 de *Bradyrhizobium*, também recomendado para *Lablab purpureus* e *Cajanus cajan* (COOK et al., 2005). Este resultado expande as possibilidades de estudos usando outras estirpes elite que beneficiem o *Macrotyloma axillare*.

#### 4.5.5 Avaliação de competitividade dos rizóbios simpátricos e alopátricos

A inoculação com rizóbios promoveu maior biomassa na parte aérea e nodulação em relação ao tratamento não inoculado e ao nitrogênio, exceto para a estirpe BR14191.

A nodulação na parte superior da raiz principal foi observada apenas em plantas inoculadas com estirpes de *M. axillare* (simpátricas). Porém, apenas BR3101 promoveu diferença na massa seca do nódulo (Tabela 14). Surpreendentemente, a inoculação com BR

3101 apresentou boa competitividade com bactérias do solo. Não houve diferença estatística na variável MSR.

Experimentos sob condições axênicas, por exemplo, vasos Leonard, são uma boa alternativa para a seleção inicial de estirpes bacterianas eficazes no acúmulo de N e matéria seca em plantas. Além disso, as estirpes eficazes também devem ser competitivas na colonização e no estabelecimento da simbiose em condições de solo. De fato, estudos sobre *Medicago truncatula* / *Sinorhizobium* (LAGUERRE et al., 2012) e ervilha / *Rhizobium leguminosarum* (WESTHOEK et al., 2017) mostraram que bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> ineficientes podem ser tão compatíveis e competitivas quanto bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> eficientes. Conseqüentemente, bactérias ineficientes estão frequentemente presentes em uma porção dos nódulos da planta hospedeira (BOIVIN; LEPETIT, 2020). Portanto, a planta e o inoculante para uma associação simbiótica melhorada devem ser selecionados não apenas com base na eficiência de fixação de N<sub>2</sub>, mas também na competitividade para a nodulação (BOURION et al., 2018).

O efeito da inoculação no acúmulo de N da planta também foi observado para todos os isolados, exceto para a estirpe BR5350, que não teve efeito significativo em relação aos tratamentos não inoculados ou fertilizados com N (Tabela 14).

Como planta de referência não fixadora de N<sub>2</sub>, o milho apresentou +6,25 unidades delta de <sup>15</sup>N (‰), significativamente superior aos tratamentos com leguminosas inoculadas, sendo que o tratamento não inoculado apresentou a maior abundância natural de <sup>15</sup>N (Tabela 15). Com base na técnica de abundância natural de <sup>15</sup>N, as estirpes BR3101, BR14176 e BR14182 resultaram em uma maior FBN, mas não superior a 43%. O menor desempenho foi observado nas plantas não inoculadas juntamente com as inoculadas com as demais estirpes. O acúmulo de N nas plantas foi dependente do N derivado da FBN. Apenas o tratamento inoculado com BR5350 não apresentou acúmulo de N significativamente maior do que as plantas não inoculadas.

**Tabela 14.** Avaliação da competitividade rizobiana no número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), nitrogênio acumulado na parte aérea (N), massa seca de raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA) de *M.axillare* inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium* sp. em um experimento em vaso Leonard modificado.

Tratamento	NN	MSN	MSR	MSPA
	NN planta <sup>-1</sup>	mg planta <sup>-1</sup>	g planta <sup>-1</sup>	
Controle	10 b	15,1 b	0,14 a	0,61 b
N Minerala	7 b	18,4 b	0,19 a	0,52 b
BR 3101	18 a	59,4 a	0,22 a	1,47 a
BR 5350	13 a	20,3 b	0,17 a	1,24 a
BR 3262	15 a	21,9 b	0,15 a	1,42 a
BR 14176	13 a	34,0 b	0,16 a	1,05 a
BR 14182	12 a	12,6 b	0,17 a	1,23 a
BR 14219	14 a	23,8 b	0,19 a	1,16 a
Média	12	25,5	0,18	0,91
CV (%)	12	58	20	20

Valores médios (n = 4) seguidos pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P ≤ 0,05). <sup>a</sup> 100 mg NO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>.

**Tabela 15.** Abundância Natural ( $^{15}\text{N}$ ), Percentual de nitrogênio derivado da fixação (Ndfa), N total acumulado na parte aérea (N), e nitrogênio derivado da fixação biológica de nitrogênio (N FBN) de *M. axillare* inoculado com estirpes de *Bradyrhizobium*.

Tratamento	$^{15}\text{N}$	Ndfa	N	N FBN
	$\delta^{15}\text{N}$	%	mg planta <sup>-1</sup>	mg planta <sup>-1</sup>
Não inoculado	4,92 a	18,18 b	30,14 b	6,05 b
N Mineral <sup>a</sup>	-	-	31,67 b	-
BR 3101	3,23 b	40,25 a	75,15 a	30,76 a
BR 5350	4,53 a	23,33 b	48,57 b	11,32 b
BR 3262	4,12 a	28,65 b	75,47 a	21,51 a
BR 14176	3,03 b	42,70 a	55,63 a	24,47 a
BR 14182	4,02 a	29,87 b	64,35 a	20,02 a
BR 14219	3,55 b	35,98 a	57,71 a	20,07 a
CV (%)	9	19	9	47

Valores médios ( $n = 4$ ) seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste Scott-Knott ( $P \leq 0.05$ ); \*Planta referência Milheto (*Pennisetum glaucum*).

## 4.6 CONCLUSÕES

*Bradyrhizobium* foi o único gênero encontrado dentro de nódulos radiculares de *Macrotyloma axillare*, *Arachis pintoi* e *Grona heterocarpa*. Alguns dos isolados de *M. axillare*, ainda não descritos dentro das espécies de *Bradyrhizobium*, tem o potencial de serem identificadas como novas espécies.

O consórcio rizobiano não se mostrou eficaz quando inoculado em *A. pintoi* e *G. heterocarpa*. A estirpe BR1432 foi a mais eficiente entre os tratamentos testados em *A. pintoi* e as estirpes rizobianas oriundas da coleção de culturas CRB foram mais eficientes que o consórcio de isolados e tão eficientes quanto a estirpe recomendada BR 2217 para *G. heterocarpa* em acumular N na parte aérea destas plantas.

Entre as estirpes testadas como inoculante para *M. axillare*, a BR 3101 apresenta melhor desempenho em condições não axênicas, mas é de baixa eficácia em condições axênicas, o oposto é verdadeiro para a estirpe BR5350. Mesmo que tais estirpes não possam ser descartadas, os isolados BR 14176, BR 14182 e BR 14219 são boas candidatas para compor um inoculante para esta leguminosa, pois apresentaram boa nodulação e promoveram acúmulo de biomassa e N sob condições axênicas e não axênicas.

## **5. CAPÍTULO III**

### **INOCULAÇÃO DE CONSÓRCIOS DE MICRORGANISMOS EM LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS**

## 5.1 RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar consórcios microbianos nas leguminosas forrageiras *Arachis pintoi*, *Grona heterocarpa* e *Macrotyloma axillare*. Foram realizados 5 experimentos independentes em vasos com solo, em casa de vegetação. Os 3 primeiros experimentos foram realizados utilizando estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para *A. pintoi*, *G. heterocarpa*, *M. axillare*, inoculação mista com *Azospirillum brasilense* estirpe Abv5 e Abv6 e/ou *Torulaspora indica* estirpes BR14769 e BR14774. O quarto experimento (*M. axillare*) foi realizado com os seguintes tratamentos: a estirpe BR 14193 foi selecionada com base na alta eficiência simbiótica, estirpe BR3101, a inoculação mista com BR3101 ou BR14193 e as estirpes Abv5 e Abv6, um controle não inoculado e tratamento com nitrogênio (150kg N ha<sup>-1</sup>) também foram incluídos. O quinto experimento foi conduzido com a inoculação cruzada de consórcios de estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para *A. pintoi* cv. Mandobi, *G. heterocarpa* cv. Itabela, *M. axillare* cv. Java e *Cajanus cajan* cv. Guatã e co-inoculadas com *Azospirillum baldaniorum* BR11005 em delineamento em blocos ao acaso, em esquema fatorial duplo 4 x 10 (Leguminosas, Inoculação) +2 (Testemunha absoluta, Testemunha nitrogenada). As plantas foram colhidas aos 60 dias após o plantio (DAP) nos 4 primeiros experimentos e aos 40 DAP e 70 DAP no quinto experimento, avaliou-se a massa seca da parte aérea (MSPA), a massa seca da raiz (MSR), nodulação (NN), a massa seca do nódulo (MSN) e o acúmulo de nitrogênio na parte aérea (N) e o delta <sup>15</sup>N da parte aérea. *M. axillare* foi a leguminosa forrageira mais promissora das leguminosas avaliadas. A coinoculação da estirpe BR3101 e a coinoculação de Abv5 e Abv6 promovem maior nodulação e massa seca do nódulo em *Macrotyloma axillare*, entretanto a inoculação da BR 14193 apresentou desempenho superior na massa seca de raízes e nódulos quando inoculada sozinha e os consórcios de *Bradyrhizobium* e *A. brasilense* atingiram 143% (MSR) e *Bradyrhizobium*, *A. brasilense* e *T. indica* atingiram 22% (MSPA) do que o tratamento não inoculado, respectivamente. A média de nódulos foi de 115 planta<sup>-1</sup>, exceto para o tratamento *Bradyrhizobium* sp., *T. indica* e *A. brasilense*, que atingiu 211 nódulos planta<sup>-1</sup>, embora o MSN não tenha diferido entre os tratamentos. Em contraste, apenas pequenos efeitos foram observados para *G. heterocarpa* e *A. pintoi*. Este estudo sugere que consórcios microbianos podem diretamente promover o crescimento das raízes.

**Palavras-chave:** desmódio. Coinoculação. Amendoim-forrageiro. Microrganismos. macrotiloma.

## 5.2 ABSTRACT

This work aimed to evaluate microbial consortia in forage legumes *Arachis pintoii* cv. Mandobi, *Grona heterocarpa* cv. Itabela, and *Macrotyloma axillare* cv. Java. Four independent experiments were carried out in a greenhouse. The first 3 experiments were performed using *Bradyrhizobium* strains recommended for *A. pintoii*, *G. heterocarpa*, *M. axillare*, mixed inoculation with *Azospirillum brasilense* strains Abv5 and Abv6 and/or *Torulaspora indica* strains BR14769 and BR14774, in a randomized block design with 5 repetitions. The fourth experiment (*M. axillare*) was performed with the following treatments: strain BR 14193, selected based on the high symbiotic efficiency, BR3101, mixed inoculation with BR3101 or BR14193 and the strains Abv5 and Abv6, a control without inoculation and a nitrogen treatment were also included (150 kg N ha<sup>-1</sup>). The fifth experiment is being conducted with cross-inoculation of consortia of *Bradyrhizobium* strains recommended for *A. pintoii* cv. Mandobi, *G. heterocarpa* cv. Itabela, *M. axillare* cv. Java and *Cajanus cajan* cv. Guatã and co-inoculated with *Azospirillum baldaniorum* strain BR11005 in a randomized block design, in a 4 x 10 double factorial scheme (Legume, Inoculation) +2 (Absolute Control, Nitrogen Control) with 4 replications. The plants were harvested at 60 days after planting (DAP) in the first 3 experiments and at 30 DAP in the fourth experiment, shoot dry matter (MSPA), root dry matter (MSR), nodulation (NN), the nodule dry matter (MSN) and the accumulation of nitrogen in the shoot (N). *Macrotyloma axillare* was the most promising forage legume. The co-inoculation of *Bradyrhizobium* spp. strain 3101 and *A. brasilense* strain Abv5 and Abv6 promote higher nodulation and nodule dry matter in *Macrotyloma axillare*, however, the same behavior was not observed for the BR 14193 strain, which presented superior performance in the root and nodule dry matter in the single inoculation. There was difference among inoculation treatments and uninoculated treatment for most variables. and the consortia of *Bradyrhizobium*, *A. brasilense* reached 143% (MSR) and *Bradyrhizobium*, *A. brasilense* and *T. indica* reached 22% (MSPA) than the uninoculated treatment, respectively. The mean number of nodules was 115 plant<sup>-1</sup>, except for the treatment *Bradyrhizobium* sp., *T. indica*, and *A. brasilense*, which reached 211 nodules plant<sup>-1</sup>, although MSN did not differ among treatments. In contrast, only small effects were observed for *G. heterocarpa* and *A. pintoii*. This study suggests that microbial consortia can directly promote root growth.

