

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**CONTRIBUIÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE
PLANTA EM *Brachiaria decumbens* STAPF. CULTIVADAS EM PERNAMBUCO**

JOÃO TIAGO CORREIA OLIVEIRA
Zootecnista

**RECIFE - PE
JULHO - 2016**

OLIVEIRA, J.T.C. Contribuição de bactérias promotoras de crescimento...

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**CONTRIBUIÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE
PLANTA EM *Brachiaria decumbens* STAPF. CULTIVADAS EM PERNAMBUCO**

JOÃO TIAGO CORREIA OLIVEIRA

**RECIFE - PE
JULHO - 2016**

JOÃO TIAGO CORREIA OLIVEIRA

CONTRIBUIÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTA EM *Brachiaria decumbens* STAPF. CULTIVADAS EM PERNAMBUCO

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, do qual participam a Universidade Federal Rural de Pernambuco, Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Zootecnia**.

Área de Concentração: Forragicultura

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof. Mário de Andrade Lira

Prof. Fernando José Freire

Prof^a. Mércia Virginia Ferreira dos Santos

**RECIFE - PE
JULHO - 2016**

Ficha catalográfica

O48c Oliveira, João Tiago Correia
Contribuição de bactérias promotoras de crescimento de planta em *Brachiaria decumbens* Stapf. cultivadas em Pernambuco / João Tiago Correia Oliveira. – Recife, 2016.
117 f. : il.

Orientador: Mário de Andrade Lira.
Tese (Doutorado Integrado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco / Universidade Federal da Paraíba / Universidade Federal do Ceará. Departamento de Zootecnia da UFRPE, Recife, 2016.

Referências.

1. Bactérias diazotróficas associadas a braquiária 2. Fixação biológica de nitrogênio 3. Inoculação bacteriana 4. Interação bactéria planta 5. Microbiota bacteriana diazotrófica I. Lira, Mário de Andrade, orientador II. Título

CDD 636

JOÃO TIAGO CORREIA OLIVEIRA

Contribuição de bactérias promotoras de crescimento de planta em *Brachiaria decumbens* Stapf. cultivadas em Pernambuco

Tese defendida e aprovada pela Comissão Examinadora em 04 de Julho de 2016

Orientador:

Prof. Dr. Mário de Andrade Lira
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Departamento de Zootecnia

Comissão Examinadora:

Dr. James Pierre Muir
Texas A&M University

Dr. José de Paula Oliveira
Instituto Agrônômico de Pernambuco

Dr. Márcio Vieira da Cunha
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Mário de Andrade Lira Júnior
Universidade Federal Rural de Pernambuco

**RECIFE - PE
JULHO - 2016**

A minha amada mãe Maria de Lourdes Oliveira Correia, pai João Correia de Lima e irmãs Lara e Jordana, pelos estímulos e, acima de tudo, pelo exemplo de luta, força e confiança que depositaram em mim. AMO VOCÊS!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

OFEREÇO

*Aos meus amados pais, João Correia de Lima e Maria de Lourdes de Oliveira fonte de
coragem para jamais desistir.*

DEDICO



Calvin e Haroldo

Bill Watterson

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me proporcionado mais esta conquista, estando presente e conduzindo minha vida, me fortalecendo e amparando nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais, pelo amor, educação, dedicação, paciência e todos os esforços dedicados. As minhas irmãs, Jordana e Lara que tanto me apoiam e contribuem na minha caminhada. A todos os meus familiares, pelo amor, apoio e pelas palavras de incentivo nos momentos mais difíceis desta jornada.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao meu orientador, Prof. Mário de Andrade Lira, pelo qual tenho enorme admiração, pela confiança depositada em mim, apoio, paciência, dedicação e orientação.

Aos meus co-orientadores Fernando Freire e Mércia Virginia, e professores colaboradores Alexandre Mello, José Dubeux Júnior, Júlia Kuklinsky Sobral, Mário Lira Júnior e Márcio Cunha, os quais tenho profundo respeito e admiração e não mediram esforços para contribuir neste trabalho.

Aos demais professores do Departamento de Zootecnia pelos quais tenho grande admiração. A todos os funcionários da UFRPE e UFRPE-Unidade Acadêmica de Garanhuns, pela disponibilidade e apoio durante estes anos de convivência.

