



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

*Campus* de Campo Grande  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



---

**MAYARA SILVA TORRES DE SOUZA**

**EFEITO DA INOCULAÇÃO DE *AZOSPIRILLUM* SPP. EM GRAMÍNEAS  
FORRAGEIRAS DO PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE**

Campo Grande/MS  
2013

**MAYARA SILVA TORRES DE SOUZA**

**EFEITO DA INOCULAÇÃO DE *AZOSPIRILLUM* SPP. EM GRAMÍNEAS  
FORRAGEIRAS DO PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE**

Dissertação de mestrado apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal, junto ao Departamento de Biologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – *Campus* de Campo Grande (MS), sob a orientação da Professora Doutora Maria Rita Marques e Co-orientação da Professora Doutora Marivaine da Silva Brasil.

Campo Grande/MS  
2013

Aos meus amados pais, Antônio e Ester e  
aos meus queridos irmãos Téo e Thiago.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me presentear com o dom da vida.

Ao meu pai em especial, pelo amor incondicional, pela dedicação, compreensão, pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida.

A minha família pelo amor incondicional, incentivo e carinho.

A professora Dr<sup>a</sup>. Marivaine da Silva Brasil por quem tive a honra de ser orientada desde a graduação. Agradeço pela confiança depositada em mim e no meu trabalho, pelos ensinamentos, pelo incentivo, pela amizade e carinho. Deixo aqui minha eterna gratidão e admiração.

Ao Renan Santana Vargas, pelo amor, companheirismo e compreensão.

A Dr<sup>a</sup>. Sandra Aparecida Santos pelo incentivo, pelos ensinamentos e pelo grande apoio em todas as fases deste trabalho.

A professora Dr<sup>a</sup> Maria Rita Marques, pela orientação, pelo incentivo e pelo auxílio na confecção deste trabalho.

Ao Dr. Fábio Bueno Reis Júnior, pessoa maravilhosa que tive oportunidade de conhecer durante o curso de mestrado. Agradeço pelos ensinamentos, pelo incentivo e pelas diversas contribuições feitas, as quais foram importantíssimas para a realização deste trabalho. Agradeço também a ele e sua família pela hospedagem oferecida e por ter me apresentado a sua belíssima cidade.

A Dr. Ana Helena Bergamin Marozzi Fernandes e Dr. Marçal Henrique Amici Jorge pelas sugestões, ensinamentos e contribuição na realização das análises estatísticas.

A Dr. Ieda Carvalho Mendes, pelo incentivo e agradável recepção na Embrapa Cerrados.

Ao Supervisor Antonio Arantes Bueno Sobrinho pelo apoio.

Aos amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia vegetal pela convivência, camaradagem e amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, pelos conhecimentos compartilhados.

A todos os colegas e funcionários da UFMS- Campus do Pantanal (Izabela, Tábata, Marcela, Emílio e Denilson) pelo divertido convívio e ajuda nas atividades de laboratório.

A todos os colegas e funcionários do Laboratório de Microbiologia do solo da Embrapa Cerrados (Lucas Rolim, Clodoaldo, Lídia Sarmanho, Lídia Monteiro, Yara e Leandro) pela ajuda, pela agradável recepção e convivência durante os trabalhos realizados neste laboratório.

Ao técnico da Embrapa Cerrados, Osmar T. de Oliveira e família pela agradável acolhida quando estive em sua casa.

A todos os colegas e funcionários do Setor de Campos experimentais, Laboratório de Dieta Animal e Laboratório de solos da Embrapa Pantanal (Marcos Tadeu, Messias, Roberto, Sebastião de Jesus, Armindo, Ernandes Ravaglia, João Batista, Emerson, Miguel, Hernandes Monteiro e Sebastião Barbosa).

Ao programa de Pós- Graduação em Biologia Vegetal (UFMS) pela oportunidade para a realização deste curso.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida.

A UFMS- Campus do Pantanal, pelo laboratório na realização do trabalho.

A Embrapa Pantanal e Embrapa Cerrados pela infraestrutura e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

A Fundect pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

A todos os técnicos e demais profissionais ligados a estas instituições, que contribuíram de alguma forma pra realização deste trabalho.

## RESUMO

A pecuária de corte no Pantanal é desenvolvida de maneira extensiva, com a alimentação do rebanho constituída principalmente de pastagens nativas. Uma alternativa sustentável para melhorar a produtividade e o valor nutritivo das forrageiras pantaneiras seria a utilização de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCV). RPCVs se associam às plantas promovendo o desenvolvimento vegetal através da disponibilização de nutrientes, proteção contra fitopatógenos e produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal, como o ácido indolacético (AIA). Bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* spp. são consideradas importantes RPCV, devido aos efeitos benéficos proporcionados em plantas inoculadas com esta bactéria. O objetivo deste trabalho foi selecionar bactérias do gênero *Azospirillum* com potencial para a inoculação e avaliar o efeito da inoculação destas no crescimento de três gramíneas forrageiras do Pantanal Sul-Mato-Grossense (*Axonopus purpusii*, *Mesosetum chaseae* e *Hymenachne amplexicaulis*). Primeiramente foi realizada a identificação dos isolados bacterianos através do método de PCR a partir de iniciadores específicos para o gênero *Azospirillum*. Em seguida, isolados do gênero foram avaliados *in vitro* quanto à fixação biológica de nitrogênio (FBN) e produção de AIA. A partir dos resultados para AIA e FBN, os isolados foram selecionados em conjunto com as estirpes de referência, *A. brasilense* e *A. lipoferum* (Sp7 e Sp59), para a inoculação em pastagens. Foi conduzido o experimento em casa de vegetação utilizando como substrato o solo do Pantanal. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com quatro repetições e oito tratamentos (Controle sem inoculação, inoculação da bactéria com menor produção de AIA e FBN (HAI6), inoculação da bactéria com maior produção de AIA e FBN (HAI52), inoculação da bactéria intermediária para FBN e AIA (MRI9), inoculação da Sp7, inoculação da Sp59, inoculação da bactéria com maior produção de AIA (HAI3), inoculação da bactéria com maior produção de FBN (AZM15). Trinta e um dias após plantio foram mensuradas a altura das plantas, e as mudas foram seccionadas em raiz, haste e folhas para a determinação da matéria seca parte aérea (MSPA), matéria seca das folhas (MSF), matéria seca do colmo (MSC), relação matéria seca folha/colmo (MSFC), N total e proteína bruta acumulada na parte aérea e volume de raiz (VR). O uso de iniciadores específicos confirmaram a classificação dos isolados como pertencentes ao gênero *Azospirillum*. Todos os isolados foram capazes de fixar nitrogênio e produzir ácido indolacético *in vitro*, os valores obtidos variaram de 25,86 a 51,26  $\mu\text{g N mL}^{-1}$  e 107 a 1038  $\mu\text{M}$ , respectivamente. As concentrações de AIA produzida pelos isolados foram maiores que os encontrados na literatura para o gênero *Azospirillum*. Houve efeito da inoculação de *Azospirillum* spp. nas forrageiras em estudo. As plantas da gramínea *M. Chaseae* obtiveram maior produção de MSPA, MSC, MSFC e aumento do VR. As plantas da forrageira *H. amplexicaulis* e *A. purpusii* apresentaram um aumento no volume das raízes e produção MSPA, respectivamente. As estirpes HAI52, HAI3 e AZM15 foram consideradas promissoras para estudos posteriores de inoculação em campo.

**Palavras-chave:** Fixação Biológica de Nitrogênio, ácido indolacético, Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal, pastagem.

## ABSTRACT

The beef cattle industry in the Pantanal is developed extensively, with the feeding of the herd consists primarily of native pastures. A sustainable alternative to improve productivity and nutritive value of forages of the Pantanal would use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). PGPR associate to plants promoting your growth through the availability of nutrients, protection against phytopathogens and production of substances promoting growth of plant, such as indole acetic acid (IAA). Diazotrophic bacteria of the genus *Azospirillum* spp. are considered important PGPR, due to the beneficial effects proportionate in plants inoculated with this bacteria. The objective of this work was to select bacteria of the genus *Azospirillum* which potential for inoculation and evaluate the effect of inoculation on the growth of three grasses from Pantanal Sul-Mato-Grossense (*Axonopus purpusii*, *Mesosetum chaseae* e *Hymenachne amplexicaulis*). First indentification of the bacterial isolates was performed the method of PCR from primers specific for the genus *Azospirillum*. Then, isolated from the genus were evaluated in vitro for biological nitrogen fixation (BNF) and production of IAA. From the results for IAA and BNF, isolates were selected together the reference strains, *A. brasilense* and *A. lipoferum* (Sp7 and Sp59), for inoculation in pastures. Experiment was conducted in a greenhouse using as substrate Pantanal soil. The experimental design was a randomized blocks with four repetitions and eight treatments (control without inoculation, inoculation of bacteria with smaller production of IAA and BNF (HAI6), inoculation of bacteria with greater production of IAA and BNF (HAI52), inoculation of bacteria intermediate to BNF and IAA (MRI9), inoculation of Sp7, inoculation of Sp59, inoculation of bacteria with greater production of IAA (HAI3), inoculation of bacteria with greater production of BNF (AZM15.) Thirty-one days after planting were measured plant height, and the seedlings were sectioned into root, stem and leaves to determine the dry matter of shoot (DMS), leaf dry matter (LDM), stem dry matter (SDM), relative dry matter leaf / stem (DMLS), total N and protein accumulated in the shoot and root volume (RV). The use of specific primers confirmed the classification of the isolates as belonging to the genus *Azospirillum*. All isolates were able to fix nitrogen and produce IAA in vitro, the values ranged from 25.86 to 51.26 mg N mL<sup>-1</sup> and 107 to 1038 µM, respectively. The concentrations of IAA produced by the isolates were higher than those found in the literature for the genus *Azospirillum*. There was effect of the inoculation of *Azospirillum* spp. forage in the study. The plants of grassy *M. chaseae* obtained higher production of DMS, SDM, DMLS and increased RV. The forage plants of *H. amplexicaulis* and *A. purpusii* showed an increase in volume of roots and production DMS, respectively. Strains HAI52, HAI3 and AZM15 were considered promising for subsequent studies inoculation in the field.

**Keywords:** Biological Nitrogen Fixation, indole acetic acid, Plant Growth Promoting Rhizobacteria, pasture.

## **LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1 - Mapa da área de estudo com as principais unidades de paisagens (fitofisionomias) da sub-região da Nhecolândia, MS, e diagrama de perfil. 14
- Figura 2 - Localização da área em estudo com delimitação em invernadas. 31



## LISTA DE FOTOGRAFIAS

- Fotografia 1 - Inoculação de *Azospirillum* spp. em gramíneas e mudas de forrageiras com o tamanho e volume semelhantes. 32
- Fotografia 2 - Experimento visando ver o efeito da inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* no crescimento de três gramíneas forrageiras (*Mesosetum chaesea*, *Axonopus purpusii* e *Hymenachne amplexicaulis*) com cinco dias após a inoculação de suspensões bacterianas. 34
- Fotografia 3 - Experimento visando ver o efeito da inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* no crescimento de três gramíneas forrageiras (*Mesosetum chaesea*, *Axonopus purpusii* e *Hymenachne amplexicaulis*) com trinta e um dias após a inoculação de suspensões bacterianas. 34
- Fotografia 4 - Gel A - Perfil de amplificação gerados a partir de iniciadores específicos para o gênero *Azospirillum*: P (Padrão- Marcador 1 Kb); 1 (branco); 2 (Sp7); 3 (Sp59); 4 (AZM27); 5 (AZM28); 6 (AZM30); 7 (HAI3); 8 (HAI5); 9 (HAI6); 10 (HAI25); 11 (HAI35); 12 (HRI49). 38
- Fotografia 5 - Gel B - Perfil de amplificação gerados a partir de iniciadores específicos para o gênero *Azospirillum*: P (Padrão- Marcador 1 Kb); 1 (HAI50); 2 (HRI16); 3 (HRI27); 4 (HRI18); 5 (HRI19); 6 (HRI24); 7 (HRI32); 8 (*Bradyrhizobium* sp.); 9(*Ralstonia* sp.); 10(*Burkholderia* sp.); 11(*Chryseobacterium indologenes*). 38
- Fotografia 6 - Gel C - Perfil de amplificação gerados a partir de iniciadores específicos para o gênero *Azospirillum*: P (Padrão- Marcador 1 Kb); 1 (AZM8); 2 (AZM15); 3 (AZM22); 4 (AZM25); 5 (AZM26); 6 (AZM29); 7 (AZM31); 8 (AZM38(1)); 9 (AZM38(2)); 10 (AZM39); 11 (MRI9); 12 (MMRI6); 13 (Sp7). 39
- Fotografia 7 - Gel D - Perfil de amplificação gerados a partir de iniciadores específicos para o gênero *Azospirillum*: P (Padrão- Marcador 1 Kb); 1 (Branco); 2 (MRI5); 3 (HAI1); 4 (HAI48); 5 (HAI51); 6 (HAI52); 7 (HAI53). 39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Origem de bactérias diazotróficas isoladas de forrageiras nativas do Pantanal Sul-Mato-Grossense e origem de estirpes tipo.	27
Tabela 2 - Análises químicas de amostra do solo tipo Podzol Hidromórfico na profundidade de 0-20 cm.	31
Tabela 3 - Análises físicas de amostra do solo tipo Podzol Hidromórfico na profundidade de 0-20 cm.	31
Tabela 4 - Valores de nitrogênio total, obtidos em meio de cultura semi-sólido NFb, com inoculação de bactérias do gênero <i>Azospirillum</i> , isoladas de forrageiras nativas do Pantanal Sul-Mato-Grossense.	40
Tabela 5 - Produção de ácido indolacético (AIA) por bactérias do gênero <i>Azospirillum</i> , isoladas de forrageiras nativas do Pantanal Sul-Mato-Grossense.	42
Tabela 6 - Efeito da inoculação de <i>Azospirillum</i> spp. na altura das plantas, na produtividade da matéria seca parte aérea, matéria seca colmo, relação matéria seca folha/colmo, N total e proteína bruta acumulada na parte aérea e volume de raiz em <i>Mesosetum chaseae</i> .	45
Tabela 7 - Efeito da inoculação de <i>Azospirillum</i> spp. na altura das plantas, na produtividade da matéria seca parte aérea, matéria seca colmo, relação matéria seca folha/colmo, N total e proteína bruta acumulada na parte aérea e volume de raiz em <i>Hymenachne amplexicaulis</i> .	46
Tabela 8 - Efeito da inoculação de <i>Azospirillum</i> spp. na altura das plantas, na produtividade da matéria seca parte aérea, matéria seca colmo, relação matéria seca folha/colmo, N total e proteína bruta acumulada na parte aérea e volume de raiz em <i>Axonopus purpusii</i> .	47

## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO DE LITERATURA</b>	12
1.1 Caracterização do Pantanal	12
1.2 Pastagens nativas da Nhecolândia	13
1.3 Bactérias diazotróficas	17
1.4 Fixação Biológica de Nitrogênio em gramíneas forrageiras	20
1.5 Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal- <i>Azospirillum</i> spp.	21
1.6 Efeito da inoculação de <i>Azospirillum</i> spp. em gramíneas	23
<b>2 OBJETIVOS GERAIS</b>	26
2.1 Objetivos específicos	26
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	27
3.1 Origem dos isolados e Crescimento Microbiano	27
3.2 Identificação genética dos isolados bacterianos a partir de iniciadores específicos para o gênero <i>Azospirillum</i>	28
3.2.1 Extração de DNA dos isolados bacterianos	28
3.2.2 Reação em cadeia da polimerase utilizando o par de iniciadores AZ16S-A (complementar A232f e reverso A25r)(SHIME-HATTORI et al., 2011)	28
3.3 Avaliação da Fixação Biológica de Nitrogênio por isolados do gênero <i>Azospirillum</i>	28
3.4 Análise da produção de hormônio de crescimento (AIA - ácido indolacético) por isolados do gênero <i>Azospirillum</i>	29
3.5 Efeito da inoculação de <i>Azospirillum</i> spp. no crescimento de três gramíneas forrageiras oriundas do Pantanal da Nhecolândia cultivadas em vasos	30
3.5.1 Inoculação das Plantas	32
3.5.2 Delineamento experimental	32
3.5.3 Análises dos parâmetros avaliados	34
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	36
4.1 Identificação genética dos isolados bacterianos a partir de iniciadores específicos para o gênero <i>Azospirillum</i>	36
4.2 Avaliação da Fixação Biológica de Nitrogênio por isolados do gênero <i>Azospirillum</i>	39
4.3 Análise da produção de hormônio de crescimento (AIA - ácido indolacético) por isolados do gênero <i>Azospirillum</i>	40
4.4 Efeito da inoculação de <i>Azospirillum</i> spp. no crescimento de três gramíneas forrageiras oriundas do Pantanal da Nhecolândia cultivada em vasos	43
<b>5 CONCLUSÕES</b>	49

<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	50
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	51

## **1 REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1 Caracterização do Pantanal**

O Pantanal é uma planície sedimentar contínua, formado há milhares de anos com o soerguimento da Cordilheira dos Andes. É integrante da Bacia do rio Paraguai (BAP), abrangendo os Estados de Mato Grosso (35%) e Mato Grosso do Sul (65%), com área aproximada de 140.000 km<sup>2</sup> e altitude entre 80 a 170 m (GODOI FILHO, 1984).