**Keywords:** Asian tick trefoil. Co-inoculation. Forage-peanut. Microorganisms. Perennial horsegram.

### 5.3 INTRODUÇÃO

As leguminosas forrageiras são conhecidas por serem colonizadas por rizóbios indígenas de baixa eficácia no solo. No entanto, um melhor desempenho de campo pode ser alcançado pela inoculação de consórcios microbianos devido ao seu efeito sinérgico e características multifuncionais, criando mais locais para colonização precoce de raízes e formação de nódulos por *Bradyrhizobium* spp.

A fixação biológica de nitrogênio atmosférico é uma alternativa ao uso de adubos sintéticos e é realizada por microrganismos procarióticos conhecidos como diazotróficos. Os estudos com bactérias diazotróficas são de grande importância, devido à contribuição destas para o fornecimento de nitrogênio a diversos ecossistemas, natural ou manejado (Moreira *et al.*, 2010).

Além da fixação biológica de nitrogênio (FBN), esses microrganismos são capazes de produzir substâncias reguladoras de crescimento vegetal, solubilizar nutrientes, atuar no biocontrole através da produção de sideróforos, além de poderem influenciar o metabolismo nitrogenado da planta, sendo consideradas também como microrganismos promotores do crescimento de plantas (BALDANI; BALDANI, 2005; MOREIRA *et al.*, 2010; HUNGRIA, 2011; JAMES; BALDANI, 2012; ROSIER; MEDEIROS; BAIS, 2018). Dentre as substâncias reguladoras de crescimento vegetal produzidas por eles, destaca-se a síntese de ácido indol acético e de outros compostos indólicos (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

As leguminosas forrageiras são conhecidas por serem infectadas por rizóbios indígenas de baixa eficácia no solo. No entanto, um melhor desempenho de campo pode ser alcançado pela inoculação de consórcios microbianos devido ao seu efeito sinérgico e características multifuncionais - criando mais locais para infecção precoce de raízes e formação de nódulos por *Bradyrhizobium* spp.

Paciullo *et al.* (2003) avaliaram a produção e a qualidade da massa de forragem de *Brachiaria decumbens* em monocultivo e consorciada com *Stylosanthes guianensis* e observaram que a utilização da leguminosa contribui para o aumento da quantidade e melhoria da qualidade da forragem disponível. Resultados semelhantes foram obtidos por Schunke *et al.* (2000), que apontaram um aumento de até 35% no crescimento da *Brachiaria* e aumento de 16,4% do N presente na palha produzida.

A coinoculação consiste na inoculação conjunta de 2 ou mais bactérias e vem sendo estudada em leguminosas com resultados positivos, a exemplo do feijão-comum (HUNGRIA *et al.*, 2013; JESUS *et al.*, 2018) e da soja (HUNGRIA, 2011; HUNGRIA; MENNA; DELAMUTA, 2015). As estirpes quando coinoculadas podem resultar numa melhoria da simbiose, como estímulo da nodulação através da produção de flavonóides e isoflavonóides (BURDMAN; KIGEL; OKON, 1997), aumento da resistência a condições adversas como seca, salinidade e compostos tóxicos (BASHAN; DE-BASHAN, 2010); além de serem capazes de melhorar a saúde da planta e/ou aumentar a produtividade quando coinoculadas com a estirpe rizobiana (DE LA FUENTE ET AL., 2002; ANNAPURNA *et al.*, 2013; TARIQ *et al.*, 2014).

Além da estirpe responsável pela formação dos nódulos (estirpe nodulante), já foram identificados cerca de 50 diferentes gêneros que habitam também o tecido nodular (DE MEYER *et al.*, 2014). Os gêneros nodulantes compreendem os rizóbios “tradicionais”: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* ou *Rhizobium* (SAWADA; KUYKENDALL; YOUNG, 2003) ou os novos rizóbios que compreendem outros gêneros de Alphaproteobacterias ou gêneros de Betaproteobacterias, os beta-rizóbios, como *Burkholderia* e *Cupriavidus* (DE MEYER *et al.*, 2014).

Além das estirpes nodulantes, observa-se um grupo altamente diverso de endofíticos não rizobianos formado por gêneros gram-negativos de proteobacterias das classes Alpha, Beta e Gama (ASERSE *et al.*, 2013) e gêneros gram-positivos de actinobactérias e firmicutes

(PALANIAPPAN et al., 2010; DENG et al., 2011). De Meyer et al. (2014) listou os gêneros *Bacillus* (17,5%), *Paenibacillus* (12,5%) e *Pseudomonas* (15,9%) como sendo os mais comuns entre aqueles identificados no interior dos nódulos. Estas bactérias são reconhecidas por apresentarem promoção de crescimento através de vários mecanismos principalmente em plantas não-leguminosas.

As bactérias diazotróficas podem estabelecer simbiose, ser de vida livre ou associativa. Bactérias associativas como *Azospirillum brasilense*, além do fornecimento de N, também possuem outros mecanismos promotores de crescimento vegetal, ou seja, fitohormônios, solubilização de fosfato, antagonismo de fitopatógenos, entre outros (moreira et al., 2010).

Leveduras são fungos unicelulares que estão naturalmente presentes na superfície das plantas, podem se reproduzir rapidamente e ocupar competitivamente os sítios de infecção fúngica em plantas (EL-TARABILY e SIVASITHAMPARAM, 2006) e podem promover o crescimento e desenvolvimento da planta (EL-TARABILY, 2004; NUTARATAT et al., 2014). Nesse caso, a promoção do crescimento ocorre principalmente por meio da produção de fitohormônios, como auxinas, giberelinas, citocininas e da regulação dos níveis de etileno nas plantas (MOREIRA, 2010), estimulando associações micorrízicas, solubilização de fósforo e formação de complexos minerais com diferentes elementos como como alumínio ( $Al^{+3}$ ) e ferro ( $Fe^{+3}$ ), tornando-o imobilizado no solo (SARABIA et al., 2018).

O benefício da inoculação de consórcios de rizóbios simbióticos e PGPM no aumento da produtividade, antecipando a nodulação e tolerância à seca já é conhecido em plantas agrícolas, por exemplo, soja, feijão comum (HUNGRIA et al., 2015; CERZINI et al., 2016; JESUS et al., 2018; CARVALHO et al., 2020), feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) (GALINDO et al., 2020a, 2021), amendoim (*Arachis hypogaea* L.) (SILVA et al., 2017; FREITAS et al., 2020; GERICÓ et al., 2020) e alfafa (*Medicago sativa* L.) (SILVA et al., 2021). No entanto, a contribuição do MPCV para forrageiras de leguminosas tropicais ainda não é conhecida.

No entanto, existem poucos estudos sobre a seleção de biofertilizante a base de rizóbios e de MPCV em leguminosas forrageiras. O objetivo deste capítulo foi selecionar rizóbios eficientes na fixação biológica de nitrogênio e avaliar a viabilidade do consórcio de microrganismos promotores de crescimento vegetal em *A. pintoii*, *G. heterocarpa* e *M. axillare*.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a inoculação de *Bradyrhizobium* e MPCV em leguminosas forrageiras tropicais.

## 5.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.4.1 Consórcio de Microrganismos Promotores de Crescimento em Leguminosas Forrageiras em Casa-de-Vegetação

Todos os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação em condição não estéril na Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ (22° 44'38'' S e 43° 42'28'' W, 26 m de altitude). Foram utilizados vasos de polietileno preenchidos com 5 kg de solo oriundo do horizonte superficial (0-20 cm) de um Argissolo que teve sua acidez corrigida 30 dias antes do plantio, e com base na análise química de terra (Tabela 16) todos os vasos receberam 500 kg ha<sup>-1</sup> de calcário dolomítico e de suplementação de macronutrientes (80 mg kg de solo de K<sub>2</sub>O na forma de KCl; 80 mg kg de solo de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> na forma de Superfosfato simples e 500 mg kg de solo de Ca na forma de gesso agrícola) e ainda foi realizada uma adubação para a reposição de micronutrientes (FRANCO & DÖBEREINER, 1964), de acordo com a necessidade das leguminosas forrageiras tropicais utilizadas no estudo e em condição de vaso.

**Tabela 16.** Análise de fertilidade do solo proveniente de um Argissolo utilizado como substrato nos experimentos de coinoculação de microrganismos promotores de crescimento vegetal em casa de vegetação em Seropédica, RJ.

Ph	C	N	Al	Ca	Mg	K	P
	%			cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>		Mg L <sup>-1</sup>	
5,30	1,08	0,12	0,05	1,97	1,46	52,05	5,88

Utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso com 5 repetições para os ensaios com *Arachis pintoi* cv. Mandobi, *Grona heterocarpa* cv. Itabela e *Macrotyloma axillare* cv. Java (Figura 5).

As plantas foram inoculadas com a(s) estirpe(s) rizobiana(s) recomendada(s) para as espécies vegetais utilizadas e co-inoculadas com leveduras e/ou bactérias promotoras de crescimento vegetal: as leveduras LA24 e LF22 (*Torulaspora indica*) isoladas de plantas de arroz e feijão, respectivamente, e gentilmente cedidas por Kerly Martinez Andrade, *Azospirillum brasilense* (Abv5 e Abv6) e um tratamento com o consórcio dessas estirpes de leveduras e bactérias. Foram ainda adicionados os seguintes tratamentos como forma de comparação: uma testemunha absoluta (sem inoculação) e um tratamento controle apenas com a inoculação da estirpe rizobiana recomendada.

As sementes foram desinfestadas através de imersão em álcool 70% por 60 segundos e posteriormente em peróxido de hidrogênio por 3 minutos, seguido de 10 lavagens em água destilada estéril (VINCENT, 1970).

Foi utilizado o inoculante turfoso como veículo das bactérias nodulantes (BN) oriundo da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia que apresentava número de UFC superior a 10<sup>9</sup> no momento da inoculação. Os microrganismos promotores de crescimento vegetal tiveram como veículo o inoculante líquido.

As estirpes de leveduras LA22 e LF24 foram crescidas em erlenmeyer com 250 ml de meio líquido YEPD (Glicose (1%), peptona (0,5%), extrato de levedura (0,3%) e extrato de malte (0,3%) em shaker por 48h sob uma agitação constante de 160 rpm e 30° C. A contagem de células de leveduras foi realizada com o auxílio da câmara de Neubauer e apresentaram 4,4 x 10<sup>8</sup> células ml de inoculante no momento da inoculação.

As estirpes de *Azospirillum brasilense* utilizadas no experimento tiveram duas origens distintas. As utilizadas no tratamento de coinoculação com o rizóbio foram produzidas pela coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia e apresentavam 1,54 x 10<sup>9</sup> UFC ml<sup>-1</sup> de inoculante

enquanto o tratamento com inoculação mista (Rizóbio, estirpes de Leveduras e *Azospirillum brasilense*) foi gentilmente cedido pela empresa de Inoculantes Nitrobacter® e apresentavam número de UFC superior a  $10^9$  UFC ml de inoculante<sup>-1</sup>, conforme especificações do fabricante.