O clima da região é tropical sub-úmido (Aw, de Koeppen) com temperatura média anual de 26°C (CADAVID GARCIA, 1986). A precipitação média anual na Bacia do Alto Paraguai (BAP) varia de 800 a 1600 mm, e de 800 a 1200 mm na parte mais baixa que engloba toda a área da planície pantaneira (JÚNIOR et al., 1997).

Os solos que formam a maior parte do Pantanal são do tipo hidromórficos (92%), os quais refletem a drenagem deficiente e tendência para inundações periódicas e prolongadas, são arenosos (66% do horizonte A) e de baixa fertilidade (70%). A fertilização pela cheia ocorre apenas quando a inundação for fluvial, enquanto que nas áreas alagadas por chuva, há somente redistribuição local de nutrientes (POTT, 1994).

Um dos principais eventos da planície pantaneira são os pulsos de inundações sazonais que podem ser provocados por oscilações dos níveis de água do rio, distribuições das chuvas locais e altura do lençol freático. Segundo Junk & Da Silva (1995), a inundação é muito importante para muitos aspectos ecológicos nas áreas sujeitas ao alagamento, tais como diversidade de organismos e estado nutricional do solo.

O Pantanal apresenta uma diversidade de ambientes, decorrente da sua heterogeneidade edáfica e hidrológica. Na região ocorrem uma sucessão espacial de lagoas, campos e formações arbóreas, combinadas em mosaico, cuja variação na composição, estrutura e distribuição espacial da vegetação define várias unidades de vegetação ou fitofisionomias (Pott, 1994). Devido a essa heterogeneidade o Pantanal pode ser dividido em 11 sub-regiões: Cáceres, Poconé, Barão de Melgaço, Paiaguás, Nhecolândia, Aquidauana, Miranda, Abobral, Paraguai, Nabileque e Porto Murtinho (SILVA & ABDON, 1998).

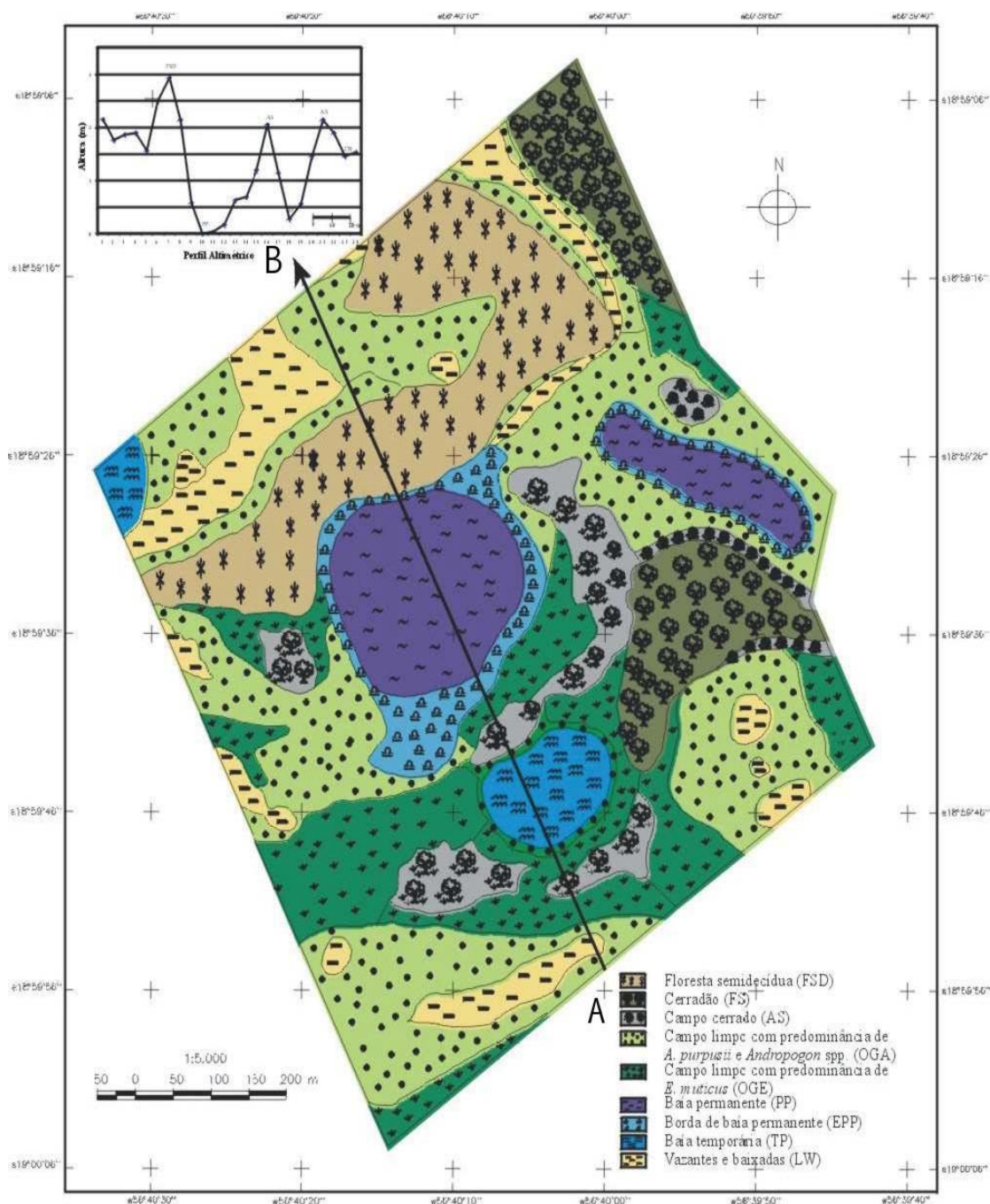
A economia da região é baseada na pecuária de corte, a qual é conduzida de maneira extensiva, por apresentar grandes campos de pastagens nativas. No entanto, de maneira geral, os índices zootécnicos são relativamente baixos. Segundo Santos et al. (2005) esses baixos índices é devido, em parte, às pastagens nativas, que são, na maioria dos casos, de baixa produtividade e qualidade, salvo aquelas que vegetam nas cotas mais baixas do mesorelevo. Além do que, a produtividade é influenciada pela disponibilidade e qualidade das pastagens

que varia de acordo com a estacionalidade e inundações periódicas da região (RODELA et al., 2007).

## **1.2 Pastagens nativas da Nhecolândia**

A sub-região da Nhecolândia, a segunda maior com 23.574 Km<sup>2</sup>, localiza-se na porção sul do leque aluvial do rio Taquari, representa uma das mais importantes regiões de criação de gado do Pantanal. Apresenta um sistema de distribuição da vegetação muito singular, com unidades de vegetação dispostas em mosaico, alternando cerradões e florestas estacionais nas “cordilheiras”, campos úmidos e sazonais, nas partes alagáveis e circulando lagoas; cerrados e campos nas partes intermediárias do relevo (Figura 1) (RODELA et al., 2007).

**Figura 1** - Mapa da área de estudo com as principais unidades de paisagens (fitofisionomias) da sub-região da Nhecolândia, MS, e diagrama de perfil



Fonte: Santos (2001)

Nestas unidades de paisagem, especialmente as localizadas nas partes mais baixas do relevo, há uma grande diversidade de espécies forrageiras, que constituem a principal fonte de alimento para os grandes herbívoros silvestres e também para os animais domésticos voltados para produção pecuária, principalmente bovina e equina. As unidades de vegetação utilizadas

como pastagens nativas são muito diversificadas em suas composições florísticas, bem como em suas estruturas (campos limpos, campos sujos, campos cerrados) e ecologias.

Santos (2001) observaram que os bovinos em pastejo, independentemente da época do ano, preferem pastar nas áreas mais baixas e úmidas e nas áreas de campo limpo com predominância de espécies de porte baixo, de maior valor nutritivo. As demais fitofisionomias são pastejadas de forma casual, cujo uso está, provavelmente, relacionado com as condições climáticas (maior ou menor presença de água nos campos) e com a qualidade das pastagens. Isso demonstra que nem todos os tipos de pastagens são usados por bovinos na mesma intensidade, ocorrendo áreas intensamente e levemente pastejadas.

A alimentação do rebanho, até início dos anos 90, era totalmente sustentada pelas forrageiras nativas. Nos últimos 30 anos houve introdução de gramíneas exóticas, principalmente braquiárias, como alternativa para melhorar a disponibilidade e qualidade das pastagens. Dentre as espécies de braquiárias as que são mais promissoras, para formação de pastagens na região, são a *Urochloa humidicola*, vindo em seguida *Urochloa decumbens* e por último *Urochloa brizantha* (CRISPIM et al., 2005). No entanto, a formação de pastagens exóticas não visa substituir totalmente as pastagens nativas por cultivadas e sim aumentar a oferta de pasto nas áreas de campo pouco utilizadas (SANTOS et al., 2005).

Na década de 80, houve financiamentos para a formação de pastagens nas áreas de cordilheiras, atualmente esta prática é considerada de alto custo, com elevado impacto ambiental, como por exemplo, erosão e empobrecimento do solo, diminuição das áreas de refúgio em grandes cheias para diversas espécies de animais silvestres, entre outros. Nesse contexto, a Embrapa Pantanal, em função de aspectos econômicos e objetivando a redução de impactos ambientais, recomenda a implantação de pastagens exóticas apenas em áreas que não necessitam de derrubadas, tais como áreas de caronal (*Elyonurus muticus*), campos de fura-bucho (*Paspalum lineare*) e campo com predominância de capim vermelho (*Andropogon hypogynus*). Estas áreas necessitam apenas de um preparo mínimo do solo, evitando o desmatamento de cordilheiras (SANTOS et al., 2005).

Entre as principais gramíneas forrageiras nativas consumidas pelos bovinos no Pantanal arenoso da região central da Nhecolândia, se sobressaem às espécies *Mesosetum chaseae*, *Axonopus purpusii*, e *Hymenachne amplexicaulis* consideradas “preferidas” pelo gado, ou seja, classificadas como espécies que apresentam grau de consumo observado com regularidade, sempre que disponíveis (SANTOS et al., 2002).

A espécie *M. chaseae* é uma erva perene, estolonífera, com perfilhamento intenso e tolerante à seca. Está gramínea apresenta via fotossintética C4 tem ampla distribuição no



Pantanal, sendo encontrada principalmente nas áreas de topografia mais elevadas (caronal e campo cerrado) e em campos limpos esporadicamente inundáveis, apresentando plasticidade de hábito e de desenvolvimento vegetativo nesses ambientes (SANTOS et al., 2002; ALVAREZ et al., 2004; SILVA, 2008).

Os estudos de Santos et al. (2002, 2005) relatam que dentre as inúmeras espécies forrageiras nativas existentes no Pantanal com potencial produtivo destaca-se a grama-do-cerrado (*M. chaseae*), especialmente devido à produtividade, aceitabilidade pelo animal e resistência à seca, além de ser uma espécie com potencial para cultivo e/ou manejo nas áreas de campos mais elevado e de baixa qualidade.

O capim mimoso (*A. purpusii*) é uma erva perene, que apresenta via fotossintética C4, possui crescimento cespitoso, e raramente emite estolhos finos (ALVAREZ et al., 2005). É encontrada principalmente nas áreas de campo limpo, é resistente à submersão temporária, mas morre quando sujeita à inundação prolongada (ALLEM & VALLS, 1987). Segundo Santos (2001) esta gramínea teve expressiva participação na dieta e do grau de desfolha, essa espécie foi considerada como “preferida” e chave para a adoção de planos de manejo das pastagens nativas da sub-região da Nhecolândia.

A forrageira *H. amplexicaulis*, conhecida como capim-capivara é uma gramínea perene e rizomatosa, nativa das Américas Central e do Sul, é uma planta altamente prolífera, sendo sua propagação realizada por sementes, estolões e ainda, por fragmentos de rizoma. Suas panículas produzem grande número de sementes viáveis, podendo uma única panícula, produzir mais de quatro mil sementes (SILVA et al., 2010a).

Na Austrália e Nova Zelândia, onde foi introduzida como forrageira, a proliferação desta planta daninha está associada há graves prejuízos ecológicos e custos substanciais relacionados ao seu controle (LAND & WATER AUSTRALIA, 2012). No Rio Grande do Sul, Brasil, autores como Sturza et al. (2011) relataram sua ocorrência como infestante em áreas cultivadas com arroz irrigado. De acordo com Silva et al. (2010a), a boa produção de sementes e estolões combinada com o eficiente metabolismo do nitrogênio, a fim de promover o crescimento vigoroso de novas folhas e perfilhos, asseguram sua sobrevivência e dificulta seu controle.

*H. amplexicaulis* é uma gramínea hidrófila, ocorrendo em locais mal drenados, margens de corpos d’água e áreas inundadas por longos períodos, tolerando até 40 semanas de alagamento em profundidades de até 1,2m (AGRICULTURE & RESOURCE MANAGEMENT COUNCIL OF AUSTRALIA & NEW ZEALAND, 2000). De acordo com Kibbler & Bahnisch (1999), o mecanismo de adaptação de *H. amplexicaulis* à inundação está

baseado na sua capacidade de rapidamente alongar as hastes, formar raízes adventícias, além de possuir aerênquimas nos tecidos das hastes, folhas e raízes. Outra adaptação, são que as sementes desta gramínea, por meio de mecanismos de dormência, podem sobreviver nos corpos d'água e germinar quando o nível diminuir (CHARLESTON, 2006). Segundo Souza Filho et al. (2000) a eficiência das plantas daninhas em habitar esses locais está na habilidade de sobreviverem melhor do que as plantas cultivadas em situações de estresse, ou porque possuem maior capacidade para explorar esses ambientes para o crescimento.

A espécie *H. amplexicaulis* que apresenta ciclo fotossintético C3, é considerada preferida provavelmente por apresentar menos estruturas fibrovasculares que as outras gramíneas, sendo mais tenras e de maior digestibilidade (SANTOS et al., 2002). As pastagens localizadas nas áreas mais baixas do mesorelevo do Pantanal, tais como as bordas e interior das baías possuem forrageiras de melhor qualidade, constituindo num banco de proteína natural para o gado. Existem espécies que apresentam cerca de 20% de proteína bruta (PB). Comparando as espécies forrageiras exóticas com as forrageiras nativas existentes nas baixadas, nota-se que as nativas apresentam qualidade superior em termos de PB e P (fósforo) (SANTOS et al., 2005).

No manejo dessas pastagens, a utilização de insumos agrícolas, principalmente dos fertilizantes nitrogenados, é inexistente. A fixação biológica de nitrogênio por bactérias diazotróficas associadas a raízes de gramíneas forrageiras encontradas no Pantanal pode melhorar a produtividade e o valor nutritivo das forrageiras, utilizadas como pastagem natural, assim como as pastagens exóticas (braquiária) na pecuária de corte na região. Esta associação poderá contribuir para o desenvolvimento sócio-econômico pantaneiro, pela diminuição dos custos de produção, principalmente no cultivo das forrageiras exóticas e na manutenção do agroecossistema do Pantanal.

Apesar da grande importância do nitrogênio na produção das pastagens (PRIMAVESI et al., 2004), pouco é conhecido sobre a incorporação de nitrogênio proveniente da associação das bactérias diazotróficas com as forrageiras do Pantanal.

### **1.3 Bactérias diazotróficas**

O nitrogênio (N) é o nutriente mineral requerido em maior quantidade e sua disponibilidade é um fator importante que limita o crescimento de plantas em ambientes naturais, bem como agrícola (KRAISER et al., 2011). É constituinte obrigatório de aminoácidos, proteínas e ácidos nucléicos, participando direta e indiretamente de diversos

processos bioquímicos das plantas (FAGERIA et al., 2003, MALAVOTA & MORAES, 2007).

O processo pelo qual o N circula mediante compartimentos terrestres, como solo, micro-organismos, plantas, animais, matéria orgânica do solo, recursos hídricos e ar é chamado de ciclo do nitrogênio. Dentro deste ciclo a atmosfera representa o reservatório principal, visto que tem aproximadamente 78% desse elemento, principalmente como di-nitrogênio ( $N_2$ ), que, em decorrência da força de ligação entre os átomos da molécula, é uma forma inerte para a maioria dos seres vivos (REIS et al., 2006). Para que o N atmosférico seja disponibilizado para a biosfera, é necessário que a ligação tripla entre os dois átomos de N seja quebrada e o  $N_2$  seja reduzido, à amônia ( $NH_3$ ), processo denominado de fixação, que pode ocorrer por meio atmosférico, mediante descargas elétricas; por meio industrial na produção de fertilizantes; e por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN). No entanto, o processo biológico contribui com a maior parte do nitrogênio fixado atualmente no Planeta (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; VITTI & HEIRINCHS, 2007; HERRIDGE et al., 2008).

A FBN é mediada por microrganismos conhecidos como diazotróficos, ou fixadores de nitrogênio, os quais possuem um complexo enzimático denominado de nitrogenase, uma metaloenzima que cataliza a conversão de  $N_2$  à  $NH_3$  a temperatura e pressão ambientes, utilizando-se de energia celular na forma de adenosina trifosfato (ATP) (REIS & TEIXEIRA 2005; HOFFMAN et al., 2009).

Apenas cerca de 5% das bactérias procarióticas carregam os genes responsáveis pelo processo de fixação biológica do nitrogênio (RAYMOND et al., 2004). Esta pequena parcela de procariotos apresenta alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. Devido a essa grande diversidade, estes microrganismos são encontrados nos mais diferentes habitats. A maioria de suas espécies é de vida livre, com ocorrência em todos os tipos de solo, rizosfera, filosfera, águas doces e salgadas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Alguns desses fixadores podem se associar a diversas espécies de plantas em diferentes graus de especificidade levando à classificação como bactérias associativas, endofíticas ou simbióticas (HUNGRIA et al., 2007). Existem bactérias diazotróficas que estabelecem uma relação simbiótica, produzindo nódulos radiculares na planta hospedeira, como os rizóbios e espécies do gênero de *Frankia* (BHATTACHARYYA & JHA, 2012). E aquelas que vivem livremente no solo, mas que frequentemente são encontradas em regiões do solo que são influenciadas pela raiz, como a rizosfera e rizoplane, ou até mesmo dentro de tecidos de plantas, quando são conhecidas como endofíticas (BERG & SMALLA, 2009).

Acredita-se que a fixação biológica de nitrogênio realizada por fixadores endofíticos possuem uma vantagem sobre os diazotróficos associativos, uma vez que ocupam espaços intimamente interligados ao hospedeiro, onde não sofrem estresses ou competição com outros organismos do solo. Desta forma tais microrganismos terão maior acesso as fontes de carbono, podendo transferir mais eficientemente os compostos nitrogenados para a planta. Além disso, os endofíticos colonizam nichos protegidos do oxigênio garantindo a funcionalidade da enzima nitrogenase (DOBBELAERE, 2003; BALDANI et al., 1997). No entanto a contribuição das bactérias de vida livre no solo ou rizosfera não deve ser subestimada, devido ao seu alto número e diversidade encontrada (BALDANI & BALDANI, 2005).

Entre as bactérias diazotróficas que não formam nódulos quando associadas às plantas, o gênero *Azospirillum* é, sem dúvida, o mais estudado (RADWAN et al., 2005). *Azospirillum spp.* são bactérias Gram-negativas de vida livre, flageladas e fixadoras de nitrogênio. Estes microrganismos possuem ampla distribuição, sendo encontrado em grande número no solo (acima de  $10^7$  células /g) e em associação com raízes, folhas e colmos de plantas (BALDANI et al., 2005). Eles exibem um metabolismo de carbono e nitrogênio versátil, o que torna bem adaptado para sobreviver no ambiente competitivo da rizosfera. (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000).

Além disso, verifica-se que a sobrevivência do gênero *Azospirillum* no solo, na ausência das plantas hospedeiras, está relacionada a vários mecanismos fisiológicos de proteção, como produção de melanina, poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), polissacarídeos e formação de cistos. Tais mecanismos permitem classificar os representantes deste gênero em bactérias rizocompetentes (BASHAN & LEVANONY, 1990; DEL GALLO & FENDRIK, 1994; revisado MOREIRA et al., 2010).

O gênero *Azospirillum* foi definido por Tarrand et al. (1978) caracterizado na época por duas espécies *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum*, fixadoras de nitrogênio e que se associam a raízes de plantas. Hoje o gênero está representado por 16 espécies: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. irakense*, *A. halopraeferans*; *A. largimobile*, *A. doebereineriae*, *A. oryzae*, *A. milensis*, *A. canadense*, *A. zae*, *A. rugosum*, *A. palatum*, *A. picis*, *A. thiophilum*, *A. rugosum*, *A. palatum* e *A. formosense*, sendo a maioria diazotrófica. Dentre as espécies do gênero *Azospirillum* as espécies mais estudadas são *A. brasilense* e *A. lipoferum*, com a estirpe Sp7 (*A. brasilense*) entre as mais utilizadas em experimentos envolvendo inoculação em gramíneas.

A inoculação de sementes com bactérias diazotróficas com o intuito de promover a FBN em agrossistemas trouxe consideráveis resultados benéficos para a sustentabilidade global da agricultura (HERRIDGE et al., 2008). O papel da FBN em leguminosas com base em sistemas de cultivo pode ser observado diretamente como um aumento no rendimento das colheitas e indiretamente no acúmulo de nitrogênio no solo, que posteriormente foi refletida por um aumento da produtividade de culturas de plantas não-leguminosas, especialmente nos membros da família *Poaceae* (Gramineae) (JENSEN et al., 2012).

Nesse sentido, a associação de forrageiras com bactérias diazotróficas pode representar uma das alternativas mais promissoras para promoção do crescimento das plantas sem causar prejuízos ao ecossistema pantaneiro, já que essas bactérias diazotróficas são nativas nos solos ou plantas, não interferindo no equilíbrio ecológico e, portanto enquadrando-se plenamente na realidade da agricultura sustentável.

#### **1.4 Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas forrageiras**

A maioria dos estudos de isolamento e identificação de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a gramíneas forrageiras ocorreram entre as décadas de 1960 e 1980, os quais evidenciaram a considerável contribuição da FBN nas mesmas. Dentre estes estudos podemos citar, o realizado por Boddey et al. (1983), utilizando a técnica diluição isotópica de  $N^{15}$ , demonstraram que a gramínea *Paspalum notatum* cv. batatais obteve 10 % de seu N ( $20 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ ) via FBN. Boddey & Victoria (1986), usando essa mesma técnica, observaram que *U. humidicola* e *U. decumbens* obtiveram 30 a 40 % de N via FBN, correspondendo a 30 e  $45 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$  de N, respectivamente.

Em décadas recentes, Morais et al. (2012) estudando a contribuição da FBN em diferentes genótipos de *Pennisetum purpureum* (capim elefante) em Anchieta-ES, Brasil, demonstraram que quatro genótipos de capim elefante obtiveram valores entre 18 e 70% de seu N via FBN, correspondendo uma entrada de 36 e  $132 \text{ Kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ , respectivamente. Quesada (2005) também estudando a FBN em diferentes genótipos de *P. purpureum* observou uma contribuição da FBN variando em média entre 38,8 e 57,3%. No trabalho de Silva et al. (2010b) a contribuição da FBN pelas bactérias diazotróficas nas pastagens (*U. humidicola*, *U. decumbens* e *P. purpureum*) variou de 10 a 42 %.

Apesar destas evidências, até o momento, os estudos na literatura abordando FBN em gramíneas forrageiras ainda são escassos. Reis Jr. (2002) salienta a necessidade em pesquisar a contribuição da FBN e diversidade de microrganismos diazotróficos que se associam com

forrageiras, a fim de se estabelecer o verdadeiro potencial destas bactérias para promover o crescimento das plantas, pois esta associação pode fornecer à planta parte do N responsável pelo seu desenvolvimento através do processo da FBN.

No Pantanal Sul-Mato-Grossense bactérias diazotróficas dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Bulkrolderia* foram isoladas de forrageiras nativas e exóticas tais como: *Elyonurus muticus*, *Axonopus purpusii*, *Hymenachene amplexicaulis*, *Mesosetum chaseae* e *Urochloa humidicola* (BRASIL et al., 2005; SOUZA, 2010; OLIVEIRA, 2013). Segundo Brasil et al. (2005) as bactérias diazotróficas pertencentes a estes gêneros dentre outros, poderiam ser responsáveis pela entrada de N no agroecossistema pantaneiro.

### 1.5 Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal – *Azospirillum* spp

A rizosfera é a zona do solo ao redor da raiz que se encontra sob influência imediata do sistema radicular. Essa zona é rica em nutrientes, devido ao acúmulo de uma variedade de compostos orgânicos liberados pelas raízes por exsudação, secreção e deposição. O crescimento e atividade microbianos são intensos na rizosfera, porque os compostos orgânicos liberados pelas raízes podem ser utilizados como fonte de energia e carbono. Bactérias que se associam às plantas, colonizando suas raízes, são denominadas rizobactérias, e podem ser classificadas de acordo com seus efeitos sobre o crescimento vegetal: benéficas, deletérias ou neutras (DOBBELAERE et al., 2003). Quando benéficas, as bactérias colonizam o sistema radicular e promovem o crescimento vegetal, sendo denominadas rizobactérias promotoras de crescimento vegetal RPCVs ou PGPR (do inglês, *plant growth promotion rhizobacteria*).

RPCVs podem estimular o crescimento vegetal através de diversos mecanismos de ação, exercido diretamente, como por exemplo, a fixação biológica de nitrogênio; a produção de hormônios de crescimento vegetal (fitormônios); solubilização de fosfato, produção de 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato de etilo deaminase para redução de etileno nas raízes em plantas em desenvolvimento, entre outros; ou indiretamente, diminuindo ou prevenindo os efeitos deletérios de microrganismos fitopatogênicos, como a produção de antibióticos, sideróforos, glucanases, cianetos e quitinases, competição por nicho dentro da rizosfera (BHATTACHARYYA & JHA, 2012). No geral, acredita-se que as RPCV promovem o crescimento das plantas pela atuação concomitante de múltiplos mecanismos (DOBBELAERE et al., 2003; MARTINEZ-VIVEROS et al., 2010).

Bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* spp. são consideradas RPCV, devido à sua capacidade para fixar nitrogênio atmosférico, sintetizar fitormônios, enzimas, sideróforos,

polissacarídeos e outras substâncias, que podem atuar para melhorar as várias fases do crescimento da planta (RADWAN et al., 2002).

Muitos relatórios têm mostrado que *Azospirillum* pode promover o crescimento e rendimento de inúmeras espécies de plantas, principalmente as de importância agrônômica ou ecológicas (OKON & LABANDERA-GONZALEZ, 1994; BASHAN & HOLGUIN, 1997; BASHAN et al., 2004). O aumento no desenvolvimento das raízes pela inoculação com *Azospirillum* acarreta numa melhora da absorção de água e nutrientes aumentando, assim, a capacidade da planta produzir e suportar estresses ambientais, tais como salinidade e seca, resultando em plantas mais vigorosas e produtivas (BASHAN & HOLGUIN, 1997; DOBBELAERE et al. 2001; BASHAN et al. 2004). Barassi et al. (2008) relatam também a melhoria nos parâmetros fotossintéticos das folhas, incluindo aumento do teor de clorofila e condutância estomática, além da maior produção de biomassa e da altura das plantas.

Muitos dos efeitos de *Azospirillum* spp. nas plantas podem ser atribuídos à produção, pela bactéria, de fitormônios, substâncias promotoras de crescimento, entre elas auxinas, citocinas e giberelinas, e não somente à fixação de N (CAVALLET et al., 2000; REIS Jr et al., 2004). Bashan & Holgin (1997) relatam ser óbvio que fitormônios, principalmente o ácido indolacético (AIA), excretados por *Azospirillum* desempenham papel essencial na promoção do crescimento de plantas em geral, devido à maior produção de matéria seca e o acúmulo de nutrientes observados por plantas inoculadas com estas RPCV.

As auxinas estão entre os fitormônios produzidos por *Azospirillum* e outros gêneros, das quais o ácido indol-acético (AIA) é a forma mais ativa e melhor caracterizada (CROZIER et al., 1988). Essa substância afeta a morfologia das raízes, aumentando o comprimento e o número de pêlos radiculares, sendo conhecido por estimular tanto respostas rápidas (aumento da elongação celular) como respostas lentas (divisão e diferenciação celular) nas plantas (DOBBELAERE et al., 2003).

O AIA pode ser sintetizado através de vias dependentes e independentes de triptofano (precursor para síntese de AIA). Entretanto, tipicamente RPCVs sintetizam AIA através da via do ácido indole-3-piruvato, utilizando a enzima descarboxilase indol-3-piruvato codificada pelo *ipdC*, com a expressão do *ipdC* e produção de AIA ocorrendo na fase estacionária, induzida pelo triptofano exógeno (RYU & PATTEN, 2008).

O método colorimétrico é frequentemente utilizado em processos de identificação e seleção de microrganismos capazes de produzir hormônios, no qual a concentração dos compostos indólicos é estimada com uma curva padrão, previamente preparada com quantidades conhecidas de AIA puro (BRICC et al., 1991).

## 1.6 Efeitos da inoculação de *Azospirillum* em gramíneas

Diante da comprovação de que bactérias diazotróficas associadas a plantas não leguminosas, principalmente poáceas, são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e produzir substâncias promotoras de crescimento, muitos estudos tem buscado avaliar os benefícios da inoculação dessas plantas com as estirpes de bactérias selecionadas pela pesquisa (REIS Jr. et al., 2011)

Okon & Labandera- Gonzales (1994), baseando-se em dados acumulados de mais de 30 anos pesquisa na área de inoculação, concluíram que bactérias do gênero *Azospirillum* são capazes de elevar a produção de importantes culturas nas mais variadas condições de clima e de solo. Entre 60 e 70% dos experimentos levantados por estes autores apresentaram respostas positivas a inoculação com *Azospirillum* com aumentos no rendimento estatisticamente significativos na ordem de 5 a 30%.

No Brasil, mesmo em solo com alta população de *Azospirillum*, foram observadas respostas positivas nas culturas de milho, sorgo, arroz e trigo à inoculação com esta bactéria diazotrófica (DÖBEREINER et al., 1995; MENDONÇA et al., 2006). Sala et al. (2005), observaram que a inoculação de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* e *Herbaspirillum* promoveram o crescimento e o acúmulo de N em plantas de trigo. No trabalho de Reis Jr. et al. (2008) a inoculação com *A. amazonense* promoveu maior produção de matéria seca e acúmulo de N nas raízes de milho. Kuss et al. (2008) constataram que plantas de arroz irrigado, quando cultivadas em solução nutritiva com *Azospirillum* spp. apresentaram aumento na produção de matéria seca da parte aérea.

Poucos experimentos com pastagem foram conduzidos, no entanto os trabalhos existentes mostram que há efeito da inoculação nesta cultura. Itzigsohn et al. (2000) mostraram que a inoculação de *Azospirillum* em pastagens tem grande potencial para tornar-se uma técnica aplicável a estes sistemas em condições de déficit hídrico e/ou baixa fertilidade. Apesar de já existirem, formulações de inoculantes de *Azospirillum* comercialmente disponíveis, estudos sobre sua utilização, assim como de outras RCPVs em pastagens, são muito escassos. No entanto, o uso destes microrganismos associado a um adequado manejo do solo, baseados em comparações com a aplicação de fertilizantes, são mais vantajosos economicamente e não impactam o meio ambiente (OKON & VANDERLEYDEN, 1997; ITZIGSOHN et al., 2000).

Fallik & Okon (1996) observaram aumento do crescimento panicular e matéria seca de *Setaria italica*, cultivada em condições de vaso quando inoculada com *A. brasilense*. Outros



experimentos de inoculação com *Azospirillum* citados por Okon & Labandera-Gonzales (1994) também mostraram efeitos significativos sobre a matéria seca de gramíneas forrageiras como *Penisetum americanum*, *Penisetum purpureum*, *Panicum maximum* e *Digitaria decumbens* (Estados Unidos), *Setaria italica* (Israel), *U. mutica* (México). No trabalho de Brasil et al. (2005) grande parte das gramíneas forrageiras da região do Pantanal Sul-Mato-Grossense (*Brachiaria humidicola*, *Elyonurus muticus* e *Axonopus purpusii*) inoculadas com a mistura de bactérias (*A. brasilense* + *A. lipoferum*) apresentaram maior produção de matéria seca da raiz, da parte aérea e acúmulo de N do que o controle sem inoculação, porém o efeito da inoculação tornou-se mais evidente aos 60 e 90 dias após o plantio.

Das bactérias diazotróficas associativas, o gênero *Azospirillum* foi o mais usado para produção de inoculantes comerciais ou experimentais para a agricultura (FAGES, 1994). No mercado mundial já foram lançados inoculantes comerciais contendo *A. brasilense* nos Estados Unidos (Azo-Green<sup>TM</sup>); na Itália, Alemanha e Bélgica (Zea-Nit<sup>TM</sup>); na França (estirpe CRT1); no México (Fertilizante para Milho), na Argentina (Graminante<sup>TM</sup>) e na Índia várias indústrias produzem inoculantes contendo *Azospirillum* para diversas culturas (REIS, 2007).

No Brasil, está sendo testada uma mistura de cinco espécies de diazotróficos (*Gluconoacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicas*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*), um inoculante misto para cana-de-açúcar e outras gramíneas. Os resultados têm mostrado que, com o uso do inoculante, cerca de 30 Kg de N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> podem deixar de ser aplicados (Reis Jr. & Reis, 2009). O inoculante desenvolvido para cana de açúcar foi resultado da pesquisa realizada por Oliveria et al. (2006) que observou em experimentos de campo, incrementos de até 24,7% na produtividade e 31,4% na produção da matéria seca das plantas inoculadas com essa mistura de bactérias.

A Embrapa Soja e a UFPR selecionaram e avaliaram estirpes de *Azospirillum* para as culturas do milho e trigo, seguindo os protocolos da legislação brasileira. Os resultados apresentados neste estudo resultaram na autorização das estirpes de *A. brasilense* Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 para a produção de inoculantes para a cultura do milho, uma vez que obtiveram com a inoculação incrementos no rendimento de grãos de 24% a 30% em relação ao controle não inoculado. Para a cultura do trigo, as estirpes Ab-V1, Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V8 foram as mais efetivas, resultando em um incremento na produtividade de 13% a 18%. Em uma segunda etapa do estudo, ensaios a campo avaliaram as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* em veículo líquido e turfoso e observou-se um aumento médio na produtividade de milho de 26% e de 31% na do trigo (HUNGRIA et al., 2010; HUNGRIA, 2011).

Como resultado dessa pesquisa, foi lançado o primeiro inoculante comercial para milho, disponível no mercado brasileiro. Os fabricantes de Masterfix Gramíneas<sup>TM</sup> apontam um potencial para a economia de até 50% na utilização de fertilizantes nitrogenados industriais (AGROLINK, 2009). Recentemente, a Embrapa Soja em parceria com a Total Biotecnologia lançou um novo inoculante a cultura do milho e o primeiro inoculante para a cultura do trigo no Brasil. Azo Total® é um inoculante que contém as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* e moléculas protetoras para as condições tropicais (AGROLINK, 2011; HUNGRIA, 2011).