A inoculação com rizóbio foi realizada nas sementes de leguminosas forrageiras utilizadas, sendo inicialmente inoculadas na forma de inoculante turfoso seguindo a recomendação de 50 g de Turfa para 10 kg de sementes de *Arachis pintoi* cv. Mandobi e de 50g de turfa para 2 kg de sementes para *Macrotyloma axillare* cv. Java e *Grona heterocarpa* cv. Itabela contendo uma concentração superior a  $10^9$  UFC g de turfa<sup>1</sup>. Após 30 minutos da inoculação com rizóbio foi realizada a coinoculação das leveduras em inoculante líquido e das estirpes de *Azospirillum brasilense*.

O plantio foi realizado em 05/02/2020 sendo semeadas 6 sementes por vaso no experimento com e 10 sementes por vaso no experimento com *Macrotyloma axillare* e *Grona*, com posterior desbaste permanecendo 1 plântula de *Arachis pintoi*, 2 plântulas de *Grona heterocarpa* e 2 plântulas de *Macrotyloma axillare*.



**Figura 5.** Vista parcial dos experimentos em delineamento em blocos ao acaso aos 30 dias após o plantio.

A temperatura e umidade da casa de vegetação durante a condução do experimento foi monitorada com o auxílio do equipamento Data Logger de Temperatura e Umidade EzTemp-10 do fabricante Minipa e apresentou temperatura média de 26,5° C e umidade relativa média de 74,1%.

A coleta das plantas foi realizada aos 60 dias e a biomassa foi seca em estufa a 65 °C até atingir massa constante, para obtenção da massa seca de nódulos (MSN), de raiz (MSR) e de parte aérea (MSPA), teor de Ntotal e de <sup>15</sup>N da parte aérea. A parte aérea foi seca em estufa, moída em moinho tipo Wiley e quantificados o nitrogênio derivado da FBN através da técnica

da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  para *M. axillare* por ter sido responsiva a inoculação. A FBN será calculada utilizando a equação para a técnica de abundância natural de  $^{15}\text{N}$ , segundo a metodologia proposta por Unkovich et al. (2008).

$$\%Ndfa = \frac{(\delta^{15}\text{N}_{PTNF} - \delta^{15}\text{N}_{PTF})}{((\delta^{15}\text{N}_{PTNF}) - B)} \times 100$$

Onde %Ndfa é a Porcentagem de N derivado da fixação biológica,  $\delta^{15}\text{N}_{PTNF}$ , o valor de delta  $^{15}\text{N}$  do solo obtido através da planta testemunha utilizada como referência. E  $\delta^{15}\text{N}_{PTF}$  o valor de delta  $^{15}\text{N}$  da espécie forrageira avaliada. B, o valor do fracionamento isotópico de  $^{15}\text{N}$  ao se considerar somente a parte aérea da planta (dados obtidos no Capítulo I para *G.heterocarpa* e *M. axillare*) e conforme a Unkovich et al. (2008) para *A.pintoi*.

#### 5.4.2 Seleção de consórcios rizobianos em leguminosas forrageiras

O quarto experimento também foi desenvolvido na Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ (22° 44' 38'' S e 43° 42' 28'' O, 26 m de altitude).

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com 7 tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos de inoculação consistiram em *Bradyrhizobium* sp. estirpe BR 3101; *Bradyrhizobium* sp. estirpe BR 14193; BR 3101 e *Azospirillum brasilense* (Abv5 e Abv6); BR 3101 e *A. brasilense* (Abv5 e Abv6) e apenas com *A. brasilense*; tratamento controle sem inoculação e tratamento com N (150 kg N ha<sup>-1</sup>). Todos os inoculantes utilizados neste trabalho tinham mais de 10<sup>9</sup> células por ml ou g de inoculante<sup>-1</sup>. Inicialmente, as sementes foram inoculadas com *Bradyrhizobium* spp. estirpe BR 3101 ou BR 14193 utilizando inoculante de turfa, seguindo a recomendação de 50 g de turfa para 2 kg de sementes. Após 30 min de inoculação com rizóbios, foi realizada a inoculação mista de cepas de *Azospirillum brasilense* em inoculante de turfa.

*Macrotiloma axilare* cv. Java foi cultivada em casa de vegetação não estéril com vasos de polietileno preenchidos com 5 kg do horizonte superficial (0-20) de um solo Argissolo (Tabela 16). A adubação, a calagem e a desinfestação foram realizadas conforme o item 6.2.1.

O plantio foi realizado no dia 02 de maio de 2021, com 10 sementes semeadas por vaso e desbaste 14 dias após o plantio, restando apenas 2 plantas por vaso até o final do experimento.

As plantas foram colhidas 60 dias após o plantio. A parte fresca da parte aérea, do nódulo e da raiz foi seca a 65 °C por 48 h seguida de pesagem. Após a secagem, as amostras foram finamente moídas em moinho Wiley (peneiras de 2 mm), e posteriormente as amostras em moinho de rolos conforme descrito por Arnold e Schepers (2004). O N total na parte aérea, bem como os de abundância natural de  $^{15}\text{N}$  foram realizados em um analisador elementar CHN (ECS4010, Costech, EUA) acoplado a um espectrômetro de massa de razão isotópica (Delta V, Thermo Scientific, Alemanha).

#### 5.4.3 Experimento de inoculação cruzada em leguminosas forrageiras

O quinto experimento foi conduzido com a inoculação cruzada de consórcios de estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para *A. pintoi*, *G. heterocarpa*, *M. axillare* e *C. cajan* e co-inoculadas com *Azospirillum baldaniorum* em delineamento em blocos ao acaso, em esquema fatorial duplo 4 x 10 (Leguminosas, Inoculação) +2 (Testemunha absoluta, Testemunha nitrogenada) com 4 repetições (Tabela 17). O experimento foi conduzido em casa de vegetação em condição não estéril na Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. Foram utilizados vasos de polietileno preenchidos com 3 kg de solo oriundo do horizonte superficial (0-20 cm) de um

Argissolo que teve sua acidez corrigida 30 dias antes do plantio, e com base na análise química de terra (Tabela 16) todos os vasos receberam 500 kg ha<sup>-1</sup> de calcário dolomítico e de suplementação de macronutrientes (94,28 mg kg de solo de KCl; 64,06 mg kg de solo de Superfosfato simples e 500 mg kg de solo de Ca na forma de gesso agrícola) e ainda foi realizada uma adubação para a reposição de micronutrientes (FRANCO; DÖBEREINER, 1964), de acordo com a necessidade das leguminosas forrageiras tropicais utilizadas no estudo e em condição de vaso. Foi utilizado o delineamento em blocos ao acaso, com 4 repetições, em esquema fatorial duplo 4 x 10 (Leguminosas, Inoculação) +2 (Testemunha absoluta, Testemunha nitrogenada).

**Tabela 17.** Tratamentos de inoculação cruzada utilizados no experimento.

Tratamentos	Leguminosas Recomendadas
BR 11005 ( <i>A. baldaniorum</i> )	Coinoculação
BR 2003 ( <i>Bradyrhizobium</i> sp.)	<i>Cajanus cajan</i>
BR 3101( <i>Bradyrhizobium</i> sp.)	<i>Macrotiloma axillare</i>
BR 2217 ( <i>Bradyrhizobium</i> sp.)	<i>Grona heterocarpa</i>
BR 1432 ( <i>Bradyrhizobium</i> sp.)	<i>Arachis pintoi</i>
BR 1432+BR 2217	<i>A. pintoi</i> e <i>G. heterocarpa</i>
BR 1432+BR 3101	<i>A. pintoi</i> e <i>M. axillare</i>
BR 1432+BR 2003	<i>A. pintoi</i> e <i>C. cajan</i>
BR 2217+BR 3101	<i>G. heterocarpa</i> e <i>M. axillare</i>
BR 2217+BR 2003	<i>G. heterocarpa</i> e <i>C. cajan</i>
BR 3101+BR 2003	<i>M. axillare</i> e <i>C. cajan</i>

As plantas foram inoculadas com a(s) estirpe(s) rizobiana(s) recomendada(s) para as espécies vegetais utilizadas e co-inoculadas com *Azospirillum brasilense* Sp 245. Serão ainda adicionados os seguintes tratamentos como forma de comparação: uma testemunha absoluta (sem inoculação), uma testemunha nitrogenada com nitrato de amônio (150 kg de N. ha<sup>-1</sup>).

As sementes foram desinfestadas através de imersão em álcool 70% por 60 segundos e posteriormente em peróxido de hidrogênio por 3 min, seguido de 10 lavagens em água destilada estéril (VINCENT, 1970). Foi utilizado o inoculante líquido como veículo das bactérias oriundo da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia que apresentava número de UFC superior a 10<sup>9</sup> no momento da inoculação.

A inoculação com rizóbio foi realizada nas sementes de leguminosas forrageiras utilizadas, sendo inicialmente inoculadas na forma de inoculante líquido seguindo a recomendação de 50 ml de inoculante para 10 kg de sementes de *Arachis pintoi* cv. Mandobi, 10 kg de sementes de *Cajanus cajan* cv. e de 2 kg de sementes para *Macrotyloma axillare* cv. Java e *Grona heterocarpa* cv. Itabela contendo uma concentração superior a 10<sup>9</sup> UFC ml de inoculante<sup>1</sup>. Após 30 min da inoculação com rizóbio(s) foi realizada a coinoculação com *Azospirillum baldaniorum*. O plantio foi realizado em 13/10/2022 sendo semeadas 10 sementes por vaso de amendoim-forrageiro, desmódio e macrotiloma e 5 sementes de guandu, com posterior desbaste permanecendo 2 plântulas por vaso para guandu, desmódio e macrotiloma e 1 plântula por vaso para amendoim-forrageiro. As coletas das plantas foram realizadas aos 40, aos 70 e 112 dias após o plantio e a biomassa será seca em estufa a 65 °C até atingir massa constante, para obtenção da massa seca de nódulos (MSN), de raiz (MSR) e de parte aérea (MSPA), teor de N total da parte aérea.

#### **5.4.4 Análise estatística**

Os dados dos 5 experimentos foram submetidos aos testes de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias e a análise de variância e a comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade no software R.

## 5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.5.1 Experimentos com consórcios de microrganismos promotores de crescimento em leguminosas forrageiras

A resposta de inoculação dos consórcios microbianos variou entre as espécies de leguminosas forrageiras e a mais promissora foi *M. axillare*.

Plantas de *A. pintoi* coinoculadas com *Bradyrhizobium* sp (BR 1433) e *A. brasilense* (Abv5 e Abv6) promoveram 25% de massa seca nodular superior ao tratamento não inoculado, e as variáveis nodulação e nitrogênio acumulado na parte aérea positiva se destacaram, embora não diferiram das tratamento não inoculado.

Plantas de *G. heterocarpa* inoculadas com *Bradyrhizobium* sp., *A. brasilense* e *T. indica* promoveram 18% mais nódulos do que o tratamento não inoculado (Tabela 18).

Plantas de *M. axillare* inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3101), *T. indica* (LA 03 e LF 22) e *A. brasilense* (Abv5 e Abv6) tiveram melhor desempenho que outras leguminosas forrageiras inoculadas. A massa seca da parte aérea (MSPA) diferiu entre os tratamentos inoculados e não inoculados, exceto para o tratamento BR 3101 + *T. indica*. A inoculação mista com rizóbios, *A. brasilense* e *T. indica*, por exemplo, apresentou aumento de 18% na MSPA.

Os tratamentos de inoculação apresentaram maior desenvolvimento do sistema radicular em relação à parte aérea, quanto ao acúmulo de massa seca radicular (MSR), a inoculação mista de BR 3101 + *T. indica* + *A. brasilense* e o tratamento BR 3101 + *A. brasilense* realizado melhor que o controle, com aumento de até 58% no MSR. Os tratamentos de rizóbios e rizóbios coinoculados com leveduras diferiram do controle, mas obtiveram resultados inferiores à inoculação mista de BR3101 + *T. indica* + *A. brasilense* e a coinoculação com BR 3101 + *A. brasilense* o que pode indicar que o efeito do o tratamento do BR 3101 + *T. indica* + *A. brasilense* está associado principalmente ao crescimento radicular promovido por *A. brasilense*.