## 2 OBJETIVOS GERAIS

Selecionar bactérias do gênero *Azospirillum* com potencial para a inoculação e avaliar o efeito da inoculação destas no crescimento de três gramíneas forrageiras (*Axonopus purpusii*, *Mesosetum chaseae* e *Hymenachne amplexicaulis*).

### 2.1 Objetivos específicos

- Identificar geneticamente os isolados bacterianos através do método de PCR a partir de iniciadores específicos para o gênero *Azospirillum*.
- Avaliar *in vitro* a capacidade de fixação biológica de nitrogênio e produção de ácido indolacético por bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* isoladas de gramíneas forrageiras nativas do Pantanal Sul-Mato-Grossense.
- Selecionar bactérias com potencial para inoculação a partir dos resultados verificados para AIA e FBN.
- Avaliar sob condição de casa de vegetação o efeito da inoculação de *Azospirillum* spp., sobre o crescimento de três gramíneas forrageiras (*Axonopus purpusii*, *Mesosetum chaseae* e *Hymenachne amplexicaulis*).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Origem dos isolados e crescimento microbiano

As bactérias diazotróficas utilizadas no presente estudo foram isoladas de três pastagens nativas do Pantanal Sul-Mato-Grossense: *Axonopus purpusii*, *Mesosetum chaseae* e *Hymenachne amplexicaulis*, em coletas feitas nos meses de março e julho de 2008 (SOUZA, 2010) e nos meses de março e agosto de 2010 (OLIVEIRA, 2013). As gramíneas nativas foram coletadas na área da fazenda Nhumirim localizada na sub-região da Nhecolândia, pertencente a Embrapa Pantanal, Corumbá - MS, situada a 18° 59'S e 56° 39'W. O isolamento baseou-se em técnicas descritas por Döbereiner et al. (1995). A origem desses isolados está ilustrada na Tabela 1.

**Tabela 1** - Origem de bactérias diazotróficas isoladas de forrageiras nativas do Pantanal Sul-Mato-Grossense e origem de estirpes tipo.

FORRAGEIRA	ISOLADO BACTERIANO	
<i>Hymenachene amplexicaulis</i>	HAI1, HAI3, HAI5, HAI6, HRI16, HRI27, HRI18, HRI19, HRI24, HAI25, HRI32, HAI35, HAI48, HRI49, HAI50, HAI51, HAI52, HAI53	
<i>Mesosetum chaseae</i>	AZM22, AZM25, AZM26, AZM27, AZM28, AZM29, AZM30, AZM31, AZM38(1), AZM38(2), AZM39, MRI5, MRI9	
<i>Axonopous purpusii</i>	AZM8, AZM15, MMRI6	
Estirpes tipo de referência	Espécie	Origem de isolamento e referência
Sp7 (BR11001T) <sup>(1)</sup>	<i>A. brasilense</i>	Rizosfera de <i>Digitaria decumbens</i> (Tarrand et al., 1978)
Sp59 (BR11080T) <sup>(1)</sup>	<i>A. lipoferum</i>	Rizosfera de <i>Triticum aestivum</i> (Tarrand et al., 1978)

<sup>(1)</sup> BR – Coleção de Cultura da Embrapa Agrobiologia  
Fonte: Produção própria (2013)

Os isolados bacterianos foram crescidos em meio Dygs, por 24 horas, sob agitação constante de 100 rpm a 30 °C. Alíquotas de 20 µL do cultivo foram transferidos e crescidos no período de 3 a 5 dias em meio semi-sólido NFb, semi-específicos para *Azospirillum* spp. Posteriormente, foram passados para meio batata sólido, para verificar a presença de contaminantes. Esse processo foi repetido até que se certificasse que todos os isolados estivessem puros e viáveis para que os mesmos pudessem ser utilizados no presente trabalho.

### **3.2 Identificação genética dos isolados bacterianos a partir de iniciadores específicos para o gênero *Azospirillum***

#### **3.2.1 Extração de DNA dos isolados bacterianos**

O DNA dos isolados foi extraído com a utilização do Pure Link Genomic DNA Mini Kit da marca Invitrogen, seguindo as instruções do fabricante.

#### **3.2.2 Reação em cadeia da polimerase utilizando o par de iniciadores AZ16S-A (complementar A2324f e reverso A25r) (SHIME-HATTORI, et al., 2011)**

Após a extração de DNA procedeu a PCR contendo 2,5  $\mu\text{L}$  de 10 X tampão, 1,5 mmol  $\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , 0,25 mmol  $\text{L}^{-1}$  de cada dNTP, 0,02  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cada iniciador (A2324f e A25r), 2,5 unidades de Taq DNA polimerase e 10  $\mu\text{L}$  DNA bacteriano bruto em um volume total de 25  $\mu\text{L}$ . As condições de termociclagem foram: 3 min de desnaturação inicial a 94 °C seguido por 35 ciclos de 30s de desnaturação a 94 °C, 30 s de recozimento a temperatura de 58 °C e extensão de 1 min a 72 °C com extensão final de 5 min a 72 °C. As sequências do par de iniciadores Az16 -A são: 5'GCGGTAATACGAAGGGGGCK para A2324f (iniciador complementar) e 5'CTTGTCACCGGCAGTTCCACCAG para A25r (iniciador reverso). Apresentando um amplicon de 646 pb.

### **3.3 Avaliação da Fixação Biológica de Nitrogênio por isolados do gênero *Azospirillum***

A capacidade de FBN dos isolados do gênero *Azospirillum* e das estirpes de referência do gênero foi avaliada através do método semi-micro Kjeldhal (TEDESCO et al., 1995) com algumas modificações (GALVANI & GAETENER, 2006). A avaliação seguiu a metodologia proposta por Kuss et al. (2007) com modificações descritas a seguir:

As culturas puras foram inoculadas e cultivadas por 24 h a 30 °C em meio Dygs. Após o crescimento estas tiveram sua densidade ótica ajustada para 0,5 em espectrofotômetro a 600 nm. Alíquotas de 600  $\mu\text{L}$  da solução de resultante foram colocados em frascos com 10 mL de meio NFb semi-sólido, em triplicatas, incubados a 30 °C por cinco dias. Após o crescimento bacteriano, foram armazenados em congelador a -14 °C até que fossem analisados. Procedeu-se a ruptura das células, para liberação do conteúdo celular, tendo-se retirado os tubos do congelador e os aquecido em microondas por 15 segundos por frasco. Posteriormente, 4,0 mL de cada amostra (meio + conteúdo celular) foram vertidas em tubos para digestão, adicionando-se a cada tubo com as células lisadas cinco pérolas de vidro, 0,33 g da mistura

catalítica (proporção de 10 g de  $\text{NaSO}_4$  para 0,5 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) e 2,0 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , nesta ordem. Os tubos foram aquecidos em bloco digestor por 2 horas, a 180 °C, e a temperatura foi elevada gradativamente para 400 °C, mantida até que a mistura apresentasse a cor verde-claro. Ao atingir a cor, aguardou-se que a temperatura da mistura reduzisse até aproximadamente 40 °C e adicionou-se 2,0 mL de água deionizada a cada tubo. Como controle, utilizou-se meio de cultura sem inoculação.

Após o processo de digestão, procedeu-se à destilação com 6,20 mL de NaOH a 40 % que foi adicionado a cada tubo. O destilado foi para os erlenmeyers (vol. 50 mL) já previamente com 1,24 mL da mistura de ácido bórico a 2 % (100 g de ácido bórico dissolvidos em 10 L de água destilada) e os indicadores mistos (70 mg de vermelho de metila e 100 mg de verde de bromocresol dissolvidos em 200 mL de metanol). Por último, procedeu-se à titulação das amostras contidas nos erlenmeyers com ácido clorídrico a 0,01 mol L<sup>-1</sup> para quantificação do N total (Nt). O cálculo de Nt fixado foi apresentado em microgramas por mililitro de meio.

Os resultados referentes à avaliação do potencial de fixação biológica de N<sub>2</sub> pelos isolados foram submetidos à análise de variância, e a comparação de médias pelo teste de Tukey a 0,01 % de probabilidade.

### **3.4 Análise da produção de hormônio de crescimento (AIA – ácido indolacético) por isolados do gênero *Azospirillum***

A capacidade de produção de AIA por isolados do gênero *Azospirillum* e das estirpes de referência do gênero foi analisada pela utilização da metodologia colorimétrica descrita por Sarwar & Kremer (1995) com modificações descritas por Reis Jr. et al. (2004).

As culturas puras de bactérias foram inoculadas e cultivadas por 24 h a 30 °C em meio NFb contendo 0,1 % de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (sem extrato de levedura, vitaminas biotina e azul de bromotimol). Após o crescimento, estas tiveram sua densidade ótica ajustada para 0,5 a 500 nm. Da suspensão resultante foram adicionados 2,0 mL em 28 mL de meio de crescimento, o mesmo NFb acrescidos de 100 µg mL<sup>-1</sup> de triptofano filtrado em millipore (0,2 µm), dispostos em erlenmeyers de 50 mL. Foram utilizadas duas repetições para cada isolado. Os erlenmeyers foram incubados no escuro por 72 h a 30 °C. Após este período, para a análise de auxinas as culturas foram ajustadas para 10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup> a 436 nm de absorbância com água estéril. Posteriormente alíquotas de 1,0 mL foram retiradas da solução diluída e colocadas em eppendorf estéreis de 1,5 mL (volume) e centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos. Uma

alíquota de 150 µL do material centrifugado foi aplicada em placas de poliestireno (capacidade para 300 µL) devendo reagir com 100 µL do reagente de Salkowisk (1,0 mL de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,5 M em 50 mL de  $\text{HClO}_4$  35%) previamente preparado. Após incubação no escuro a temperatura ambiente por 30min, observou-se a formação de uma cor rósea e as leituras de absorbância foram realizadas utilizando um espectrofotômetro Labsystem Multiskan Plus (Labsystems Oy, Helsinki, Finlândia) dotado de um filtro de interferência de 492 nm e os dados armazenados e processados pelo programa Labsystems Transmit Multiskan Plus for Windows. A concentração do AIA pode ser estimada com uma curva-padrão previamente preparada com quantidades conhecidas do autêntico AIA (0; 25; 50; 100; 200; 500, 1000 µM), de acordo com a equação  $y = 910,75x - 0,0975$  ( $R^2 = 0,998$ ). Também foram utilizadas duas repetições para cada concentração de AIA.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, e a comparação de médias pelo teste Tukey a 0,01 % de probabilidade.

Após as análises estatísticas dos resultados obtidos para AIA e FBN, as bactérias foram selecionadas para serem utilizados no experimento de inoculação.

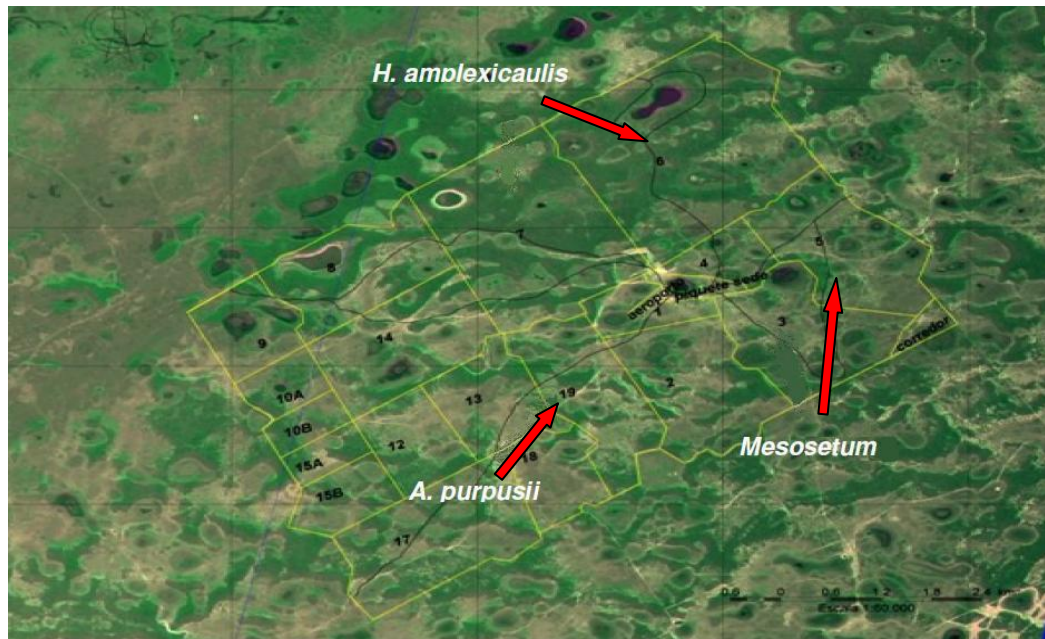
Como observação para esse estudo, os isolados HAI5 e HRI17 não foram usados nas análises da capacidade de fixação biológica de nitrogênio e produção de ácido indolacético, porque as mesmas apresentavam-se contaminadas.

### **3.5 Efeito da inoculação de *Azospirillum* spp. no crescimento de forrageiras oriundas do Pantanal da Nhecolândia cultivadas em vasos**

Para avaliar o efeito da inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* foi conduzido experimento em vasos em casa de vegetação, utilizando como substrato solo deste bioma. O solo e as mudas das três gramíneas forrageiras usadas no experimento foram coletadas na fazenda Nhumirim, sub-região da Nhecolândia, pertencente à Embrapa Pantanal, localizada na latitude 18°59' S e longitude 56°37' W, ocupando uma área de 4.130 ha.

As mudas das plantas foram coletadas nas invernadas 5 caracterizadas por campo limpo em área livre de inundação (*Mesosetum chaseae*), invernada 19 caracterizada por campo limpo também, porém em área sujeitas a inundações sazonais (*Axonopus purpussi*) e invernada 6 (área de reserva) caracterizada por borda de baía em área úmida inundada (*Hymenachne amplexicaulis*) (Figura 2) (BAZZO et al., 2010).

**Figura 2** - Localização da área em estudo com delimitação de invernadas.



Fonte: Bazzo (2010)

O solo do Pantanal é predominantemente do tipo Podzol Hidromórfico, contendo em média 0,5% de matéria orgânica e 2% de argila (EMBRAPA, 1999). As condições químicas e físicas do solo nos 20 cm superficiais estão arroladas nas tabelas 2 e 3. No solo coletado, também foram feitas contagens de bactérias diazotróficas com o meio de cultivo NFb pelo método NMP (DOBEREINER et al., 1995) e foram encontradas em torno de  $3,0 \times 10^3$  células  $g^{-1}$  de solo. O solo foi peneirado e 6,0 L foram colocados em vasos com capacidade para 8,0 L. As espécies de gramíneas nativas avaliadas foram: *Mesosetum chaseae*, *Axonopus purpusii* e *Hymenachne amplexicaulis*.

**Tabela 2** - Análises químicas de amostra do solo tipo Podzol Hidromórfico na profundidade de 0-20 cm.

pH	H+Al	Al	Ca	Mg	K	Na	P	Mn	Fe	Cu	Zn
H <sub>2</sub> O	meq/100cm <sup>3</sup>				cmolc/dm <sup>3</sup>				mg/L		
5,3	1,5	0,2	0,29	0,07	0,045	0,02	6,705	5,9	319,76	2,23	2,7

**Tabela 3** - Análises físicas de amostra do solo tipo Podzol Hidromórfico na profundidade de 0-20 cm.

Areia grossa	Areia fina	Areia total	Silte	Argila
32,22 %	61,23 %	93,45%	5,03%	1,52%



### 3.5.1 Inoculação das plantas

Antes da inoculação, foi realizada a contagem de microrganismos em placas no período de 12, 24, 36 e 48 horas, com o objetivo de estimar o número de bactérias presentes no meio de cultura, ou seja, o tempo que ela atingiria  $10^9$  céls mL<sup>-1</sup> de meio. Sendo este o número que seria inoculado nas mudas de plantas.

Para a produção do inoculante, as bactérias do gênero *Azospirillum* foram cultivadas em meio Dygs por 24 horas (HAI52, HAI6, AZM15, HAI3, Sp7 e Sp59) e 36 horas (MRI9) e 1,0 mL dessa suspensão contendo  $10^9$  células mL<sup>-1</sup> foram inoculadas nas raízes das mudas de plantas (Fotografia 1-A) Estas mudas foram previamente lavadas em água corrente e podadas (raiz e parte aérea) para que as mesmas tivessem tamanho e volume semelhantes (Fotografia 1-B).

**Fotografia 1** - Inoculação de *Azospirillum* spp. em gramíneas e mudas de forrageiras de tamanho e volume semelhantes.

A



B



Fonte: Produção própria (2013).

### 3.5.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com quatro repetições e oito tratamentos (Controle sem inoculação, inoculação da bactéria com menor produção de AIA e FBN (HAI6), inoculação da bactéria com maior produção de AIA e FBN (HAI52), inoculação da bactéria intermediária para FBN e AIA (MRI9), inoculação da estirpe de referência para *A. brasilense* (Sp7), inoculação da estirpe de referência para *A. lipoferum* (Sp59), inoculação da bactéria com maior produção de AIA (HAI3), inoculação da bactéria com maior produção de

FBN (AZM15), em três espécies de plantas: *Mesosetum chaseae*, *Axonopus purpusii* e *Hymenachne amplexicaulis* (Fotografias 2 e 3). As plantas foram irrigadas diariamente, cinco vezes ao dia, com água, não havendo a utilização de solução nutritiva.

**Fotografia 2** - Experimento visando ver o efeito da inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* no crescimento de três gramíneas forrageiras (*Mesosetum chaesea*, *Axonopus purpusii* e *Hymenachne amplexicaulis*) com cinco dias após a inoculação de suspensões bacterianas.



Fonte: Produção própria (2013).

**Fotografia 3** - Experimento visando ver o efeito da inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* no crescimento de três gramíneas forrageiras (*Mesosetum chaesea*, *Axonopus purpusii* e *Hymenachne amplexicaulis*) com trinta e um dias após a inoculação de suspensões bacterianas.



Fonte: Produção própria (2013).

### 3.5.3 Análises dos parâmetros avaliados

As avaliações foram realizadas 31 dias após a inoculação. Os parâmetros avaliados foram: altura das plantas, matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca das folhas (MSF), matéria seca do colmo (MSC), relação matéria seca folha/colmo (MSFC), N total e proteína bruta acumulada na parte aérea e volume de raiz (VR).

#### A. Altura da planta

As forrageiras de cada vaso foram retiradas e suas raízes foram lavadas sobre uma série de peneiras de malha decrescente (malha 10 de 2,0 mm e malha 40 de 425  $\mu$ m) para a eliminação do solo. A altura das plantas foi mensurada em centímetros (cm) utilizando-se de fita métrica. A altura da forrageira *H. amplexicaulis* foi medida a partir da base do colo até a gema apical mais alta. Já a altura das forrageiras *M. chaseae* e *A. purpusii* foram medidas do início da haste até a altura da folha mais alta.

Posteriormente, as plantas foram seccionadas em folha, colmo e raiz para que os parâmetros a seguir fossem avaliados. Porém, a espécie *M. chaseae* foi seccionada em mais uma seção denominada parte morta, sendo que esta parte não foi utilizada para as análises decorrentes.

#### B. Volume de raiz

O volume da raiz foi mensurado utilizando-se de uma proveta com volume de água conhecido (300 mL), onde as raízes foram mergulhadas para registro do volume deslocado em  $\text{cm}^3$ .

#### C. Matéria seca parte aérea, matéria seca folha, matéria seca colmo e relação matéria seca folha/colmo.

As folhas, raízes e colmos de cada tratamento foram acondicionadas em sacos de papel devidamente identificado, e pesadas em balança eletrônica. Posteriormente, foram levados para a secagem em estufa de circulação forçada de ar a 70 °C durante 72 horas. Após este período, os materiais foram novamente pesados para determinação do peso seco.

#### D. Nitrogênio total e proteína bruta acumulada na parte aérea

O nitrogênio total e proteína bruta acumulada na parte aérea foram avaliados pelo método de Kjeldahl (TEDESCO et al., 1995) com algumas modificações (GALVANI & GAETENER, 2006).

**E. Análise estatística**

Os resultados dos parâmetros avaliados foram submetidos à análise de variância e quando significativos foi realizado o teste Tukey a 5% de probabilidade. E quando as médias não diferiam no teste Tukey foi utilizado o teste T ( $P < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Identificação genética dos isolados bacterianos a partir de iniciadores específicos para o gênero *Azospirillum*

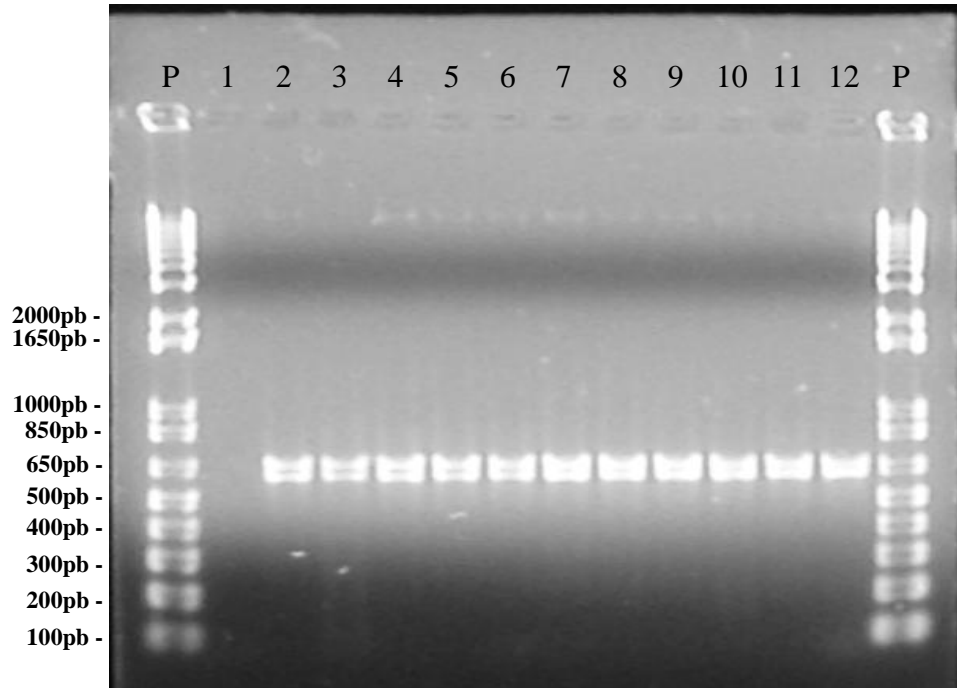
Através do uso do método de PCR observou-se que 94,2% dos isolados avaliados no presente trabalho, com exceção dos isolados AZM8 e HAI1, apresentaram a banda de tamanho (aproximadamente 650 pb) correspondente ao descrito por Shime-Hattori et al. (2011) e semelhantes às estirpes de referência utilizadas (Sp7 e Sp59), e diferentes dos quatro controles negativos utilizados (*Bradyrhizobium* sp.; *Ralstonia* sp.; *Burkholderia* sp., *Chryseobacterium indologenes*) (Fotografias 4, 5, 6 e 7).

Esses resultados são fortes indícios de que a maioria dos isolados pertencem ao gênero em estudo. Além disso, os resultados foram condizentes com os observados na visualização morfológica, pois os dois isolados considerados negativos (banda de tamanho diferente ou ausência de banda) mostraram morfologia da colônia diferentes da característica para espécies do gênero, muito provavelmente não se trate de estirpes de *Azospirillum*.

Atualmente uma etapa importante no processo de caracterização e descrição de isolados é o uso de técnicas moleculares. Informações genéticas associadas às fenotípicas geram informações mais detalhadas sobre o isolado e permitem uma abordagem polifásica (REIS et al., 2010)

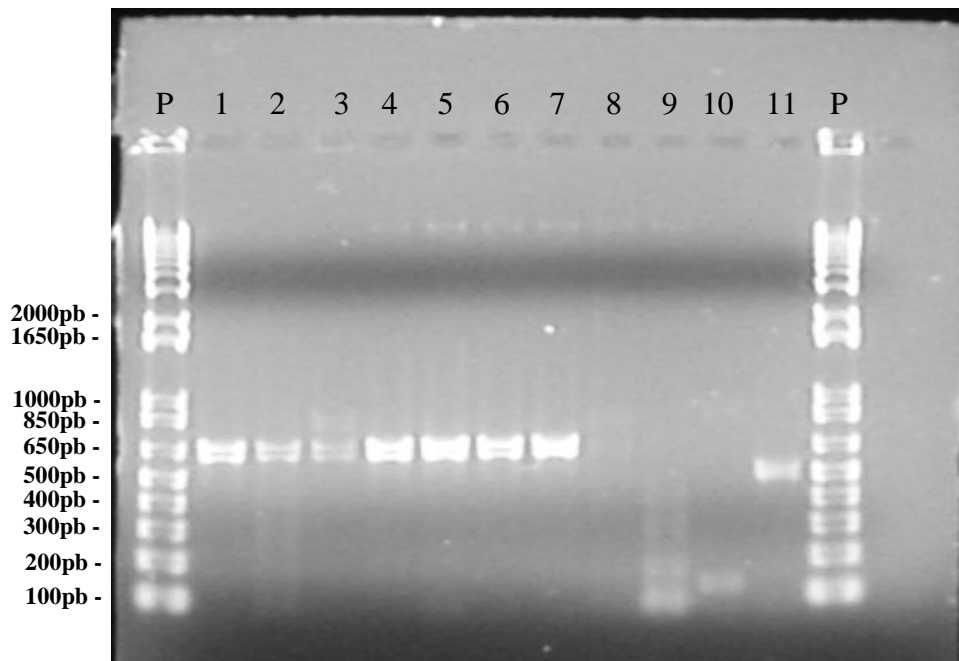
Nesse estudo foi utilizado o par de iniciadores Az16S-A (complementar A2324f e reverso A25r) que foi recentemente desenvolvido para facilitar a detecção e identificação de isolados de *Azospirillum* dentro das populações de bactérias da rizosfera. Este método de PCR provavelmente serve como uma ferramenta útil para analisar a diversidade e ecologia de populações do gênero (SHIME-HATORI et al., 2011), além da identificação mais precisa desse grupo de microrganismos.

**Fotografia 4 -** Gel A - Perfil de amplificação gerados a partir de iniciadores específicos para o gênero *Azospirillum*: P (Padrão- Marcador 1 Kb); 1 (branco); 2 (Sp7); 3 (Sp59); 4 (AZM27); 5 (AZM28); 6 (AZM30); 7 (HAI3); 8 (HAI5); 9 (HAI6); 10 (HAI25); 11 (HAI35); 12 (HRI49).



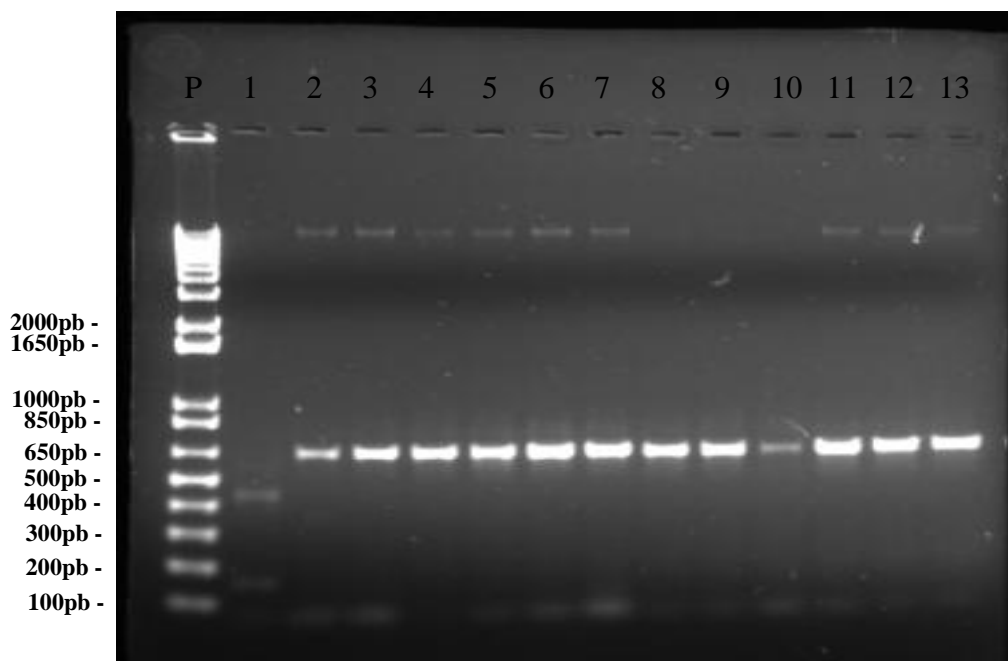
Fonte: Produção própria (2013)

**Fotografia 5 -** Gel B - Perfil de amplificação gerados a partir de iniciadores específicos para o gênero *Azospirillum*: P (Padrão- Marcador 1 Kb); 1 (HAI50); 2 (HRI16); 3 (HRI27); 4 (HRI18); 5 (HRI19); 6 (HRI24); 7 (HRI32); 8 (*Bradyrhizobium* sp.); 9 (*Ralstonia* sp.); 10 (*Burkholderia* sp.); 11 (*Chryseobacterium indologenes*).



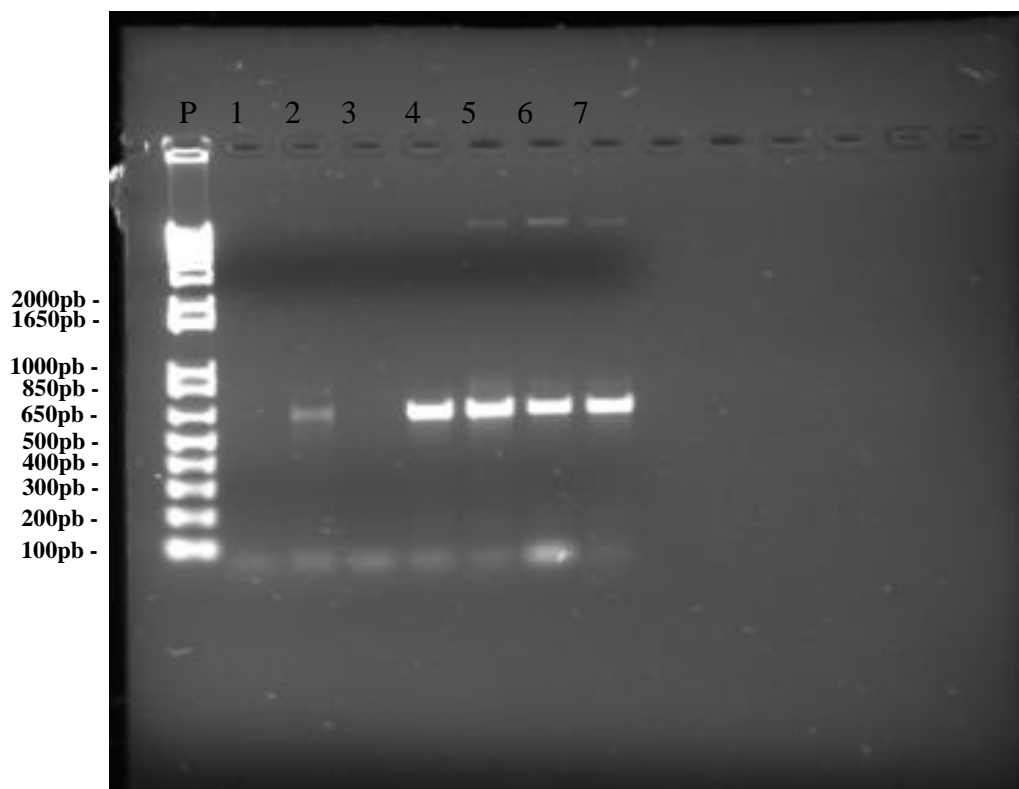
Fonte: Produção própria (2013)

**Fotografia 6** - Gel C - Perfil de amplificação gerados a partir de iniciadores específicos para o gênero *Azospirillum*: P (Padrão- Marcador 1 Kb); 1 (AZM8); 2 (AZM15); 3 (AZM22); 4 (AZM25); 5 (AZM26); 6 (AZM29); 7 (AZM31); 8 (AZM38(1)); 9 (AZM38(2)); 10 (AZM39); 11 (MRI9); 12 (MMRI6); 13 (Sp7).



Fonte: Produção própria (2013)

**Fotografia 7** - Gel D - Perfil de amplificação gerados a partir de iniciadores específicos para o gênero *Azospirillum*: P (Padrão- Marcador 1 Kb); 1 (Branco); 2 (MRI5); 3 (HAI1); 4 (HAI48); 5 (HAI51); 6 (HAI52); 7 (HAI53).



Fonte: Produção própria (2013)



#### 4.2 Avaliação da Fixação Biológica de Nitrogênio por isolados do gênero *Azospirillum*

Os valores de N total, em meio de cultura, apresentaram grande faixa de variação, de 25,86 a 51,26  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 4). Santos et al. (2009) testaram 25 isolados de *Azospirillum* spp. (oriundos de pastagens) quanto à FBN pela técnica de redução de acetileno, que apresentaram, como neste experimento, ampla faixa de variação, de 26 a 256 nmoles  $\text{C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1}$ . Grandes variação da atividade da nitrogenase de isolados naturais foram também observadas por Han & New (1998), entre os membros da população amostrais coletadas em trigo, apresentando de 0 a 154,9 nmol  $\text{C}_2\text{H}_4 \text{ mg proteína}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

**Tabela 4** - Valores de nitrogênio total, obtidos em meio de cultura semi-sólido NFb, com inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum*, isoladas de forrageiras nativas do Pantanal Sul-Mato-Grossense <sup>(1)</sup>.

Isolados	N total ( $\mu\text{g/mL}$ )
AZM15	51,26a
AZM29	50,79a
AZM22	49,14ab
HAI52	48,55abc
HAI50	48,14abc
HAI51	46,67abcd
AZM31	45,85abcde
AZM27	44,62abcdef
Sp59	44,53abcdef
HAI3	43,67abcdefg
AZM28	43,26abcdefg
AZM38 2	43,20abcdefg
HRI16	42,56abcdefg
AZM25	41,62abcdefg
Sp7	41,38abcdefgh
HRI24	40,09bcdefgh
HRI19	39,44bcdefgh
HAI25	38,62cdefgh
MRI9	37,50defgh
AZM39	37,03defgh
HRI18	36,86defgh
AZM26	36,68defgh
HAI35	36,62defgh
AZM30	36,62defgh
MRI5	36,39efgh
HAI53	36,15efgh
HRI49	36,10efgh
HRI32	34,92fghi
MMRI6	34,62fghi
AZM38 1	34,33ghi
HAI48	31,33hi
HAI6	25,86i
CV(%)	6,8

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 0,01% de probabilidade.