Em relação à nodulação (NN), embora a inoculação mista de BR3101 + *T. indica* + *A. brasilense* difira significativamente do tratamento não inoculado, não diferiu estatisticamente do tratamento de *Bradyrhizobium* cepa BR3101 ao invés de não haver diferença entre os tratamentos na massa seca do nódulo (MSN). O nitrogênio acumulado na parte aérea foi maior em todos os tratamentos inoculados (Tabela 18).

Os tratamentos com BR 3101 e BR3101 + *A. brasilense* + *T. indica* foram mais dependentes do nitrogênio derivado da FBN ( $\delta^{15}\text{N} \text{‰}$ ). No entanto, os valores médios do N na parte aérea derivado da FBN (NdFBN) entre as plantas inoculadas e as plantas não-inoculadas pouco diferiram (Tabela 19).

Bancos de germoplasma ativos podem incorporar em seus programas de melhoramento a seleção de materiais mais responsivos ao FBN, como *M. axillare* cv. Java, que apresentou mais N acumulado na parte aérea em todos os tratamentos inoculados. Essa técnica foi fundamental para o programa de melhoramento de soja que incluiu linhagens de rizóbios adaptadas ao Cerrado brasileiro (HUNGRIA; MENDES, 2015; RIGG et al., 2021). Mais pesquisas são necessárias para determinar a contribuição de nitrogênio da inoculação microbiana mista em pastagem mista de leguminosa em condições de campo, especialmente no que diz respeito à tolerância ao estresse biótico e abiótico.

Nos últimos cinco anos tem se intensificado a demanda por inoculantes microbianos multifuncionais que viabilizem a produção frente a mudanças climáticas. Os inoculantes multifuncionais devem ser capazes de tolerar estresses bióticos e abióticos e promover o crescimento vegetal o que é favorecido com a inoculação de mais de um microrganismo (CANFORA et al., 2021), pois, apresentam resultados com maior reprodutibilidade do que produtos com um único grupo bacteriano sob condições ambientais favoráveis ou desfavoráveis, como por exemplo, disponibilidade limitada de P ou seca (GLICK et al., 2021).

Os consórcios microbianos também podem restaurar o microbioma vegetal, promovendo tanto o crescimento vegetal através da biossíntese e regulação de fitohormônios, atividade antibiótica, solubilização de nutrientes, na formação de nódulos ou na produção de enzimas como a ACC-desaminase que degrada o precursor do etileno (KHAN et al., 2019).

Exsudatos radiculares contribuem para a simbiose entre rizóbios e leguminosas, e outros microrganismos, como fungos endofíticos, podem desempenhar um papel fundamental na simbiose, por exemplo, *Phomopsis liquidambaris* melhorou a nodulação de rizóbios em plantas de amendoim (*Arachis hypogaeae*) e a fixação biológica de nitrogênio. Ainda, *P. liquidambaris* promoveu alterações nos exsudatos radiculares (alterou as concentrações de ácidos fenólicos, flavonóides, ácidos orgânicos e aminoácidos) e a inoculação desses exsudatos proporcionou efeito positivo sobre *Rhizobium* sp. crescimento, formação de biofilme, quimiotaxia, expressão do gene nodC e nodulação em amendoim (WANG; QI; CUTLER, 1993).

**Tabela 18.** Inoculação com rizóbios recomendados para *Arachis pintoi*, *Grona heterocarpa* e *Macrotyloma axillare* e microrganismos promotores de crescimento vegetal *Azospirillum brasilense* (A), *Torulaspora indica* (Y) nas variáveis massa da parte aérea seca (MSPA), massa da raiz seca (MSR), número de nódulos (NN) e massa de nódulos seca (MSN).

Tratamento	<i>A. pintoi</i> cv. Mandobi				
	MSPA	MSR	NN	MSN	N
	g vaso <sup>-1</sup>	g vaso <sup>-1</sup>	vaso <sup>-1</sup>	g vaso <sup>-1</sup>	mg vaso <sup>-1</sup>
Não inoculado	17,38 a	12,15 a	513 a	0,4 ab	588,99 a
BR 1432	14,56 a	10,99 a	324 a	0,35 ab	421,83 abc
BR 1433	12,19 a	9,74 a	355 a	0,27 ab	305,32 c
BR 1433+ A	15,31 a	13,45 a	568 a	0,5 a	464,08 abc
BR 1433+Y	13,2 a	11,73 a	433 a	0,32 ab	338,88 bc
BR 1432+A	11,82 a	8,15 a	519 a	0,2 b	516,44 ab
BR 1432+Y	13,2 a	13,73 a	369 a	0,3 ab	415,71 abc
BR 1432+Y+A	11,61 a	10,81 a	390 a	0,27 ab	423,69 abc
Média	13,75	11,13	434	0,36	434,37
CV%	19	26	25	22	19
Tratamento	<i>G. heterocarpa</i> cv. Itabela				
	MSPA	MSR	NN	MSN	N
	g vaso <sup>-1</sup>	g vaso <sup>-1</sup>	g vaso <sup>-1</sup>	mg vaso <sup>-1</sup>	g vaso <sup>-1</sup>
Não inoculado	28,76 a	18,89 a	735 ab	0,69 a	554,91 a
BR 2217	28,15 a	11,38 a	477 c	0,71 a	547,3 a
BR 2217+A	27,14 a	15,31 a	840 ab	0,78 a	502,68 a
BR 2217+Y	29,71 a	11,9 a	585 bc	0,64 a	538,76 a
BR 2217+A+Y	26,89 a	11,94 a	936 a	0,75 a	569,33 a
Média	27,46	13,95	715	0,71	542,6
CV%	12	43	16	17	8

Continua...

Continuação da Tabela 18.

<i>M. axillare cv. Java</i>					
Tratamento	MSPA	MSR	NN	MSN	N
	g vaso <sup>-1</sup>	vaso <sup>-1</sup>	g vaso <sup>-1</sup>	mg vaso <sup>-1</sup>	g vaso <sup>-1</sup>
Não inoculado	30,6 b	4,58 b	223,2 b	1,53 a	872,22 b
BR 3101	35,24 ab	7,97ab	332,4 ab	1,59 a	1307,76 a
BR 3101+Y	33,03ab	7,65 ab	253,2 b	1,56 a	1291,77 a
BR 3101+A	34,55 ab	11,12 a	242,4b	1,52 a	1107,89 a
BR 3101+Y+A	37,26 a	11,04 a	422,2 a	1,45 a	1212,24 a
Média	34,15	8,92	284,9	1,53	1158,38
CV%	8	27	23	27	10

\*Dados médios de 5 repetições. Letras distintas diferem entre si. Não significativo pelo teste Tukey (p>0,05).

**Tabela 19.** Abundância Natural de Delta <sup>15</sup>N ( $\delta^{15}\text{N} \text{‰}$ ), percentual de nitrogênio derivado da FBN (Ndfa%) e nitrogênio derivado da FBN acumulado na parte aérea (NdFBN) de *Macrotyloma axillare* após 60 dias após o plantio, inoculado com BR3101 *Bradyrhizobium spp.* e (A) *A. brasilense* e (Y) T. indica em casa-de-vegetação.

Tratamento	Npa	$\delta^{15}\text{N} \text{‰}$	Ndfa %	NdFBN mg PA <sup>-1</sup>
Não inoculado	436.1,2 b	1,03 b	86,62 b	0 b
BR 3101	653.9 a	0,24 a	90,81 a	86,91 a
BR 3101+Y	640,9 a	0,55 ab	89,12 a	51,91 a
BR 3101+A	553,9 a	0,53 ab	89,27 a	47,43 a
BR 3101+Y+A	606.1 a	0,33 a	90,32 a	75,19 a
Média	579.2	0,54	89,23	52,29
CV%	10	13%	2%	50%

\*Valores médios de 5 repetições. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (p-value<0.05).

### 5.5.2 Seleção de consórcios rizobianos em leguminosas forrageiras

No quarto experimento, a estirpe BR 14193 promoveu ganhos nas plantas de *Macrotyloma axillare*, promovendo maior matéria radicular e conseqüentemente formação de nódulos. A estirpe recomendada BR3101 apresentou bom desempenho principalmente quando co-inoculada com *Azospirillum brasilense*, porém, o mesmo comportamento não foi observado para a estirpe BR14193 (Tabela 20).

Segundo Santos et al. (2021) o principal mecanismo de ação das estirpes de *Azospirillum brasilense* Abv5 e Abv6 é a produção de fitohormônios, que têm grande impacto na modificação da arquitetura radicular com maior produção de raízes laterais e pêlos radiculares. Alguns estudos apontam para o aumento da nodulação devido à produção de auxina pelos microrganismos promotores de crescimento vegetal que induzem a produção de flavonóides que conseqüentemente estimulam a nodulação, além da maior superfície de contato com microrganismos nodulantes (RONDINA et al., 2020; SANTOS et al., 2021).

**Tabela 20.** Eficiência simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio e (A) *Azospirillum brasilense* em *Macrotyloma axillare* cv. Java na massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), nodulação (NN), massa seca de nódulos (MSN) e N acumulado na parte aérea (Npa).

Tratamento	MSPA	MSR	NN	MSN	Npa
	g vaso <sup>-1</sup>		n <sup>o</sup>	g vaso <sup>-1</sup>	mg vaso <sup>-1</sup>
Não inoculado	10,36 b	0,58 c	143 b	0,102 b	152,35 b
BR 3101	9,42 b	0,55 c	190 b	0,164 b	131,03 b
BR 14193	10,4 b	0,78 b	191 b	0,227 a	158,71 b
BR 3101+A	11,62 b	0,53 c	263 a	0,239 a	165,84 b
BR 14193+A	10,62 b	0,65 c	171 b	0,172 b	161,45 b
A	9,57 b	0,5 c	135 b	0,162 c	133,30 b
Nitrogênio	16,11 a	1,03 a	36 c	0,06 c	276,44 b
Média	11,16	0,66	161	0,16	168,45
CV%	9	22	25	24	9

Valores médios de 5 repetições. As mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p \leq 5\%$ ).

### 5.5.3 Experimento de inoculação cruzada em leguminosas forrageiras

No quinto experimento observa-se que as plantas de *C. cajan* e *M. axillare* acumularam maior biomassa no primeiro corte, não havendo diferença no segundo corte. A inoculação de bactérias nodulantes e *Azospirillum baldaniorum* não promoveu ganhos significativos apesar dos incrementos na biomassa de parte aérea (Tabela 21).

*A. pintoii* apresentou maiores valores de biomassa no primeiro corte quando não-inoculada, o que também ocorreu no experimento com *A. pintoii* inoculada ou co-inoculada com *Azospirillum brasilense* e *Torulaspora indica*, o que pode ser atribuído a um insucesso na inoculação com esta espécie. Vale ressaltar que o efeito das bactérias promotoras, principalmente associado ao maior incremento em raízes não foi avaliado neste experimento, esperava-se que após o primeiro corte, ganhos fossem observados principalmente em função do esgotamento do nitrogênio do solo, o que implicaria numa maior demanda da FBN, no entanto, isto não ocorreu.

**Tabela 21.** Incremento em biomassa (g) durante o primeiro e segundo corte das leguminosas forrageiras *A. pintoii*, *G. heterocarpa*, *C. cajan* e *M. axillare* em inoculação cruzada com bactérias nodulantes e *Azospirillum baldaniorum*.

Inoculação	<i>A. pintoii</i>		<i>G. heterocarpa</i>		<i>C. cajan</i>		<i>M. axillare</i>	
	1 <sup>o</sup> corte	2 <sup>o</sup> corte	1 <sup>o</sup> corte	2 <sup>o</sup> corte	1 <sup>o</sup> corte	2 <sup>o</sup> corte	1 <sup>o</sup> corte	2 <sup>o</sup> corte
g vaso <sup>-1</sup>								
TO	8,60 Aa	5,39	7,34 c	5,22	9,80	6,23	8,24 b	6,58
TN	7,87 ABab	4,39	3,07 b	6,39	11,51	6,31	11,51 a	4,74
BR 2003	7,02AB a	5,11	4,48 b	6,22	11,60	7,30	10,59 a	5,58
BR 3101	5,44 Bb	6,04	2,77 c	5,10	12,09	7,41	10,38 a	8,69
BR 2217	3,97 Bb	5,50	2,65 b	8,12	11,71	7,77	8,60 a	7,18
BR 1432	4,75 Ba	4,49	2,33 c	5,30	10,72	6,34	9,24 a	6,77
BR 1432+BR 2217	6,10 Bb	5,79	2,50 b	6,32	12,19	7,32	11,79 a	8,94
BR 1432+BR 3101	6,75 Ba	5,28	3,52 b	7,31	10,22	5,74	6,64 a	5,63
BR 1432+BR 2003	4,42 Bb	4,68	3,24 b	6,04	10,37	6,23	9,62 a	5,54

Continua...

Continuação da Tabela 21.

Inoculação	<i>A. pintoi</i>		<i>G. heterocarpa</i>		<i>C. cajan</i>		<i>M. axillare</i>	
	1º corte	2º corte	1º corte	2º corte	1º corte	2º corte	1º corte	2º corte
	<b>g vaso<sup>-1</sup></b>							
BR 2217+BR 3101	5,85 Bab	6,44	3,76 b	7,37	10,12	6,66	10,07 a	7,23
BR 2217+BR 2003	2,00 Bb	4,97	3,12 b	5,54	12,15	6,74	12,02 a	7,65
BR 3101+BR 2003	7,34 Ba	5,22	3,04 b	6,84	10,60	6,13	9,68 a	5,62

Média de 4 repetições. Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 5\%$ ).

## 5.6 CONCLUSÕES

*Arachis pintoi*, *Grona heterocarpa* e *Macrotyloma axillare* respondem diferentemente à inoculação de consórcios microbianos.

A inoculação de *Bradyrhizobium*, *Torulaspora indica* e *Azospirillum brasilense* em leguminosas forrageiras promove o crescimento vegetal.

*M. axillare* é responsiva à inoculação com melhores resultados no consórcio microbiano de *Bradyrhizobium*, *A. brasilense* e *T. indica*.

## 6. CONCLUSÕES FINAIS

As leguminosas forrageiras tropicais, apesar de serem colonizadas por rizóbios nativos do solo, apresentam diferentes graus de associação simbiótica com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, sugerindo a existência de simbioses mais eficientes.

Entre as três leguminosas avaliadas neste estudo, *M. axillare* se destaca como de melhor resposta a inoculação rizobiana, considerando as estirpes testadas. Os testes com estirpes isoladas de campos plantados com *G. heterocarpa* e *A. pintoii* não resultaram em melhor desempenho de crescimento das plantas, indicando um potencial para introduzir estirpes eficientes por meio de inoculação.

A utilização de coinoculação de microrganismos promotores de crescimento vegetal (MPCV) trouxe resultados positivos, porém os efeitos estão principalmente associados com o incremento na biomassa das raízes. Neste caso, os resultados mais promissores foram observados em *M. axillare*.

A criação de bovinos em pastos consorciados com leguminosas forrageiras vem sendo avaliada como alternativa para intensificar a produção e mitigar emissões de GEE pela substituição de fertilizantes nitrogenados. Outrossim, deve-se considerar que o sucesso dessa tecnologia depende de uma entrada de N via FBN suficiente para compensar o que é retirado na produção animal, e de eventuais perdas de N que ocorrem principalmente pelas excreções. Neste caso, o presente trabalho ratificou o potencial de alta FBN para as espécies estudadas, indicando possibilidades de aprimoramento por seleção de estirpes e combinação com promotores de crescimento de raízes. No entanto, verificou-se também que o resultado está também associado às condições de fertilidade do solo, não dependendo somente do desenvolvimento de um inoculante mais eficiente.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. P. F.; HARTWIG, U. A.; FREHNER, M.; NÖSBERGER, J.; LÜSCHER, A. Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N<sub>2</sub> fixation in white clover (*Trifolium repens* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 348, p. 1289–1297, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.348.1289>.
- ALVES, B. J. R.; RESENDE, A. S.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation by two tropical forage legumes assessed from the relative ureide abundance of stem solutes: <sup>15</sup>N calibration of the technique in sand culture. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 56, p. 165–176, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1009865816182>
- ALVES, B.J.R.; MADARI, B.E.; BODDEY, R.M. Integrated crop–livestock–forestry systems: Prospects for a sustainable agricultural intensification. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.108, p. 1-4, 2017.
- 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, n. 01, p. 241-248, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832002000100025>
- ANDRADE, C. M. S. Produção de ruminantes em pastos consorciados. *In*: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL EM PASTEJO, Viçosa, MG. **Anais [...]**. Viçosa, MG: UFV, 2010. p. 171–214.
- ANDRADE, C. M. S.; ASSIS, G. M. L.; FAZOLIN, M.; GONÇALVES, R. C.; SALES, M. F. L.; VALENTIM, J. F.; ESTRELA, J. L. V. **Gramma-estrela-roxa : gramínea forrageira para diversificação de pastagens no Acre**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2009. *E-book*. Disponível em: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=663655&biblioteca=vazio&busca=663655&qFacets=663655&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>. Acesso em: 11 jan. 2024.
- ANDRADE, C. G. Produção de ruminantes em pastos consorciados. Simpósio sobre manejo Estratégico da Pastagem, Viçosa, MG, Brasil, 11-13. 2010. Disponível em: <https://loja.fealq.org.br/produtos/producao-de-bovinos-a-pasto-anais-do-13-simposio-sobre-manejo-da-pastagem/>
- ANDRADE, C. M. S.; FERREIRA, A. S.; CASAGRANDE, G. R. Uso de leguminosas em pastagens: potencial para consórcio compatível com gramíneas tropicais e necessidades de manejo de pastejo. *In*: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM2015, Piracicaba, SP. **Anais...** Piracicaba, SP: FEALQ, 2015. p. 113-152. Disponível em: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=1025571&biblioteca=vazio&busca=1025571&qFacets=1025571&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>. Acesso em: 11 jan. 2024.
- ANNAPURNA, K.; RAMADOSS, G.; BOSE, P.; VITHALKUMAR, L. In situ localization of *Paenibacillus polymyxa* HKA-15 in roots and root nodules of soybean (*Glycine max.*L.). **Plant and Soil**, v. 373, n. 1–2, p. 641–648, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1825-7>.
- APPUNU, C.; GANESAN, G.; KALITA, M.; KAUSHIK, R.; SARANYA, B.; PRABAVATHY, V. R.; SUDHA, N. Phylogenetic Diversity of Rhizobia Associated with

Horsegram [*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.] Grown in South India Based on *glnII*, *recA* and *16S-23S* Intergenic Sequence Analyses. **Current Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1230–1238, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9823-y>

ARAÚJO, A. P.; MACHADO, C. T. T. Fósforo. In: FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R.; SANTOS, L. A. (org.). **Nutrição mineral de plantas**. 2. eG. Viçosa: SBCS, 2018. p. 254–2006. *E-book*. Disponível em: <https://www.ofitexto.com.br/nutricao-mineral-de-plantas-2ed/p>. Acesso em: 5 jan. 2024.

ARAÚJO, A. P.; PLASSARD, C.; DREVON, J. J. Phosphatase and phytase activities in nodules of common bean genotypes at different levels of phosphorus supply. **Plant and Soil**, v. 312, n. 1–2, p. 129–138, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9595-3>

ARNOLD, S. L.; SCHEPERS, J. S. A Simple Roller-Mill Grinding Procedure for Plant and Soil Samples. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 35, n. 3–4, p. 537–545, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1081/CSS-120029730>

ASERSE, A. A.; RÄSÄNEN, L. A.; ASEFFA, F.; HAILEMARIAM, A.; LINDSTRÖM, K. Diversity of sporadic symbionts and nonsymbiotic endophytic bacteria isolated from nodules of woody, shrub, and food legumes in Ethiopia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 23, p. 10117–10134, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5248-4>

AYARZA, M.; VILELA, L.; ALVES, B. J. R.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Introdução de *Stylosanthes guianensis* Cv. mineirão em pastagem de *Brachiaria ruziziensis*: Influência na produção animal e vegetal. **Boletim Técnico**, 1. Seropédica, RJ: Embrapa-CNPAB, 1997. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/623593>. Acesso em: 11 jan. 2024.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. G. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549–579, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0001-37652005000300014>

BALL, P. R.; RYDEN, J. C. Nitrogen relationships in intensively managed temperate grasslands. **Plant and Soil**, v. 76, n. 1, p. 23–33, 1984. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02205564>

BARCELLOS, A.O.; RAMOS, A.K.B.; VILELA, L.; JUNIOR, G.B.M. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 51-67, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008001300008>

BARNES, P. Introduced forage species herbage dry matter production and chemical composition at two moist savannah sites in Ghana. **Annales de Zootechnie**, v. 44, n. Suppl. 1, p. 31–31, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/animres:19950501>

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth—A Critical Assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77–136, 2010. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8)

BENCHAAR, C.; POMAR, C.; CHIQUETTE, J. Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: a modeling approach. **Canadian Journal of Animal Science**, v.81, n.4, p.563-574, 2001.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, G. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>

BLUMENTHAL, M. J.; STAPLES, I. B. Origin, evaluation and use of Macrotyloma as forage. **Tropical Grasslands**, v. 27, p. 16–29, 1993.

BODDEY, R. M.; CASAGRANDE, G. R.; HOMEM, B. G. C.; ALVES, B. J. R. Forage legumes in grass pastures in tropical Brazil and likely impacts on greenhouse gas emissions: A review. **Grass and Forage Science**, v. 75, n. 4, p. 357–371, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/gfs.12498>

BODDEY, R. M.; MACEDO, R.; TARRÉ, R. M.; FERREIRA, E.; OLIVEIRA, O. C.; REZENDE, C. P.; CANTARUTTI, R. B.; PEREIRA, J. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Nitrogen cycling in Brachiaria pastures: The key to understanding the process of pasture decline. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 103, p. 389–403, 2004. Disponível em: [doi:10.1016/j.agee.2003.12.010](https://doi.org/10.1016/j.agee.2003.12.010)

BODDEY, R. M.; RESENDE, C. P.; SCHUNKE, R. M.; ALVES, B. J. R.; CADISH, G.; PEREIRA, J. M. Sustentabilidade de pastagens consorciadas e de gramínea em monocultura: O papel chave das transformações de nitrogênio. In: 1993, Rio de Janeiro. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 30. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1993. p. 141–173.

BOIVIN, S.; LEPETIT, M. Partner preference in the legume-rhizobia symbiosis and impact on legume inoculation strategies. **Advances in Botanical Research**, v. 94, p. 323–348, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2019.09.016>

BONILLA, I.; BOLAÑOS, L. Mineral nutrition for legume-rhizobia symbiosis: B, Ca, N, P, S, K, Fe, Mo, Co, and Ni: A review. In: LICHTFOUSE, E. (Ed.). **Organic farming, pest control and remediation of soil pollutants**. Netherlands: Springer, 2009. p. 253–274. DOI: 10.1007/978-1-4020-9654-9.

BORRÉ, J. G. **Ciclagem de N em pastagens tropicais consorciadas com leguminosa forrageira ou fertilizada com N**. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo), Instituto de Agronomia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Seropédica, 80 f., 2023.