Fonte: Produção própria (2013)



Dos 30 isolados testados quanto a FBN, destacaram-se os isolados AZM15 (51,26  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e AZM22 (49,14  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) com maiores valores, inclusive em relação aos padrões utilizados de *A. lipoferum* (44,52  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e *A. brasilense* (41,38  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Tabela 4). No trabalho de Cardoso (2008) os valores de N total fixado por bactérias do gênero *Azospirillum*, em meio NFb e LGI, variaram entre 5,18 e 22,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Kuss et al., (2007) obtiveram valores de N total em uma faixa de variação, de 5,56 a 12,99  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , em isolados obtidos em meio NFb (específico para *Azospirillum* spp.) oriundos das raízes de arroz, sendo que as estirpes padrões *Azospirillum brasilense* e *Azospirillum lipoferum* obtiveram valores significativamente maiores em relação aos outros isolados, 41,09 e 46,82  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Como observado, apesar de ambos os trabalhos obtiverem resultados semelhantes para as estirpes padrões houve grande disparidade em relação à capacidade dos isolados em fixar nitrogênio que foi maior neste estudo, utilizando a mesma metodologia de quantificação de N total pelo método kjeldahl (TEDESCO et al., 1995).

Bactérias do gênero *Azospirillum* spp. possuem um complexo enzimático denominado nitrogenase, que cataliza a conversão do N atmosférico em amônia, sob condições microaerófilas e com baixos níveis de N. (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000).

Avanços significativos ocorreram na área da FBN em gramíneas com a descoberta do meio semi-sólido NFb, pelo grupo da Dra. Johanna Döbereiner na década de 70 (OLIVEIRA et al., 2002). Elaborado sem fonte nitrogenada, a condição de semi-sólido cria um ambiente com baixo nível de oxigênio, semelhante ao que ocorre em nichos no solo ou na planta, onde estão localizadas bactérias diazotróficas microaerofílicas associadas a raízes de plantas. No presente estudo os valores de N total foram utilizados para avaliar a capacidade de fixação biológica de  $\text{N}_2$  pelas bactérias em meio de cultura semi-sólido NFb. O método segue o princípio de que o meio de cultura em que as bactérias foram incubadas é livre de nitrogênio e, portanto, o N presente no meio provém da sua fixação.

#### **4.3 Análise da produção de hormônio de crescimento vegetal (AIA – ácido indolacético) por isolados do gênero *Azospirillum***

Todos os isolados testados foram capazes de produzir AIA. A quantidade de AIA produzida variou de 107 a 1038  $\mu\text{M}$ . Os maiores valores foram obtidos pelos isolados HAI3 (1038,61  $\mu\text{M}$ ), HAI52 (1027,68  $\mu\text{M}$ ) e AZM15 (963,27  $\mu\text{M}$ ), sendo os dois primeiros isolados da espécie *Hymenachne amplexicaulis* e o terceiro isolado da *Axonopus purpusii* (Tabela 4). As concentrações de AIA produzida pelos isolados foram de maneira geral, maiores que a das estirpes de referência utilizadas nesse estudo e que a maioria dos resultados encontrados na

literatura para o gênero. De acordo com Radwan et al. (2004) as estirpes de *Azospirillum* produziram de 300 a 500  $\mu\text{M}$  de AIA. Mascarua-Esparza et al. (1988), obtiveram valores de 205  $\mu\text{M}$  a 428  $\mu\text{M}$  para *A. brasilense* e 28,54 a 97,03  $\mu\text{M}$  para *A. lipoferum*, ambas espécies isoladas de raízes de cactáceas no México. Crozier et al., (1988), que também estudaram a produção de AIA por isolados de *A. lipoferum* e *A. brasilense* oriundos de raízes de milho obtiveram valores de 0,0 a 85,9  $\mu\text{M}$  e 7,99 a 140,97  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

**Tabela 4** - Produção de ácido indolacético (AIA) por bactérias do gênero *Azospirillum*, isoladas de forrageiras nativas do Pantanal Sul-Mato-Grossense <sup>(1)</sup>.

Isolados	AIA ( $\mu\text{M}$ )
HAI3	1038,61a
HAI52	1027,68a
AZM15	963,27ab
AZM38 2	802,125abc
HRI18	754,46abcd
MRI5	712,565abcde
HAI48	631,505bcdef
AZM28	603,725bcdefg
AZM38 1	575,95cdefgh
HAI51	501,65cdefghi
AZM27	501,27cdefghi
MRI9	451,635cdefghij
AZM26	445,215cdefghij
HAI50	414,505defghij
HRI16	397,755defghij
AZM30	384,24efghij
HAI53	381,805efghij
HRI19	359,865efghij
AZM22	333,69fghij
HAI25	311,455fghij
HRI32	296,06fghij
MMRI6	281,705fghij
HAI6	267,345fghij
AZM25	246,21ghij
HRI49	232,25hij
HRI24	223,875hij
Sp7	214,705hij
AZM29	181,19ij
AZM31	151,645ij
Sp59	141,72ij
HAI35	136,66ij
AZM39	107,02j
CV(%)	17,5

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 0,01% de probabilidade.

Fonte: Produção própria (2013)

No trabalho de Reis Jr. et al. (2004) isolados da espécie *A. amazonense* associados a *Urochloa* spp. produziram de 35 a 110  $\mu\text{M}$  de AIA. Cardoso (2008) constatou que estirpes de *Azospirillum* isoladas de arroz produziram de 5,67 e 119,72  $\mu\text{g}$  AIA  $\text{mL}^{-1}$ . Em estudo recente realizado por Silva et al., (2013) isolados oriundos de raízes de *Urochloa brizantha*

produziram AIA em uma faixa de variação de 0,39 a 195  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo que a maior concentração de AIA entre os isolados de *Azospirillum* foi de 167,19  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

A estirpe de *A. brasilense* (Sp7) produziu maior quantidade de AIA que a estirpe de *A. lipoferum* (Sp59) (Tabela 4). Corroborando aos resultados obtidos no presente estudo, Radwan et al. (2002) obtiveram uma produção de 378,7  $\mu\text{M}$  de AIA para a estirpe de *A. brasilense* (Cd) e 229,2  $\mu\text{M}$  de AIA para a estirpe de *A. lipoferum* (Br17) em meio de cultura suplementado com triptofano. Wisniewski-Dyé et al. (2012) através de análises de HPLC (Cromatografia líquida de alta performance) de compostos indólicos em sobrenadantes de cultura, também confirmaram a capacidade de estipes de *A. brasilense*, Sp245 (isolada do trigo no Brasil) e CBG497 (isoladas de milho no México) de produzir níveis elevados de AIA em presença de triptofano, ao passo que níveis muito baixos são produzidos por 4B (estirpe de *A. lipoferum* isolada do arroz na França) e B510 (estirpe de *Azospirillum* sp. isolada do arroz no Japão). No mesmo trabalho, estudos de comparação genômica revelaram que o gene ppDC/ipDC, que codifica uma enzima chave envolvida na biossíntese de AIA através da via biossintética ácido índole-3-piruvato (IPyA), está presente nos genomas de ambas as estirpes de *A. brasilense*, Sp245 e CBG497, mas ausentes no genoma de 4B e B510.

Esses resultados são de grande relevância, pois a produção de hormônios vegetais, como o ácido indolacético, por bactérias diazotróficas pode ter influência positiva no crescimento de plantas como tem sido evidenciados em diversos estudos (BASHAN et al., 2004; YASMIN et al., 2007; VASCONCELLOS et al., 2010). O principal efeito do AIA é promover o crescimento de raízes e caules, através da divisão e diferenciação das células recém-formadas nos meristemas. Esse efeito depende, entretanto, da concentração do hormônio. Em concentrações muito altas, a auxina inibe a elongação celular e, portanto, o crescimento do órgão. Diversos mecanismos estão envolvidos na interação planta/bactéria/ambiente, dessa forma cada caso deve ser buscado especificamente.

Segundo Pedraza et al. (2004) a quantidade de AIA produzida por estirpes bacterianas depende de diversos fatores. Como por exemplo, a espécie que está em estudo e as condições em que o microrganismos estão sendo cultivados (como a presença ou ausência do precursor L-triptofano, oxigenação, pH e a fase de crescimento em que se encontra a bactéria), os quais podem influenciar na produção do hormônio vegetal.

Os isolados bacterianos do estudo foram originados de plantas nativas do solo pantaneiro, de baixa fertilidade que se encontra sobre constante estresse causado pelos regimes de seca e cheia, o que possivelmente pode ter favorecido a adaptação genética por muitos desses isolados, que em condições *in vitro* demonstraram elevada capacidade de

produção de AIA. De acordo com Ona et al. (2005) o AIA é produzido somente sobre fatores de estresse, incluindo falta de carbono e tensão de oxigênio na fase estacionária de crescimento. Além do que, bactérias expostas a uma variedade de forças seletivas podem desenvolver alta capacidade de adaptação (SCHOLTER et al., 2000).

O isolamento de microrganismos e a seleção de características bacterianas que promovem efeitos benéficos em plantas, além da seleção de estirpes eficientes são passos importantes para otimizar alto rendimento nas culturas e melhorar a sustentabilidade do ecossistema (ROESCH et al., 2007).

Nesse contexto, se faz fundamental a seleção de estirpes eficientes quanto a FBN e AIA adaptadas às condições edafoclimáticas locais, com o intuito de garantir a promoção do crescimento vegetal das gramíneas forrageiras associadas a estas bactérias.

#### **4.4 Efeito da inoculação de *Azospirillum* spp. no crescimento de três gramíneas forrageiras oriundas do Pantanal da Nhecolândia, cultivada em vasos**

A produtividade da matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca do colmo (MSC), relação matéria seca folha/colmo (MSFC), N total e proteína bruta acumulada na parte aérea, altura das plantas e volume de raiz (VR) em *Mesosetum chaseae* em resposta a inoculação de *Azospirillum* spp. constam na Tabela 5.

As plantas de *M. chaseae* (grama-do-cerrado) inoculadas com bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* spp. obtiveram maior produção MSPA, MSC, relação MSFC e VR quando comparados com o tratamento sem inoculação (controle). Com o Tratamento 3 (HAI52) diferindo estatisticamente em relação aos demais para os parâmetros MSPA e MSC (Tabela 5), já para a relação MSFC o Tratamento 7 (HAI3) obteve maiores valores estatísticos. Quanto ao parâmetro VR os tratamentos que mais se destacaram foram: aquelas com o isolado de maior FBN e AIA (T3 – HAI52), a estirpe padrão para *A. brasilense* (T5 – Sp7) e o isolado de maior AIA (T7 – HAI3). Esses resultados indicam que a espécie *M. chaseae* obteve resposta considerável a inoculação por bactérias do gênero *Azospirillum* spp. comprovando a eficiência na inoculação, e mostrando a relação entre a produção de AIA e desenvolvimento radicular.

No trabalho de Lana et al. (2012) a inoculação com *Azospirillum brasilense* em milho, na ausência de adubação nitrogenada, proporcionou um aumento de 7,2% na produção de biomassa seca da parte aérea, o que corrobora com os resultados obtidos neste experimento. Ramos et al. (2010) também observaram aumentos de 48% na produção da matéria seca da

parte aérea e de 27% na da matéria seca da raiz em plantas de milho inoculadas com *Azospirillum* em relação ao controle não inoculado.

**Tabela 5** - Efeito da inoculação de *Azospirillum spp.* na altura das plantas, produtividade da matéria seca da parte aérea, matéria seca da folha, matéria seca do colmo, relação matéria seca folha/colmo, N total e proteína bruta acumulada na parte aérea e volume de raiz em *Mesosetum chaseae*.

Tratamento	Altura(cm) <sup>(ns)</sup>	MSPA(g) <sup>(1)</sup>	MSF(g) <sup>(ns)</sup>	MSC(g) <sup>(1)</sup>	MSFC(g) <sup>(1)</sup>	NT(%) <sup>(ns)</sup>	PB(%) <sup>(ns)</sup>	VR(cm <sup>3</sup> ) <sup>(2)</sup>
HAI52	40,50	4,19a	0,86	3,32a	0,25ab	0,66	4,12	11,30a
HAI6	41,00	1,55b	0,26	1,29ab	0,21ab	0,60	3,75	8,00abc
AZM15	39,88	1,45b	0,27	1,18b	0,17ab	0,68	4,22	10,00ab
Sp59	35,38	1,42b	0,24	1,18b	0,21ab	0,49	3,04	7,67bc
HAI3	40,40	1,38b	0,40	0,98b	0,56a	0,80	5,01	10,33ab
Sp7	33,38	1,33b	0,17	1,16b	0,14b	0,70	4,40	11,33a
MRI9	31,38	1,15b	0,18	0,97b	0,21b	0,81	5,09	8,33abc
Controle	31,75	1,35b	0,14	1,21b	0,11b	0,74	4,66	6,00c

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

<sup>(2)</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste T(P<0,05).

(ns): Não significativo estatisticamente

MSPA=Matéria da seca parte aérea; MSF=Matéria seca da folha; MSC=Matéria seca do colmo; MSFC=Relação matéria seca folha/colmo; NT=Nitrogênio Total; PB=Proteína Bruta e VR=Volume de raiz.

Fonte: Produção própria (2013)

Nas plantas da forrageira *H. amplexicaulis* (capim-de-capivara) foram constatados efeitos significativos da inoculação somente para o VR. As plantas inoculadas com o isolado de maior AIA (T7 – HAI3) apresentaram um VR significativamente maior que o controle, média de 80,67 cm<sup>3</sup> e 25 cm<sup>3</sup>, respectivamente (Tabela 6). O maior desenvolvimento das raízes torna a área de absorção de água e nutrientes maior e, conseqüentemente, aumenta a capacidade de produção da planta e tolerância a estresses ambientais como salinidade e seca (Hungria, 2011).

Esses resultados corroboram com os obtidos por Reis Jr. et al. (2008) que não observou efeito da inoculação com *A. amazonense* na produção da MSPA, entretanto as plantas inoculadas apresentaram maior produção (14%) de matéria seca das raízes, quando comparadas às não inoculadas, em experimento realizado em dois genótipos de milho. Quadros (2009) também obteve maior VR nos tratamentos com inoculação em relação aos tratamentos não inoculados em milho. O volume médio das raízes para o tratamento controle

foi de 10,6 cm<sup>3</sup> e 16,5 cm<sup>3</sup> para o tratamento inoculado com uma mistura de três estirpes do gênero *Azospirillum*.

Observa-se também na Tabela 6 que nos parâmetros MSPA e MSC os resultados da maioria dos tratamentos com inoculação, apesar de não ser significativo, foram maiores que o controle. Nestes parâmetros os tratamentos 7, 8, 5 e 3 (HAI3, AZM15, Sp7 e HAI52) foram maiores que o controle, sendo que o tratamento 7 obteve valores aproximadamente 10X maiores que o controle.

**Tabela 6** - Efeito da inoculação de *Azospirillum* spp. na altura das plantas, produtividade da matéria seca da parte aérea, matéria seca da folha, matéria seca do colmo, relação matéria seca folha/colmo, N total e proteína bruta acumulada na parte aérea e volume de raiz em *Hymenachne amplexicaulis*.

Tratamento	Altura(cm) <sup>(ns)</sup>	MSPA(g) <sup>(ns)</sup>	MSF(g) <sup>(ns)</sup>	MSC(g) <sup>(ns)</sup>	MSFC(g) <sup>(ns)</sup>	NT(% <sup>(ns)</sup> )	PB(% <sup>(ns)</sup> )	VR(cm <sup>3</sup> ) <sup>(1)</sup>
HAI3	44,40	15,80	2,24	13,55	0,16	1,15	7,16	80,67a
AZM15	47,33	12,79	1,83	10,96	0,17	1,18	7,38	59,67ab
MRI9	39,83	8,22	0,97	7,25	0,14	1,10	6,91	51,33abc
Sp7	41,33	11,51	1,85	9,66	0,20	1,09	6,83	41,67bc
HAI52	39,83	11,19	2,12	9,07	0,23	1,21	7,56	32,67bc
Sp59	49,17	6,52	1,09	5,43	0,20	1,14	7,13	29,33c
HAI6	42,93	7,17	1,03	6,14	0,15	1,28	8,02	29,33c
Controle	32,25	8,76	1,02	7,74	0,13	1,11	6,93	25,00c

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste T (P<0,05).

(ns): Não significativo estatisticamente

\* MSPA=Matéria seca da parte aérea; MSF=Matéria seca da folha; MSC=Matéria seca do colmo; MSFC=Relação matéria seca folha/colmo; NT=Nitrogênio Total; PB=Proteína Bruta e VR=Volume de raiz

Fonte: Produção própria (2013)

A maioria das plantas de *Axonopus purpussi* (capim mimoso) inoculadas com *Azospirillum* spp. apresentaram maior produção de MSPA que o tratamento sem inoculação, com exceção das plantas que foram inoculadas com a estirpe Sp59 que corresponde ao Tratamento 6 (Tabela 7). Resultados semelhantes foram obtidos por Brasil et al. (2005) para esta mesma espécie que também constataram uma maior produção de MSPA nas plantas inoculadas com *Azospirillum* spp. em relação as não inoculadas, em coletas feitas em 30, 60, e 90 dias após a inoculação. Entretanto, as plantas inoculadas só apresentaram maior acúmulo de N na parte aérea aos 60 e 90 dias, o que permitiu aos autores especular que as bactérias inoculadas poderiam, após 30 dias, entrar em equilíbrio com as bactérias nativas presentes nessas plantas, e estimular o metabolismo de outras bactérias diazotróficas, ou mesmo ter sido mais competitivas e se estabelecido na planta.