BOURION, V. Co-inoculation of a Pea Core-Collection with Diverse Rhizobial Strains Shows Competitiveness for Nodulation and Efficiency of Nitrogen Fixation Are Distinct traits in the Interaction. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 2249, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02249>

BÜNGER, W.; GRÖNEMEYER, J. L.; SARKAR, A.; REINHOLD-HUREK, B. *Bradyrhizobium ripae* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of wild legumes in Namibia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 3688–3695, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002955>

BURDMAN, S.; KIGEL, J.; OKON, Y. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5–6, p. 923–929, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00222-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00222-2)

CANFORA, L.; COSTA, C.; PALLOTTINO, F.; MOCALI, S. Trends in soil microbial inoculants research: a science mapping approach to unravel strengths and weaknesses of their

application. **Agriculture**, v. 11(2), p.158, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agriculture11020158>

CANTARUTTI, R. B.; TARRÉ, R.; MACEDO, R.; CADISCH, G.; DE REZENDE, C. P.; PEREIRA, J. M.; ... & BODDEY, R. M. The effect of grazing intensity and the presence of a forage legume on nitrogen dynamics in Brachiaria pastures in the Atlantic forest region of the south of Bahia, Brazil. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.64, p.257-271,2002. Disponível em : <https://doi.org/10.1023/A:1021415915804>

CARDOSO, A.G.S.; BARBERO, R.P.; ROMANZINI, E.P.; TEOBALDO, R.W.; ONGARATTO, F.; FERNANDES, M.H.M.G.R.; RUGGIERI, A.C.; REIS, R.A. Intensification: A Key Strategy to Achieve Great Animal and Environmental Beef Cattle Production Sustainability in Brachiaria Grasslands. **Sustainability**, v. 12, p. 6656, 2020. <https://doi.org/10.3390/su12166656>

CARVALHO, R.H.; JESUS, E.C.; FAVERO, V.O.; STRALIOTTO, R.; ARAÚJO, A.P. The co-inoculation of Rhizobium and Bradyrhizobium increases the early nodulation and development of common beans. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, n. 3, 860-864, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00171-8>

CEREZINI, P.; KUWANO, B.H.; DOS SANTOS, M.B.; TERASSI, F.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A. Strategies to promote early nodulation in soybean under drought. **Field Crops Research**, v. 196, p. 160-167, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.06.017>.

CHIBEBA, A. M.; KYEI-BOAHEN, S.; GUIMARÃES, M. F.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Isolation, characterization and selection of indigenous Bradyrhizobium strains with outstanding symbiotic performance to increase soybean yields in Mozambique. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 246, p. 291–305, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.06.017>

COOK, B. G.; PENGELLY, B. C.; BROWN, S. G.; DONNELLY, J. L.; EAGLES, G. A.; FRANCO, M. A.; HANSON, J.; MULLEN, B. F.; PARTRIDGE, I. J.; PETERS, M.; SCHULTZE-KRAFT, R. Tropical Forages: an interactive selection tool. **CSIRO, DPI&F, CIAT, ILRI**, 2005. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20177200298>. Acesso em: 5 jan. 2024.

CORSI, M.; NUSSIO, L. G. Manejo do capim elefante: correção e adubação do solo. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM1993, Piracicaba. **Anais [...]**. Piracicaba: FEALQ, 1993. p. 87–117.

COSTA, E. M.; GUIMARÃES, A. A.; VICENTIN, R. P.; RIBEIRO, P. R. A.; LEÃO, A. C. R.; BALSANELLI, E.; LEBBE, L.; AERTS, M.; WILLEMS, A.; MOREIRA, F. M. S. Bradyrhizobium brasiliense sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium isolated from Brazilian tropical soils. **Archives of Microbiology**, v. 199, n. 8, p. 1211–1221, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1390-1>

COSTA, N. L.; TOWNSEND, C. R.; MAGALHAES, J. A.; PEREIRA, R. G. A. **Formação e manejo de pastagens de Desmódio em Rondônia**: Recomendações Técnicas, 24. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2001. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/984103/formacao-e-manejo-de-pastagens-de-desmodio-em-rondonia>. Acesso em: 30 dez. 2023.

DEDECEK, R. A.; GALDINO, S.; VIEIRA, L. M. **Perdas de solo e água em pastagens cultivadas em solo arenoso da Bacia do Alto Taquari, MS.** Corumbá: Embrapa Pantanal [Colombo]: Embrapa Florestas, 2006. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAP/56613/1/FOL62.pdf>. Acesso em: 30 dez. 2023.

DE LA FUENTE, L.; QUAGLIOTTO, L.; BAJSA, N.; FABIANO, E.; ALTIER, N.; ARIAS, A. Inoculation with *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains does not affect the symbiosis between rhizobia and forage legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 4, p. 545–548, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00194-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00194-8)

DE MEYER, S. E.; CNOCKAERT, M.; ARDLEY, J. K.; VAN WYK, B.-E.; VANDAMME, P. A.; HOWIESON, J. G. *Burkholderia dilworthii* sp. nov., isolated from *Lebeckia ambigua* root nodules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. Pt\_4, p. 1090–1095, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.058602-0>

DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; GOMES, G. F.; SOUZA, R. C.; CHUEIRE, L. M. O.; HUNGRIA, M. Genome Sequence of *Bradyrhizobium pachyrhizi* Strain PAC48T, a Nitrogen-Fixing Symbiont of *Pachyrhizus erosus* (L.) Urb. **Genome Announcements**, v. 3, n. 5, p. e01074-15, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/genomeA.01074-15>

DENG, Z. S.; ZHAO, L. F.; KONG, Z. Y.; YANG, W. Q.; LINDSTRÖM, K.; WANG, E. T.; WEI, G. H. Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in different regions of Loess Plateau in China: *Sphaerophysa salsula* endophytic bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 76, n. 3, p. 463–475, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01063>.

DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. **Defining soil quality for a sustainable environment**, v.35, p.1-21, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.2136/sssaspepub35>

EAGLESHAM, A. R. J.; SZALAY, A. A. Aerial stem nodules on *Aeschynomene* spp. **Plant Science Letters**, v. 29, n. 2–3, p. 265–272, 1983. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(83\)90151-7](https://doi.org/10.1016/0304-4211(83)90151-7)

EL-TARABILY, K.A.; SIVASITHAMPARAM, K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Mycoscience**, v.47, n.1, p.25-35, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01766>

EL-TARABILY, K.A. Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, n.1, p.69-75, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02043.x>.

FAVERO, V. O.; CARVALHO, R. H.; LEITE, A. B. C.; FREITAS, K. M.; ZILLI, J. É.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; URQUIAGA, S. Characterization and nodulation capacity of native bacteria isolated from mung bean nodules used as a trap plant in Brazilian tropical soils. **Applied Soil Ecology**, v. 167, p. 104041, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104041>

FELSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.2307/2408678>

FERREIRA, G. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 5.0. *In: 45ª REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA 2003*, São Carlos. **Anais [...]**. São Carlos: UFSCar, 2003. p. 255–258.

FERREIRA, E.; REZENDE, C. P.; GALINDO, L. L. G.; RESENDE, A. S.; TARRÉ, R. M.; MACEDO, R. O.; OLIVEIRA, O. C.; ALVES, B. J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Recuperação do nitrogênio da urina bovina pela pastagem de *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweickt cultivada no sul da Bahia. *In: XVI REUNIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCCION ANIMAL Y CONGRESO URUGUAYO DE PRODUCCION ANIMAL 2000*, **Anais...** Montevideo, 2000.

FERREIRA, F. F.; NEUMANN, P. S.; HOFFMANN, R. Análise da matriz energética e econômica das culturas de arroz, soja e trigo em sistemas de produção tecnificados no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 44, n. 2, p. 380–385, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782013005000157>

FISHER, M. J.; CRUZ, P. Some ecophysiological aspects of *Arachis pintoi*. *In: KERRIDGE, P. C.; HARDY, B. (eG.)*. **Biology and Agronomy of forage Arachis**. Cali: CIAT, 1994. p. 53–70.

FRANCISQUINI JUNIOR, A.; CALONEGO, J. C.; ROSOLEM, C. A.; SANTOS, C. H.; TIRITAN, C. S. Increase of nitrogen-use efficiency by phosphorus fertilization in grass–legume pastures. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 118, n. 2, p. 165–175, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10705-020-10091-9>

FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J. Host specificity in Rhizobium-Bean symbiosis and influence of different nutrients. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.2, p.467-474, 1967.

FREITAS, G.G.S.; BARBOSA, G.F.; ZUFFO, A.M.; STEINER, F. Co-inoculation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes greater tolerance to drought. **Research, Society and Development**, v.9, n.7, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i7.3690>

FURUSHITA, M.; SHIBA, T.; MAEDA, T.; YAHATA, M.; KANEOKA, A.; TAKAHASHI, Y.; TORII, K.; HASEGAWA, T.; OHTA, M. Similarity of Tetracycline Resistance Genes Isolated from Fish Farm Bacteria to Those from Clinical Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5336–5342, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5336-5342.2003>

GALINDO, F.S.; DA SILVA, E.C.; PAGLIARI, P.H.; FERNANDES, G.C.; RODRIGUES, W.L.; BIAGINI, A.L.C.; BARATELLA, E.B.; SILVA, C.A.; NETO, M.J.M.; SILVA, V.M.; MURAOKA, T.; TEIXEIRA FILHO, M.C.M. Nitrogen recovery from fertilizer and use efficiency response to *Bradyrhizobium* sp. and *Azospirillum brasilense* combined with N rates in cowpea-wheat crop sequence. **Applied Soil Ecology**, v.157, p.103764, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103764>

GAUNT, M. W.; TURNER, S. L.; RIGOTTIER-GOIS, L.; LLOYD-MACGILP, S. A.; YOUNG, J. P. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2037–2048, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2037>

GERICÓ, T.G.; TAVANTI, R.F.R.; de OLIVEIRA, S.C.; LOURENZANI, A.E.B.S.; de LIMA, J.P.; RIBEIRO, R.P.; dos SANTOS, L.C.C.; DOS REIS, A.R. *Bradyrhizobium* sp. enhance ureide metabolism increasing peanuts yield G. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 3, p.645-656, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01778-x>

GIMENES, F. M. A. G.; HENRIQUE, Z. B.; LUCIANA, G.; GIACOMINI, A. A.; BATISTA, K.; WALDSSIMILER, T. M.; LINDA, M. P.; ALBERTO, N. V. M. The utilization of tropical legumes to provide nitrogen to pastures: A review. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 2, p. 85–92, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11893>

GIRAUD, E. Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. **Science**, v. 316, n. 5829, p. 1307–1312, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1139548>

GIRAUD, E.; FLEISCHMAN, G. Nitrogen-fixing symbiosis between photosynthetic bacteria and legumes. **Photosynthesis Research**, v. 82, n. 2, p. 115–130, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11120-004-1768-1>

GOMES, J.A.N. **Sustentabilidade de sistema de pastagem de coastcross com uso de leguminosas e/ou de nitrogênio explorado com bovinos**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 95 f. 2008.

GOV. SP. **IZ-APTA apresenta amostras de leguminosas forrageiras e capim na Agrishow**. [s. l.], 2008. Disponível em: <http://www.apta.sp.gov.br/noticias/iz-apta-apresenta-amostras-de-leguminosas-forrageiras-e-capim-na-agrishow>. Acesso em: 5 jan. 2024.

GLICK, B. R.; GAMALERO, E. Recent developments in the study of plant microbiomes. **Microorganisms**, v.9, n.7, p.1533, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071533>

GUIMARÃES, A. P., MORAIS, R. F. G., URQUIAGA, S., BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R. Bradyrhizobium strain and the <sup>15</sup>N natural abundance quantification of biological N<sub>2</sub> fixation in soybean. *Scientia Agricola*, v. 65, p. 516-524, 2008.