Os autores também demonstraram que em *A. purpusii* não houve efeito da inoculação na matéria seca de raízes em comparação ao controle aos 30 dias, apenas aos 90 dias pode se notar um aumento significativo deste parâmetro nas plantas inoculadas.

Os maiores valores de produção de MSPA foram obtidos no Tratamento 3 (HAI52 – maior FBN e AIA) seguida do Tratamento 7 (HAI3 – maior AIA) e do Tratamento 8 (AZM15 – maior FBN) (Tabela7). Apesar de não ser significativo observa-se na Tabela 7 que nos parâmetro MSC e VR os tratamentos com inoculação, exceto o tratamento 6 (Sp59), foram maiores que o controle. Destacando-se o tratamento 3 com maiores valores.

Não foi observado o efeito significativo da inoculação na porcentagem do N total e proteína bruta acumulada na parte aérea das plantas, porém como descrito anteriormente houve aumento da MSPA, o que permite inferir que a inoculação supriu as necessidades de nitrogênio requerido pela planta para seu crescimento (Tabelas 5, 6 e 7). Segundo Reis Jr. et al. (2002) a associação entre bactérias diazotróficas e gramíneas pode fornecer parte do N responsável pelo desenvolvimento da planta através do processo da FBN. No trabalho de Oliveira et al. (2007) a inoculação das sementes de *U. brizantha* com *A. brasilense* aumentou 5% a produção da parte aérea da gramínea no primeiro corte (março/2005), porém não houve efeito da inoculação sobre o teor de N e proteína bruta acumulada na parte aérea, corroborando com os resultados obtidos neste experimento. A inoculação de *A. brasilense* na forrageira foi apontada pelos autores como uma alternativa promissora para o aumento da produção da forragem.

**Tabela 7-** Efeito da inoculação de *Azospirillum spp.* na altura das plantas, produtividade da matéria seca da parte aérea, matéria seca da folha, matéria seca do colmo, relação matéria seca folha/colmo, N total e proteína bruta acumulada na parte aérea e volume de raiz em *Axonopus purpusii*.

Tratamento	Altura(cm) <sup>(ns)</sup>	MSPA(g) <sup>(1)</sup>	MSF(g) <sup>(ns)</sup>	MSC(g) <sup>(ns)</sup>	MSFC(g) <sup>(ns)</sup>	NT(%)( <sup>ns</sup> )	PB(%)( <sup>ns</sup> )	VR(cm <sup>3</sup> )( <sup>ns</sup> )
HAI52	43,12	12,69a	2,17	10,51	0,21	0,47	2,95	15,75
HAI3	41,62	10,02ab	2,23	7,78	0,30	0,54	3,41	14,75
AZM15	34,90	9,85ab	1,98	7,86	0,25	0,48	3,01	14,75
MRI9	49,12	9,22bc	1,75	7,46	0,37	0,64	4,02	10,75
Sp7	39,37	8,42bc	1,87	6,55	0,29	0,57	3,57	15,50
HAI6	42,25	8,11bc	1,49	6,61	0,25	0,58	3,62	15,25
Sp59	43,87	6,45c	1,63	4,81	0,34	0,59	3,69	10,00
Controle	41,17	7,20b	1,18	5,97	0,20	0,47	2,98	10,00

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste T(P<0,05).

(ns): Não significativo estatisticamente

\*MSPA=Matéria seca da parte aérea; MSF=Matéria seca da folha; MSC= Matéria seca do colmo; MSFC= Relação matéria seca folha/colmo; NT= Nitrogênio Total; PB= Proteína Bruta e VR= Volume de raiz

Fonte: Produção própria (2013)

Em relação à altura das plantas não foi observado efeito significativo da inoculação em nenhuma das gramíneas (Tabelas 5, 6 e 7). Entretanto, nas plantas das forrageiras *H. amplexicaulis* e *M. chaseae* observa-se nos tratamentos (com exceção do tratamento 4 - MRI9 para *M. chaseae*) um tênue aumento no parâmetro altura em relação ao controle, sendo que alguns obtiveram valores 10x maiores (Tabela 5 e 6).

Cavallet et al. (2000) também não obteve efeito da inoculação do produto comercial “Graminante”, à base de *Azospirillum* spp., sobre a altura das plantas de milho. Resultados diferentes foram obtidos por Guimarães et al. (2011) que avaliando a altura das plantas de *U. brizantha* inoculada com 9 isolados de *Azospirillum* (cada isolado correspondeu a um tratamento) observou que o isolado AZ02 obteve maiores valores quando comparada com a testemunha, porém os outros tratamentos obtiveram valores semelhantes ou menores que o controle. Ramos et al. (2010) avaliando o crescimento de plantas de milho inoculadas com *Azospirillum lipoferum* (estirpe BR 11084), 30 dias após a semeadura, observaram aumento na altura de plantas de 17,6% .

Um fato interessante foi que o efeito da inoculação da estirpe referência para *A. brasilense* (Sp7) no volume das raízes de duas gramíneas (*M. chaseae* e *H. amplexicaulis*) foi maior quando comparados às plantas inoculadas com a estirpe referência para *A. lipoferum* (Sp59) (Tabela 7). No presente estudo, a estirpe Sp59 produziu menor concentração de AIA do que a estirpe Sp7 (Tabela 4), o que poderia ser um indicio do maior desenvolvimento radicular, no entanto deve se considerar que outros fatores bióticos e abióticos estão envolvidos na resposta da interação planta/bactéria. Resultados semelhantes foram obtidos por Didonet et al. (2003) que avaliaram dez linhagens de arroz sob inoculação com *Azospirillum* spp. e verificaram que houve aumento no comprimento da raiz em relação ao tratamento controle, sendo que *A. brasilense* (Sp245) induziu maiores respostas (29%) no desenvolvimento das plântulas do que *A. lipoferum* (Sp59) (19%).

Uma vez que as estirpes utilizadas no experimento foram capazes de produzir AIA em grandes concentrações e foram capazes de fixar nitrogênio é provável que parte dos efeitos benéficos causados por *Azospirillum* spp. seja devido não somente a FBN, mas também a produção de fitômonios, como o ácido indolacético, atuando em um sistema aditivo como demonstrado em alguns estudos (RADWAN et al., 2004; HUNGRIA et al., 2010, HUNGRIA, 2011)

Segundo Bashan e De-Bashan (2010) o efeito positivo mais perceptível da inoculação de *Azospirillum* em plantas é a modificação na arquitetura radicular da planta, que confere maior absorção de água e nutrientes essenciais para o seu crescimento. Entretanto apesar desse



fenômeno ser atribuído a produção de fitôrmônios ainda não se sabe se um conjunto desses elementos ou se um único está envolvido no processo. Porém, esses autores acreditam que uma combinação de mecanismos estão envolvidos na estimulação do crescimento vegetal. Esses mecanismos poderiam variar em relação às espécies vegetais, as linhagens de *Azospirillum* e as condições ambientais prevalentes durante a interação.

A maioria dos resultados obtidos no presente trabalho mostrou eficiência da inoculação, isto pode ser elucidado pelo fato que essas plantas foram inoculadas com bactérias previamente isoladas de plantas crescidas na mesma localidade. De acordo com Monteiro (2012) a resposta a inoculação de RPCV pode ser influenciada pela estirpe da bactéria, pela espécie da planta em estudo, bem como pelo o genótipo da planta utilizada. Segundo Batharai e Hess (1993) já foi demonstrado que estirpes e cultivares obtidos da mesma localidade são mais eficientes em proporcionar benefícios.

A estirpe HAI52 proporcionou efeitos benéficos nas plantas inoculadas referentes às três espécies de forrageiras utilizadas no experimento. Esta estirpe isolada de gramínea *H. amplexicaulis* foi selecionada considerando o seu excelente desempenho em ambos os parâmetros (FBN e AIA). Devido a isto, esta bactéria revelou potencial para aumentar a produtividade das forrageiras nativas.

De acordo com o seu modo de ação, RPCVs podem ser classificadas como biofertilizantes, fitoestimuladores e biopesticidas (BHATTACHARYYA & JHA, 2012). A utilização de RPCVs na forma inoculantes agrícolas possuem muitas vantagens em comparação com fertilizantes e pesticidas químicos. Pois, são mais seguros; demonstram reduzido dano ambiental e a saúde humana; são eficazes em pequena quantidade; são capazes de se multiplicar, mas são controlados tanto pelas plantas quanto pelas populações microbianas nativas e decompõe-se mais rapidamente que os pesticidas químicos convencionais (BERG, 2009).

Como relatado por Reis (2007) o maior obstáculo para a utilização de bioinoculantes é a chamada “incosistência” dos resultados em experimento de campo. Esta inconsistência está relacionada à fatores tais como as condições edafoclimáticas e interações com a biota do solo, além do número ideal de células por semente e/ou mudas e fisiologia das células bacterianas. Dessa forma, é imprevisível a seleção de RPCVs com alto potencial para FBN e AIA, bem como a seleção de outras caracteres bacterianos desejáveis em associação com gramíneas forrageiras adaptadas ao ambiente pantaneiro, para serem utilizados na forma de inóculos biológicos, contribuindo conseqüentemente com a produtividade das pastagens.

## 5 CONCLUSÕES

- O uso do par de iniciadores Az16S-A pelo método de PCR confirmaram a classificação dos isolados como pertencentes ao gênero *Azospirillum*.
- As concentrações de AIA produzidas pelos isolados foram superiores que a maioria dos resultados encontrados na literatura para bactérias do gênero *Azospirillum*.
- *Mesosetum chaseae* obteve melhor resposta ao efeito da inoculação de *Azospirillum* spp.
- *Mesosetum chaseae* apresentou efeito da inoculação de *Azospirillum* spp. na produção de MSPA, MSC, MSFC e no volume de raízes.
- *A. purpusii* e *H. amplexicaulis* apresentaram efeito da inoculação de *Azospirillum* spp. na produção de MSPA e no volume de raízes, respectivamente.
- As estirpes HAI52, HAI3 e AZM15 foram consideradas promissoras para estudos posteriores de inoculação em campo.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O conhecimento das propriedades singulares dos isolados bacterianos pantaneiros dará embasamento a novos trabalhos nessa área de aplicação biotecnológica, que contribuirão para que a associação dessas rizobactérias com pastagens pantanerias sejam favorecidas e assim poder viabilizar o sistema agropastoril nas condições encontradas no Pantanal.

Cabe ressaltar que testes de inoculação e co-inoculação em casa-de-vegetação e a campo envolvendo isolados que se revelaram promissores quanto à caracterização fisiológica e/ou bioquímica são indispensáveis para o entendimento da interação bactéria/planta/ambiente.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRICULTURE & RESOURCE MANAGEMENT COUNCIL OF AUSTRALIA & NEW ZEALAND. **Weeds of National Significance. *Hymenachne* (*Hymenachne amplexicaulis*) Strategic Plan.** National Weeds Strategy Executive Committee, 26p. 2000.

AGROLINK. **Embrapa lança cinco tecnologias no Show Rural Coopavel.** 2011. Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/noticia/embrapa-lanca-cinco-tecnologias-no-show-rural-coopavel-125221.html>>. Acesso em 2/03/2013.

AGROLINK. **Primeiro inoculante para arroz e milho é lançado no mercado.** 2009. Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/sementes/NoticiaDetalhe.aspx?codNoticia=94052>>. Acesso em: 29/11/2012.

ALLEM. A. C. & VALLS. J. F. M. **Recursos Forrageiros Nativos do Pantanal Mato-Grossense.** Brasília: EMBRAPA-DDT. (Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, Documentos, 8), 339 p. 1987.

ALVAREZ, J. M.; ROCHA, J. F.; SANTOS, S. A.; MACHADO, S. R. Anatomia foliar de *Mesosetum chaseae* Luces (Poaceae) vegetando em diferentes ambientes com e sem influência de pastejo na sub-região da Nhecolândia, Pantanal Sul-Mato-Grossense. In: Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal, 4, 2004. **Anais...** Corumbá: SIMPAN, 2004. CD ROOM.

ALVAREZ, J.M.; SANTOS, S.M. & MACHADO, S.R. Micromorfologia foliar e anatomia de *Axonopus purpusii* (Mez) Chase do Pantanal Sul-Matogrossense. In **Resumos do 56º Congresso Nacional de Botânica.** 2005.

BALDANI, J.I. & BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. Rio de Janeiro. **An. Acad. Bras. Ci.**, v.77, p.549-579, 2005.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BFN with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, Berlin, v.29, p.911-922, 1997.

BALDANI, J.I.; KRIEG, N.R.; BALDANI, V.L.D.; HARTMANN, A.; DOBEREINER, J. Genus II. *Azospirillum*. IN: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W.; BRENNER, D.J.; GARRITY, G.M. **Bergey's Manual of Systematic bacteriology.** USA: Springer. 2ª eds, vol. 2, part 3. pg. 7-27, 2005.

BARASSI, C.A.; SUELDO, R.J.; CREUS, C.M.; CARROZZI, L.E.; CASANOVAS, W.M.; PEREYRA, M.A. **Potencialidad de *Azospirillum* en optimizar el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas.** In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, p.49-59. 2008.

BASHAN Y. & LEVANONY H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology** v.36, p.591-608, 1990.

BASHAN, Y. & DE-BASHAN, L.E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment. **Adv Agron.** 108:77–136, 2010.

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

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relations physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.521-577, 2004.

BAZZO, J.C; FREITAS, D.A.F.; SILVA, M. L. N.; CARDOSO, E. L.; CÂNDIDO, B.M.; OLIVEIRA, J. M; Permeabilidade da água sob o Neossolo Quartzarênico com pastagens nativas do Pantanal da Nhecolândia, MS. In **XIX Congresso de Pós-Graduação da UFLA**, 27 de setembro a 01 de outubro, Lavras, 2010.

BERG, G. & SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology** 68:1–13. 2009.

BERG, G.; Plant- Microbe interactions promotion plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 84 (1): 11-18, 2009.

BHATTACHARYYA, P.N & JHA, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture.; **World J Microbiol Biotechnol**, 28:1327–1350, 2012.

BHATTARAI, T.; HESS, D. Yield responses of Nepalese spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to inoculation with *Azospirillum* spp. of Nepalese origin. **Plant and Soil**, n. 151, p. 67-76, 1993.

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

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

BRASIL, M.S., BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Matogrossense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. V.29, p. 179-190, 2005.

BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S. Rapid in situ assay for indol acetic acid production by bacteria immobilized on anitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology** 57: 535-538. 1991.

CADAVID GARCIA, E. A. **Análise técnico-econômica da pecuária bovina do Pantanal - sub-regiões da Nhecolândia e dos Paiaguás**. Corumbá: EMBRAPA-CPAP. (EMBRAPA-CPAP, Circular Técnica, 15), 92 p.1986.

CARDOSO, E. L.; SANTOS, S. A.; ARAÚJO, M. T. B.; PELLEGRIN, L. A. Altimetria de unidades de paisagem na sub-região da Nhecolândia. In: Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal, 4, 2004. **Anais...** Corumbá: SIMPAN, 2004. CD ROOM.

CARDOSO, I.C.M.; **Ocorrência e Diversidade de Bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* na cultura do arroz irrigado em Santa Catarina**. Tese (Mestrado em Manejo do Solo). Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC. Lages- SC, 75p. 2008.

CAVALLET, L. E.; PESSOA, A. C. dos S.; HELMICH, J. J.; HELMICH, P. R.; OST, C. F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, p. 129-132, 2000.

CHARLESTON, K. *Hymenachne (Hymenachne amplexicaulis) management*. Control methods and case studies. 2006. Disponível em: <<http://resourceeconomics.cqu.edu.au/FCWViewer/getFile.do?id=7443>>. Acesso em: 02 mar. 2012.

COMASTRI-FILHO, J.A. **Pastagens nativas e cultivadas no Pantanal Mato- Grossense**. EMBRAPA-CPAP, 48p. (EMBRAPA-CPAP. Circular Técnica, 13), 1984.

CRISPIM, S.M.A.; BARONI JÚNIOR, W.; BRANCO, O.D. **Perfilhamento, produção de Matéria Seca de *Brachiaria Brizantha* no Pantanal, Sub-região da Nhecolândia, MS**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 4 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 61), 2005.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J.M.; MONTEIRO, A.M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indóis in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p. 2833-2837, 1988.

DEL GALLO, M. & FRENDRICK, I. 1994. The rizosphere and *Azospirillum*. In: ***Azospirillum/plant association***. Okon, Y. (ed.), Rehovot, CRC Press, p. 57-75, 1994.

DIDONET, A.D.; MARTIN-DIDONET, C.C.G.; GOMES, G.F. **Avaliação de linhagens de arroz de terras altas inoculadas com *Azospirillum lipoferum* Sp59b e *A. brasilense* Sp245**. EMBRAPA CNPAF, Comunicado Técnico, 69, 2003.

DIDONET, D.A.; LIMA, O.S.; CANDATEN, M.H.; RODRIGUES, O. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos, em trigo submetido à inoculação de *Azospirillum*. **Pesq. Agropec. Bras.**, v35, p. 401-411, 2000.

DOBBELAERE, S.; CROONRNBORGHS, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; AGUIRRE, J.F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S.; OKON, Y. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.871-879, 2001.