HASSEN, A. I.; BOPAPE, F. L.; TRYTSMAN, M. Nodulation Study and Characterization of Rhizobial Microsymbionts of Forage and Pasture Legumes in South Africa. **World Journal of Agricultural Research**, v. 2, n. 3, p. 93–100, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.12691/wjar-2-3-2>

HERRIDGE, G. F.; ROUGHLEY, R. J. Influence of temperature and Rhizobium strain on nodulation and growth of two tropical legumes. **Tropical Grasslands**, v. 10, n. 1, p. 21–23, 1976.

HOMEM, B. G. C.; LIMA, I. B. G.; SPASIANI, P. P.; BORGES, L. P. C.; BODDEY, R. M.; DUBEUX, J. C. B.; BERNARDES, T. F.; CASAGRANDE, G. R. Palisadegrass pastures with or without nitrogen or mixed with forage peanut grazed to a similar target canopy height. 2. Effects on animal performance, forage intake and digestion, and nitrogen metabolism. **Grass and Forage Science**, v. 76, n. 3, p. 413–426, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/gfs.12533>

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

<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/879471/inoculacao-com-azospirillum-brasilense-inovacao-em-rendimento-a-baixo-custo>. Acesso em: 30 dez. 2023.

HUNGRIA, M.; MENNA, P.; DELAMUTA, J. R. M. Bradyrhizobium, the Ancestor of All Rhizobia: Phylogeny of Housekeeping and Nitrogen-Fixation Genes. In: BRUIJN, F. J. (org.). **Biological Nitrogen Fixation**. 1. eG. Nova Jersey-EUA: Wiley-Blackwell, 2015. p. 191–202. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch18>. Acesso em: 30 dez. 2023.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R.S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v.49, n.7, p.791-801, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0771-5>

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Soybean Seed Co-Inoculation with Bradyrhizobium spp. and *Azospirillum brasilense*: A New Biotechnological Tool to Improve Yield and Sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 06, p. 811-817, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.66087>

HUNGRIA, M.; MENDES, I.C. **Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis?** In: de Bruijn FJ (ed) Biological nitrogen fixation. John Wiley, New Jersey, pp 1005–1019, 2015.

HUSSAIN, R. The effect of phosphorus in nitrogen fixation in legumes. **Agri Res & Tech: Open Access J**, v. 5, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2017.04.555654>

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, n. 1–2, p. 1–3, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1317-1>

JESUS, E.C.; LEITE, R.A.; BASTOS, R.A.; ARAGÃO, O.O.S.; ARAÚJO, A.P. Co-inoculation of *Bradyrhizobium* stimulates the symbiosis efficiency of *Rhizobium* with common bean. **Plant and Soil**, v.425, p.201–215, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-017-3541-1>

JORDAN, G. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to Bradyrhizobium gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 32, n. 1, p. 136–139, 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00207713-32-1-136>

KHAN, N.; BANO, A.; RAHMAN, M.A.; GUO, J.; KANG, Z.; BABAR, M. Comparative physiological and metabolic analysis reveals a complex mechanism involved in drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) induced by PGPR and PGRs. **Scientific Reports**, v.9, n.1, p.1-19, 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-38702-8>

KICHEL, A. N.; COSTA, J. A. A.; LIMA, N. R. C. B.; SILVEIRA, G. S.; GALDINO, S.; COMIRAN, G.; ARAÚJO, M. T. B. G.; PARIS, A. **Sistema de recuperação e manejo de pastagem em solos arenosos: produtividade e custo de produção**. Corumbá: Embrapa Pantanal; Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2006.

KONG, Z.; HART, M.; LIU, H. Paving the way from the lab to the field: Using synthetic microbial consortia to produce high-quality crops. **Frontiers Plant Science**, v.9, p.1467, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01467/full>

LAGUERRE, G.; HEULIN-GOTTY, K.; BRUNEL, B.; KLONOWSKA, A.; LE QUÉRÉ, A.; TILLARD, P.; PRIN, Y.; CLEYET-MAREL, J.; LEPETIT, M. Local and systemic N signaling are involved in *Medicago truncatula* preference for the most efficient Sinorhizobium symbiotic partners. **New Phytologist**, v. 195, n. 2, p. 437–449, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04159.x>

LIMA FILHO, O. F. Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil: fundamentos e prática. Embrapa, 2014.

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

MANZANO, A.; NOVAES, N. J.; ESTEVES, S. N.; VITTI, G. C. Desempenho de novilhos Canchim alimentados com guandu (*Cajanus cajan* (L) Millsp) em confinamento. In Embrapa Pecuária Sudeste-Resumo em anais de congresso (ALICE). Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia, v. 17, n. 2, p. 165-171, 1988. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/43105/1/Efeito-Periodos-Estiagens11071-1.pdf>

MAPBIOMAS – Mapeamento Anual de Cobertura e Uso da Terra do Brasil- Coleção 6. Disponível em: [https://mapbiomas-brsite.s3.amazonaws.com/Fact\\_Sheet\\_PASTAGEM\\_13.10.2021\\_ok\\_ALTA.pdf](https://mapbiomas-brsite.s3.amazonaws.com/Fact_Sheet_PASTAGEM_13.10.2021_ok_ALTA.pdf). Acesso em: 12 nov. 2021.

MARIOTTI, A. Atmospheric nitrogen is a reliable standard for natural <sup>15</sup>N abundance measurements. **Nature**, v.303, n.5919, p.685-687, 1983.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 315–332, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.12.002>

MMBAGA, G.W.; MTEI, K.M.; NDAKIDEMI, P.A. Extrapolations on the use of rhizobium inoculants supplemented with phosphorus (P) and potassium (K) on growth and nutrition of legumes. **Agricultural Sciences**, v.5, n.12, p.1207, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/as.2014.512130>

MIAMOTO, A.; ZAMBONI, A. C.M.; DORIGO, O. F.; MIORANZA, T. M.; PUERARI, H. H.; SILVA, B.A; DIAS, C. R.A. Antagonistic potential and histopathology of *Meloidogyne javanica* on *Macrotyloma axillare* cv. Java. **Australian Journal of Crop Science**, v.14, n.6, p.940-946, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.21475/ajcs.20.14.06.p2153>

MOHAMMED, M.; JAISWAL, S. K.; DAKORA, F. G. Insights into the Phylogeny, Nodule Function, and Biogeographic Distribution of Microsymbionts Nodulating the Orphan Kersting's Groundnut [*Macrotyloma geocarpum* (Harms) Marechal & Baudet] in African Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 11, p. e00342-19, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.00342-19>

- MOREIRA, F.; SILVA, K. G.; NÓBREGA, R. A. S.; CARVALHO, F. P. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. In: BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS 2010, **Anais...** [S. l.: s. n.]. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Bact%C3%A9rias-diazotr%C3%B3ficas-associativas%3A-diversidade%2C-Moreira-Silva/275f0736630aa938b3cc4afcbb70cbe2d9dcc335>. Acesso em: 30 dez. 2023.
- MORRIS, J. *Macrotyloma axillare* and *M. uniflorum*: Descriptor analysis, anthocyanin indexes, and potential uses. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 55, p. 5–8, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10722-007-9298-2>
- MULLEN, B. F.; SHELTON, H. M.; DALZELL, S. A. **Leucaena in northern Australia: a forage tree legume success story**. In Proceedings of XX International Grassland Conference: Offered papers. Wageningen Academic Publishers, Dublin, IRL p. 333. 2005.
- MWANGI, G. M. Sources of Nitrogen in a Napier Grass/Legume Mixture on Smallholder Dairy Farms in Central Kenya. **Multifunctional Grasslands in a Changing World**, v. 1, p. 336, 2020.
- NORRIS, G. O. Techniques used in work with Rhizobium. In: C.S.I.R.O, B. A. C. L. **Some concepts and methods in sub-tropical pasture research**. [S. l.]: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1964.
- NUTARATAT, P.; SRISUK, N.; ARUNRATTIYAKORN, P.; LIMTONG, S. Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand G. **Fungal biology**, v. 118, n. 8, p. 683-694, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.04.010>
- OKITO, A.; ALVES, B. R. J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Isotopic fractionation during N<sub>2</sub> fixation by four tropical legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 7, p. 1179–1190, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.03.004>
- OLIVEIRA, A. G. L. Caracterização da pastagem, desempenho animal e viabilidade econômica em Coastercross consorciado ou não com *Arachis pintoi*. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 119 f. 2007.
- OLIVEIRA, O. C.; DE OLIVEIRA, I. P., FERREIRA, E.; ALVES, B. J. R., MIRANDA, C.H.B., VILELA, L., URQUIAGA, S. Response of degraded pastures in the Brazilian Cerrado to chemical fertilisation. **Pasturas Tropicales**, v. 23, p. 14–18, 2001.
- O'NEILL, M. E.; MATHEWS, K. Y. Theory & methods: A weighted least squares approach to Levene's test of homogeneity of variance. **Australian & New Zealand Journal of Statistics**, v.42(1), p. 81-100, 2000.
- ORMEÑO-ORRILLO, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. A Genomotaxonomy View of the Bradyrhizobium Genus. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1334, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01334>
- PACHECO, R. S.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; FERREIRA, E. P. B.; STRALIOTTO, R.; ARAÚJO, A. P. Differences in contribution of biological nitrogen fixation to yield performance of common bean cultivars as assessed by the 15N natural abundance technique. **Plant and Soil**, v. 454, n. 1–2, p. 327–341, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04654-6>

- PACIULLO, G. S. C.; AROEIRA, L. J. M.; ALVIM, M. J.; CARVALHO, M. M. Características produtivas e qualitativas de pastagem de braquiária em monocultivo e consorciada com estilosantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 421–426, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003000300012>
- PALANIAPPAN, P.; CHAUHAN, P. S.; SARAVANAN, V. S.; ANANDHAM, R.; SA, T. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of Lespedeza sp. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, n. 8, p. 807–816, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0485-5>
- PAUFERRO, N.; GUIMARÃES, A. P.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. <sup>15</sup>N natural abundance of biologically fixed N<sub>2</sub> in soybean is controlled more by the Bradyrhizobium strain than by the variety of the host plant. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 10, p. 1694–1700, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.05.032>
- PAULINO, V. T.; PAULINO, T. S. Avanços no manejo de pastagens consorciadas. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 2, n. 3, p. 27, 2003.
- PAULINO, V. T.; GERDES, L.; VALARINI, M. J.; FERRARI JUNIOR, E. Retrospectiva do uso de leguminosas forrageiras. In: Anais. II Encontro Técnico de Leguminosas Forrageiras, v.1, p.1-47, 2006.
- PEREIRA, J. O feijão guandu: uma opção para a agropecuária brasileira. 1985. Disponível em <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/549433/1/cirtec20.pdf>
- PEREIRA, J.M.;REZENDE, C.P.; FERREIRA, A.G.B ; HOMEM, B.G. C.; CASAGRANDE, G.R.; MACEDO, T.M. ; ALVES, B.J.R.; SANT’ANNA, S.A.C. ; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Production of beef cattle grazing on Brachiaria brizantha (Marandu grass)- *Arachis pintoi* (forage peanut cv. Belomonte) mixtures exceeded that on grass monocultures fertilized with 120 kg N/ha. **Grass and Forage Science**, v. 75, p. 28-36, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/gfs.12463>
- POSSENTI, R.; FRANZOLIN, R.; SHAMMAS, E.; BRÁS, P.; DEMARCHI, J. G. A.; FRIGHETTO, R.; de LIMA, M. A. Efeitos de dietas com dois níveis de *Leucaena leucocephala* (lam.) com e sem adição de *Saccharomyces cerevisiae* sobre a emissão do gás metano em bovinos. In Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43., João Pessoa: SBZ, p. 1-6. 2006. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/130843/1/2006AA-002.pdf>
- REIS JÚNIOR, F. B.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. **Fixação Biológica de Nitrogênio Associada a Pastagens de Braquiária e outras Gramíneas Forrageiras.**: Documentos 52. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2002.
- REZENDE, C. P.; PEREIRA, J. M.; MAGALHÃES, A.; BASTO, G.; HOMEM, B.; BODDEY, R.; ALVES, B. J. Desempenho de novilhas em pastagens formadas pelos capins Tifton 85, Xaraés e Mombaça, sob lotação rotativa. **Agrotropica (Itabuna)**, v. 33, n. 3, p. 197–204, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.21757/0103-3816.2021v33n3p197-204>
- RIGG, J. L.; WEBSTER, A. T.; HARVEY, G. M.; ORGILL, S. E.; GALEA, F.; DANDO, A. G.; ... & HAYES, R. C. Cross-host compatibility of commercial rhizobial strains for new and

existing pasture legume cultivars in south-eastern Australia. **Crop and Pasture Science**, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/CP20234>