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

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

EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação do Solos**, Brasília: Brasília Produção de Informação, Rio de Janeiro, Embrapa solos, 412 p., 1999.

FAGERIA, N.K., SLATON, N.A., BALIGAR, V.C. Nutrient management for improving lowland rice productivity and sustainability. **Advances in Agronomy**, New York, v.80, p. 63-152, 2003.

FAGES, J. *Azospirillum* inoculants and field experiments. In: OKON, Y. (Ed.). **Azospirillum/plant associations**. Boca Raton : CRC, p.87-109, 1994.

FALLIK, E. & OKON Y. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. **Soil Biol. Biochem.** 28: 123-126, 1996.

GALVANI, F. & GAERTNER, E. **Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta**. Corumbá: Embrapa Pantanal, (Circular Técnica, 63), 9p, 2006.

GODOI FILHO, J.D. Aspectos geológicos do Pantanal Mato-Grossense e de sua área de influência. In: Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal, 1, 1984. Corumbá. **Anais**. Brasília: EMBRAPA-DDT, p.63-76. (EMBRAPA-CPAP. Documentos, 5). 1984.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V.L.D.; JACOB-NETO, J. Influência do nitrogênio mineral e do ph da rizosfera sobre a população de bactérias diazotróficas em plantas de arroz. **Enciclopédia biosfera**, v.7, n.12, 2011.

GUIMARÃES, S. L.; CAMPOS, D. T. S.; BALDANI, V. L. D.; JACOB-NETO, J. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em cultivares de arroz. **Revista Caatinga**. Mossoró, v. 23, n. 4, p. 32-39, 2010.

HAN, S.O. & NEW, P.B. Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. **Microbial Ecology**, v.36, p.193- 201, 1998.

HERRIDGE, D.; PEOPLES, M.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, n. 1-2, p. 1-18, 2008.

HOFFMAN, B. M; DEAN, D. R.; SEEFELDT, L. C. Climbing Nitrogenase: Toward a Mechanism Enzymatic Nitrogen Fixation. **Accounts of Chemical Research**, v. 42, n. 5, p. 609-619, 2009.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, (Documentos Embrapa Soja, n. 325), 36p, 2011.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja. (Embrapa Soja. Documentos, 283), 80 p., 2007.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v.331, n. 1-2, p.413-425, 2010.

ITZIGSOHN, R.; BURDMAN, S.; OKON, Y.; ZAADY, E.; YONATAN, R.; PEREVOLOTSKY, A. Plant-growth promotion in natural pastures by inoculation with *Azospirillum brasilense* under suboptimal growth conditions. **Arid Soil Research and Rehabilitation**, v.13, p.151-158, 2000.

JENSEN, E.S.; PEOPLES, M.B.; BODDEY, R.M.; GRESSHOFF, P.M.; HAUGGARD-NIELSEN, H.; ALVES, B.J.R.; MORRISON, M.J. Legumes for Mitigation of Climate Change and Provision of Feedstocks for Biofuels and Biorefineries. **Agron. Sustain. Dev.** 32:329-364, 2012.

JÚNIOR, J. H. C.; SANDANIELO, A.; CANAPPELE, C.; PRIANTE FILHO, N.; MUSIS, C. R.; SORIANO, B. M. A. Climatologia. In: BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Plano de Conservação da Bacia do Alto Paraguai (Pantanal) - PCBAP. **Diagnóstico dos meios físicos e bióticos: meio físico**. Brasília, v. 2, t.1, p. 295-334. 1997.

JUNK, W.J. & DA SILVA, C.J. Neotropical floodplains: A comparison between the Pantanal of Mato Grosso and the Large Amazonian river floodplains. Pp. 195-227. In: J.G. Tundisi; C.E. Bicudo & T. Matsamura-Tundisi (eds.). **Limnology in Brazil**. Brazilian Academy of Science, Brazilian Limnological Society. 1995.

KIBBLER, H.; BAHNISCH, L. M. Physiological adaptations of *Hymenachne amplexicaulis* to flooding. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.39, p.429-435, 1999.

KRAISER, T.; GRAS, D.E.; GUTIÉRREZ, A.G.; GONZÁLES, B.; GUTIÉRREZ, R.A. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. Review paper. **Journal of Experimental Botany**, Springer. Vol. 62, N. 4, pp. 1455–1466, 2011.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.42, n.10, p.1459-1465, out. 2007.

KUSS, A.V.; KUSS, V.V.; ÉLIKELI, K.H.; LOVATO, T. Inoculação de bactérias diazotróficas e desenvolvimento de plântulas de arroz irrigado em solo e câmara de crescimento. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.15, n.1, p. 90-102. 2008.

LANA, M.C.; DARTORA, J.; MARINI, D.; HANN, J.E. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Rev. Ceres. Viçosa**, v. 59, n.3, p. 399-405, mai/jun, 2012.

LAND AND WATER AUSTRALIA. **Ecological, economic and social considerations of spray control for *Hymenachne***. Disponível em: <<http://lwa.gov.au/node/2589>>. Acesso em: 06 dezembro 2012.

MALAVOLTA, E. & MORAES, M. F. **Fundamentos do nitrogênio e do enxofre na nutrição mineral das plantas cultivadas**. In: YAMADA, Tsuioshi et al. Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira. Piracicaba: IPNI Brasil, 2007.



MARTINEZ-VIVEROS, O.; JORQUERA, M.A; CROWLEY, D.E; GAJARDO, G; MORA, M.L. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. **J Soil Sci Plant Nut.** v10 p.293–319. 2010.

MASCARUA-ESPARZA, M.A.; VILLA-GONZALEZ, R.; CABALLERO-MELADO, J. Acetylene reduction and indolacetic acid production by *Azospirillum* isolates from cactaceous plants. **Plant and Soil**, v.106, p.91-95, 1988.

MENDONÇA, M.M.; URQUIAGA, S.S.; REIS, V. M. Variabilidade genotípica de milho para acumulação de nitrogênio e contribuição da fixação biológica de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.11, p.1681-1685, 2006.

MONTEIRO, R.A.; BALSANELLI, E.; WASSEN, R.; MARIN, A.M.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L.C.C.; SCHMIDT, M.A.; TADRA-SFEIR, M.Z.; PANKIEVICZ, V.C.S.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Herbaspirillum-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant Soil**, v. 356, n. 1, p. 175-196, 2012.

MORAIS, R.F.; QUESADA, D.M.; REIS, V.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, BRUNO, J.R. & BODDEY, R.M. Contribution of biological nitrogen fixation to Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) **Plant Soil**. 356:23–34. 2012.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 729p., 2006.

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

OKON, Y. & LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 1591-1601, 1994.

OKON, Y. & VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants, **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.63, n.7, p.366-370, 1997.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria, **Plant and Soil**, v. 284, p. 23-32, 2006.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v.242, p.205- 215, 2002.

OLIVEIRA, I.B. **Isolamento e caracterização de bactérias do gênero *Herbaspirillum* originadas de pastagens nativas do Pantanal Sul-Mato-Grossense**. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Faculdade de Ciências Biológicas, Campus de Corumbá. (trabalho de conclusão de curso), 2013.

OLIVEIRA, P. P. A.; OLIVEIRA, W. S.; BARIONI, W. J.; **Produção de forragem e qualidade de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com *Azospirillum brasilense* e fertilizada com nitrogênio**. (Circular técnica 54) Embrapa pecuária sudeste, São Carlos, SP, 2007.

ONA, O.; IMPE, J.V.; PRINSEN, E.; VANDERLEYDEN, J.; Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 246, n. 1, p. 125-132, 2005.

PEDRAZA, R.O.; RAMIREZ-MATA, A.; XIQUI, M.L.; BAÇA, B.E. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**. 233:15–21, 2004.

POTT, A. Ecossistema Pantanal. In: **Utilization y manejos de pastizales**. Ed. por Juan P. Puignou. Montevideo:IICA-PROCISUR, p.31-34, 1994.

POTT, A.; SILVA, J.V.; ABDON, M.; POTT, V.J.; RODRIGUES, L.M.; SALIS, S.M.; HATSCHBACH, G.G. Vegetação. In: BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Plano de Conservação da Bacia do Alto Paraguai (Pantanal) - PCBAP. **Diagnósticos dos meios físicos e bióticos: meio biótico**. Brasília, v.2, , p.1-179, 1997.

PRIMAVESI, O.; PRIMAVESI, A. C.; CORRÊA, L. A.; ARMELIN, M.J.A. **Calagem em pastagem de *Brachiaria decumbens* recuperada com adubação nitrogenada em cobertura**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, (Embrapa Pecuária Sudeste, Circular técnica, 37), 32p. 2004.

QUADROS, P. D. **Inoculação de *Azospirillum* spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul**. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

QUESADA, D. M. **Parâmetros quantitativos e qualitativos da biomassa de diferentes genótipos capimelefante para produção de agroenergéticos**. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 65 p. 2005.

RADWAN, T. EL-S. EL-D.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, v.32, p.39-54, 2002.

RADWAN, T.E.E.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indolacético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, V.40, n.10, p.997-1004, 2005.

RADWAN, T.E.E., MOHAMED, Z.K., REIS, V.M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de trigo e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.10, p.987-994, 2004.

RAMOS, A.S.; SANTOS, T.M.C.; SANTANA, T.M.; GUEDES, E.L.F.; MONTALDO, Y.C. Ação do *Azospirillum lipoferum* no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Verde**, v.5, n.4, p.113-117, 2010.

RAYMOND, J., SIEFERD, J.L., STAPLES, C.R.; Blankenship, R.E. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology Evolutionary**, Oxford,v.21, p. 541-554, 2004.

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

REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Identificação de *Azospirillum amazonense* associadas a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitohormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 28:103-113, 2004.

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

REIS JUNIOR, F.B.; MENDES, I.C.; REIS, V.M.; HUNGRIA, M. **Fixação biológica de Nitrogênio: uma revolução na agricultura**. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JÚNIOR, F. B. Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 247-281. 2011.

REIS JUNIOR., F.B. **Ecologia e diversidade de bactérias do gênero *Azospirillum* em associação com pastagens de *Brachiaria* spp.** Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidade Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 97p., 2002.

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A.L.M.; DIVAN, V.L.D., OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006.

REIS, V. M. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 232), 22p, 2007.

REIS, V. M.; SCHWAB, S.; ROUWS, L.F.M.; TEIXEIRA, K.R.S.; **Diazotróficos associativos e de vida livre: avanços e aplicações biotecnológicas**. In: FIGUEIREDO, M.V.B; BURITY, H.A.; OLIVEIRA, J. P.; SILVA SANTOS, C. E. R.; STAMFORD, N.P.; Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolo experimentais. Brasília- DF: Embrapa Informação Tecnológica, cap. 2, p. 215-238, 2010.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, A. K. R. S. Fixação biológica de nitrogênio – Estado da arte. In: AQUINO, Adriana Maria de; ASSIS, Renato Linhares de. **Processos biológicos no sistema solo-planta**. Brasília, DF: Embrapa Agrobiologia, 2005.

RODELA, L.G. ; QUEIROZ NETO, J.P. ; SANTOS, S.A. Classificação das pastagens nativas do Pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, por meio de imagens de satélite. **Anais XXIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**. INPE, p.4187-4194. Florianópolis, Brasil, 21-26 abril 2007.

ROESCH, L.F.W.; QUADROS, P.D.; CAMARGO, F.A.O.; TRIPLETT, E.W. Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. **World J Microbiol Biotechnol**. n23:p1377–1383, 2007.

RYU, R.J.; PATTEN, C.L. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *J. Bacteriol.* 190, 7200 e 7208, 2008.

SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, P.; FREITAS, J.G.; GALLO, P.B.; SILVEIRA, A.P.D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. n29: p.345-352, 2005.

SANTOS, M. C. M. **Ocorrência de bactérias diazotróficas em gramíneas forrageiras na microrregião de Patos- PB.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia- Sistemas Agrossilvopastoris no Semi-Árido): Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos. 53f., 2009.

SANTOS, S. A.; CRISPIM, S. M. A.; COMASTRE FILHO, J. A.; POOT, A.; CARDOSO, E. L. **Substituição de pastagem nativa de baixo valor nutritivo por forrageiras de melhor qualidade no Pantanal.** Corumbá : Embrapa Pantanal. (Circular técnica, 62) 2005.

SANTOS, S.A. **Caracterização dos recursos forrageiros nativos da sub-região da Nhecolândia, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil.** Tese (Doutorado em Nutrição e Produção Animal) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 190p. 2001.

SANTOS. S. A.; COSTA, C.; SOUZA, G. S.; POTT, A.; ALVAREZ, J. M.; MACHADO, S. R. Composição Botânica da Dieta de Bovinos em Pastagem Nativa na Sub-Região da Nhecolândia, Pantanal. **Revista Brasileira de Zootecnia.** v. 31, n. 4, p.1 648-1662, 2002.

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

SCHLOTTER, M.; LEBULN, M.; HEULIN, T; HARTMANN, A. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. **FEMS Microbiology Reviews.** V.24, p. 647- 660, 2000.

SHIME-HATTORI, A.; KOBAYASHI,S.; IKEDA, S.; ASANO, R.; SHIME,H.; SHINANO, T.; A rapid and simple PCR method for identifying isolates of the genus *Azospirillum* within populations of rhizosphere bacteria. **Journal of Applied Microbiology**,111. 915–924. 2011.

SILVA, J. dos S.V. & ABDON, M. dos M. Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub-regiões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, n.esp., p.1703-1711,1998.

SILVA, K. S., MACHADO, S. L.O., MENEZES, N. L., MARCHESAN, E., AVILA, L. A., ALVES, M. V. P., MENDES, H. C. Superação de Dormência em sementes de *Hymenachne amplexicaulis*. **XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas.** 19 a 23 de julho de 2010 - Centro de Convenções - Ribeirão Preto – SP, 2010a.

SILVA, L. A. C.; **Qualidade da grama-do-cerrado (*Mesosetum chaseae* Luces) na sub-região da Nhecolândia, Pantanal, MS.** Tese (Mestrado em Zootecnia) Universidade Estadual Paulista-USP. São Paulo. 55p. 2008.

SILVA, L.L.G.G.; ALVES, G.C.; RIBEIRO, J.R.A.; URQUIAGA, S.; SOUTO, S.M.; FIGUEIREDO, M.V.B. & BURITY, H.A. Fixação biológica de nitrogênio em pastagens com diferentes intensidades de corte. **Arch. zootec.** vol.59, n.225, p. 21-30. 2010b.

SILVA, M.C.P., FIGUEIREDO, A.F.; ANDREOTE, F.D.; CARDOSO, E.J.B.N.; Plant growth promotiong bacteria in *Brachiaria brizantha*. **World J Microbiol Biotechnol.** 29:163–171. 2013.

SILVA, M.P.; MAURO, R.A.; MOURÃO, G.M.; COUTINHO, M.E. Distribuição e quantificação da vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo. **Revista Brasileira de Botânica**, v.23, n.2, p.143-152, 2000.

SOUZA FILHO, A.P.S. et al. Capacidade de absorção de nutrientes do capim-Marandu (*Brachiaria brizantha*) e da planta daninha malva (*Urena lobata*) em função do pH. **Planta daninha**, v.18, n.3, 2000. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-83582000000300008&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582000000300008&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 11 jun. 2010. doi: 10.1590/S0100-83582000000300008.

SOUZA, M.S.T.; **Diversidade de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* de pastagens predominantes no Pantanal Sul-Mato-Grossense**. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Faculdade de Ciências Biológicas, Campus de Corumbá. (Trabalho de conclusão de curso), 2010.

STEAD, D.E., ELPHINSTONE, J.G., WELLER, S., SMITH, N. and HENNESSY, J. Modern methods for characterizing, identifying and detecting bacteria associated with plant. **Acta Hort.** 530, 45–59, 2000.

STEENHOUDT, O. & VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, n. 42, p.487 - 506, 2000.

STURZA, V. S.; MACHADO, S. L. O.; SILVA, K. S.; SANTOS, A. B. Qualidade forrageira do capim capivara em áreas de várzea, na região central do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 5, p.883-887, 2011.

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

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS- Departamento de Solos, (Boletim Técnico, 5), 174p., 1995.

VASCONCELLOS, R.L.F.; SILVA, M.C.P.; RIBEIRO, C.M.R.; CARDOSO, E.J.B.N. Isolation and screening for plant growth-promoting (PGP) actinobacteria from *Araucaria angustifolia* rhizosphere soil. **Sci Agric**. 67:743–746, 2010.

VITTI, G. C. & HEIRINCHS, R. Formas tradicionais e alternativas de obtenção e utilização do nitrogênio e do enxofre: uma visão holística. In: YAMADA, Tsuioshi; STIPP; ABDALLA, Silvia Regina; VITTI, Godofredo Cesar. **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**. Piracicaba: IPNI Brasil, 2007.

WISNIEWSKI-DYÉ, F.; LOZANO, L.; ACOSTA-CRUZ, E.; BORLAND, S.; DROGUE, B.; PRIGENT-COMBARET, C.; ROUY, Z.; BARBE, V.; MENDOZA, H.A.; GONZÁLEZ, V.; MAVINGUI, P. Genome Sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and Comparative Analyses of *Azospirillum* core and Accessory Genomes provide Insight into Niche Adaptation. In **Genes**, v3, p. 576-602; 2012.

YASMIN, F.; OTHMAN, R.; SAAD, M.S.; SIJAM, K. Screening for beneficial properties of rhizobacteria isolated from sweetpotato rhizosphere. **Biotechnology**. 6: 49–52, 2007.