RONDINA, A.B.L.; dos SANTOS, S.A.W.; GUIMARÃES, G.S.; WENDLING, J.R.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* or treated with *A. brasilense* exudates. **Biology and Fertility of Soils**, v.56, n.4, p.537-549, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01453-0>

ROSIER, A.; MEDEIROS, F. H. V.; BAIS, H. P. Defining plant growth promoting rhizobacteria molecular and biochemical networks in beneficial plant-microbe interactions. **Plant and Soil**, v. 428, n. 1–2, p. 35–55, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3679-5>

SÁ, O. A. A. L.; RIBEIRO, P. R. A.; RUFINI, M.; CRUVINEL, I. A. F.; CASAGRANDE, G. R.; MOREIRA, F. M. S. Microsymbionts of forage peanut under different soil and climate conditions belong to a specific group of *Bradyrhizobium* strains. **Applied Soil Ecology**, v. 143, p. 201–212, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.07.018>

SALES, M. F. L.; de ASSIS, G. M. L.; de ANDRADE, C. M. S.; de SÁ, C. P.; VALENTIM, J. F.; de MESQUITA, A. Q. **Recria de bovinos de corte em pastos de capim-humidícola consorciados com amendoim forrageiro no Estado do Acre**. Embrapa Acre-Circular Técnica (INFOTECA-E). 2020. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/218373/1/27073.pdf>. Acesso em: 13 jan.2024.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, G. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Lab Manual edição eG. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Pr, 2000.

SANTOS, M.S.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and pre-viewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**, v. 9, p. 205, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>

SARABIA, M.; JAKOBSEN, I.; GRØNLUND, M.; CARREON-ABUD, Y.; LARSEN, J. Rhizosphere yeasts improve P uptake of a maize arbuscular mycorrhizal association. **Applied Soil Ecology**, v. 125, p. 18–25, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.12.012>

SAWADA, H.; KUYKENDALL, L. G.; YOUNG, J. M. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 155–179, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.2323/jgam.49.155>

SCHULTZE-KRAFT, R.; RAO, I. M.; PETERS, M.; CLEMENTS, R. J.; BAI, C.; LIU, G. Tropical forage legumes for environmental benefits: An overview. **Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales**, v. 6, n. 1, p. 1–14, 2018. Disponível em: [https://doi.org/10.17138/tgft\(6\)1-14](https://doi.org/10.17138/tgft(6)1-14)

SCHUNKE, R. M.; VALLE, L. C. S.; ZIMMER, A. H.; FERNANDES, C. G.; MACEDO, M. C. M.; RAUL, V. J.; SILVA, J. M. S. **Estilosantes campo grande**: estabelecimento, manejo e produção animal. Comunicado Técnico 61. [S. l.]: Embrapa, 2000.

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.

SHEARER, G.; KOHL, G. H. Natural <sup>15</sup>N abundance as a method of estimating the contribution of biologically fixed nitrogen to N<sub>2</sub>-fixing systems: Potential for non-legumes. *In*: SKINNER, F. A.; BODDEY, R. M.; FENDRIK, I. (org.). **Nitrogen Fixation with Non-Legumes**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1989. p. 289–299. E-book. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-94-009-0889-5\\_33](https://doi.org/10.1007/978-94-009-0889-5_33). Acesso em: 5 jan. 2024.

SILVA, V. J.; DUBEUX JUNIOR, J. C. B.; TEIXEIRA, V. I.; SANTOS, M. V. F.; LIRA, M. A.; MELLO, A. C. L. Características morfológicas e produtivas de leguminosas forrageiras tropicais submetidas a duas frequências de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 1, p. 97–102, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000100013>

SILVA ER, SALLES JS, ZUFFO AM, STEINER F. Co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* on peanut seeds of different sizes. **Revista de Agricultura Neotropical**, v.4, n.5, p.93-102, 2017.

SILVA, G. G.; MENDONÇA, A. G.; TORRES, C. M. M. E.; PEZZOPANE, J. R. M.; SILVA, J. P. M.; ROCHA, Q. S.; BARROS, Q. S. Avaliação econômica de diferentes modelos de sistemas silvipastoris. Embrapa Pecuária Sudeste-Capítulo em livro científico (ALICE). 2021.

SINGLETON, P.W., BOHLOOL, B.B. AND NAKAO, P.L. Legume Response to Rhizobial Inoculation in the Tropics: Myths and Realities. *In* *Myths and Science of Soils of the Tropics*, v. 29, p. 135-155, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.2136/sssaspecpub29.c8>

SOARES, J. C. G. R.; BARCELLOS, J. O. J.; QUEIROZ, L. A. V.; OAIGEN, R. P.; CANOZZI, M. E. A.; CAMARGO, C. M.; BRACCINI, J. Avaliação econômica da terminação de bovinos de corte em pastagem irrigada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, p.1096-1104, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-7340>

SULIEMAN, S.; SCHULZE, J.; TRAN, L.-S. Comparative Analysis of the Symbiotic Efficiency of *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* under Phosphorus Deficiency. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 5198–5213, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms14035198>

TAMELE, O. H.; de SÁ, O. A. A. L.; BERNARDES, T. F.; LARA, M. A. S.; CASAGRANDE, G. R. Optimal defoliation management of brachiaria grass–forage peanut for balanced pasture establishment. **Grass and Forage Science**, v.73, n.2, p.522-531, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/gfs.12332>

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, G.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>

TARIQ, M.; HAMEED, S.; YASMEEN, T.; ZAHID, M.; ZAFAR, M. Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (*Pisum sativum* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 719–725, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1488-9>

TEIXEIRA, P. C.; DONAGEMMA, G. K.; FONTANA, A.; TEIXEIRA, W. G. **Manual de métodos de análise de solo**. 3. eG. Brasília: Embrapa, 2017. E-book. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1085209/manual-de-metodos-de-analise-de-solo>. Acesso em: 5 jan. 2024.

THRALL, P. H.; OAKESHOTT, J. G.; FITT, G.; SOUTHERTON, S.; BURDON, J. J.; SHEPPARD, A.; FORD DENISON, R. Evolution in agriculture: the application of evolutionary approaches to the management of biotic interactions in agro-ecosystems. **Evolutionary applications**, v.4, n.2, p. 200-215, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2010.00179.x>

TRINICK, M. J. Host-Rhizobium associations. In: VINCENT, J. M. **Nitrogen Fixation in Legumes**. Sydney: Academic Pr, 1982. p. 111–122.

UNKOVICH, M.; HERRIDGE, G.; POVOS, M.; CADISCH, G.; BODDEY, R. M.; GILLER, K.; ALVES, B. J. R.; CHALK, P. Medição da fixação de nitrogênio associado a plantas em sistemas agrícolas. **ACIAR**, p. 258, 2008.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of Nitrogen Fixation to Sugar Cane: Nitrogen-15 and Nitrogen-Balance Estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, n. 1, p. 105–114, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.2136/sssaj1992.03615995005600010017x>

URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F.; BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; MAIA E SÁ, J.; BARBOSA, K. P.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and 15N natural abundance data for the contribution of biological N<sub>2</sub> fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 5–21, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1016-3>

USDA. **Home | USDA Foreign Agricultural Service**. [s. l.], 2020. Disponível em: <https://fas.usda.gov/>. Acesso em: 15 jul. 2020.

VAN BERKUM, P.; LEIBOLD, J. M.; EARDLY, B. G. Proposal for combining Bradyrhizobium spp. (*Aeschynomene indica*) with Blastobacter denitrificans and to transfer Blastobacter denitrificans (HIRSCH & MULLER, 1985) to the genus Bradyrhizobium as Bradyrhizobium denitrificans (comb. nov.). **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 207–215, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.07.014>

VILELA, L.; MIRANDA, J.C.L.; AYARZA, M.A.; SHARMA, R.G. Integração lavoura pecuária: atividades desenvolvidas pela Embrapa Cerrados. Planaltina: Embrapa Cerrados, 29p. (Embrapa Cerrados. Documento, 9). 1999.

VINCENT, J. M. **A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria**. Oxford: [Published for the] International Biological Programme [by] Blackwell Scientific, 1970.

WANG, H.; QI, M.; CUTLER, A. J. A simple method of preparing plant samples for PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 17, p. 4153–4154, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/21.17.4153>

WESTHOEK, A.; FIELD, E.; REHLING, F.; MULLEY, G.; WEBB, I.; POOLE, P. S.; TURNBULL, L. A. Policing the legume-Rhizobium symbiosis: a critical test of partner choice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1419, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01634-2>

WILLEMS, A.; COOPMAN, R.; GILLIS, M. Phylogenetic and DNA-DNA hybridization analyses of Bradyrhizobium species. **International Journal of Systematic and Evolutionary**

**Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 111–117, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-111>

WOOD, T. J.; SMITH, B. M.; HUGHES, B.; GILL, J. A.; HOLLAND, J. M. Do legume-rich habitats provide improved farmland biodiversity resources and services in arable farmland? **Aspects of Applied Biology**, v.118, p.239-246, 2013. Disponível em: <https://www.gwct.org.uk/research/scientific-publications/2010-19/2013/wood2013/>

YANO, G. 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.

YAO, Y.; SUI, X. H.; ZHANG, X. X.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. *Bradyrhizobium erythrophlei* sp. nov. and *Bradyrhizobium ferriligni* sp. nov., isolated from effective nodules of *Erythrophleum fordii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. Pt\_6, p. 1831–1837, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijms.0.000183>

YATES, R.J.; HOWIESON, J.G.; HUNGRIA, M.; BALA, A.; O’HARA, G.W.; TERPOLILLI, J. Authentication of rhizobia and assessment of the legume symbiosis in controlled plant growth systems. In: HOWIESON, J. G.; DILWORTH, M. J. (eds) **Working with rhizobia**. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR Monograph No. 173), 2016, Canberra, pp 73–108. Disponível em: <https://www.aciar.gov.au/publication/books-and-manuals/working-rhizobia>. Acesso em: 4 jan. 2022.

XAVIER, R. P. **Contribuição da fixação biológica de nitrogênio na produção sustentável da cultura de cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado em Agronomia) -Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 80 f. 2006. Disponível em: <https://tede.ufrrj.br/jspui/handle/tede/545?mode=simple>. Acesso em: 11 jan. 2024.

ZILLI, J. É.; ALVES, B. J. R.; ROUWS, L. F. M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; SOARES, L. H. B.; CASSÁN, F.; CASTELLANOS, M. O.; O’HARA, G. The importance of denitrification performed by nitrogen-fixing bacteria used as inoculants in South America. **Plant and Soil**, v. 451, n. 1–2, p. 5–24, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04187-7>

ZIMMER, A. H.; MACEDO, M. C. M.; KICHEL, A. N. de ALMEIDA, R. G. Degradação, recuperação e renovação de pastagens. Embrapa Gado de Corte-Documents (INFOTECA-E). 2012.