Aos meus amigos da pós-graduação e graduação que criei laços de amizade fortes, contribuindo para o meu crescimento profissional e pessoal: Marcelo Batista, Silvania, Hugo, Hiran, Felipe, Niel, Janerson, Idija, Gabriela, Valéria, Marcelo Cavalcante, Janete, Naligia, Joelma, Talita, Ricardo, Toni, Carol e Cristiane, os quais contribuíram diretamente na conclusão desta etapa. Em especial a Suellen Costa, Karina Miranda e Amanda Gallindo, minhas irmãs, pelos conselhos, carinhos e companheirismo nos bons e ruins momentos.

Ao Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) e a todos funcionários da Estação Experimental de Itambé do IPA, em especial a Edvaldo (Nego), José dos Santos (Deca) e Dr. Erinaldo, os quais não mediram esforços para realização da pesquisa.

Aos amigos da UFRPE-Unidade Acadêmica de Garanhuns, por todos os ensinamentos e pela acolhida calorosa e total colaboração. Em especial, aos pesquisadores da família LGBM (Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana), Isa, Flaviana, Jacy, Jesimiel, Clau, Lu, Yasmin, Gessyka, Caio, Marcos, Ricardo, Everthon e Raquel, por todo apoio, incentivo e ensinamentos.

Aos meus irmãos Amância, Carol, Kely e Wando com quem aprendi um pouco de tudo e de tudo um pouco.

Aos meus amigos que estiveram torcendo e contribuindo para a conclusão desta etapa, os quais não posso citar nomes para não vim a faltar devido a tanta colaboração que tive.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco, pela concessão da bolsa e apoio financeiro para realização da pesquisa.

Tendo em vista um trabalho que necessita de várias linhas de conhecimento científico, além de exigir uma quantidade grande de mão-de-obra seria impossível realizá-lo sem a contribuição de todos vocês. Enfim, se faltou alguém ser lembrado, peço desculpas, porém jamais por falta de reconhecimento a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização de mais esta etapa, sendo assim, muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XV
RESUMO GERAL.....	1
ABSTRACT	3
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	5
CAPÍTULO 1	
Contribuição de bactérias promotoras de crescimento de planta em <i>Brachiaria decumbens</i> Stapf. cultivadas em Pernambuco	7
REFERENCIAL TEÓRICO.....	8
1. Importância do nitrogênio em pastagens de <i>Brachiaria</i> spp.....	8
2. Comunidade bacteriana do solo.....	10
3. Fixação biológica de nitrogênio: interação bactérias diazotróficas e gramíneas forrageiras.....	11
4. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio em pastagens	13
5. Benefícios de bactérias promotoras de crescimento de planta inoculadas em gramíneas.....	15
Referências bibliográficas	17
CAPÍTULO 2	
Germinação e crescimento de plantas de <i>Brachiaria decumbens</i> Stapf. inoculadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal, em dois ambientes	30
Resumo.....	31
Abstract.....	31
Introdução.....	35
Material e métodos	37
Resultados e discussão	46
Conclusões.....	62
Referências	62

CAPÍTULO 3

Interação de bactérias diazotróficas associadas a pastagens de <i>Brachiaria decumbens</i> Stapf. em sistema silvipastoril com leguminosas arbóreas.....	69
Resumo.....	70
Abstract.....	72
Introdução.....	74
Material e métodos.....	75
Resultados e discussão.....	81
Conclusões.....	94
Referências.....	94
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100
ANEXO.....	1001

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Caracterização de origem e potencial biotecnológico de isolados bacterianos diazotróficos inoculados em sementes de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk38/39

Tabela 2. Agrupamentos dos isolados bacterianos para formulação dos co-inóculos utilizados em sementes de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk41

Tabela 3. Comparação entre grupos de médias por contrastes ortogonais para as características de germinação e crescimento inicial de plântulas de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk, após a inoculação em sementes com bactérias promotoras de crescimento vegetal47

Tabela 4. Características de germinação e crescimento inicial de plântulas de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk, após a inoculação em sementes de bactérias com potencial biotecnológico, com permanência de 21 dias em câmara de germinação a temperatura de 25 ± 5 °C sob fotoperíodo de 12 h48

Tabela 5. Características de germinação e crescimento inicial de plântulas de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk, dos tratamentos com inóculos superiores a trestemunha, pré-selecionados pelo teste de Dunnett49

Tabela 6. Características de emergência e promoção de crescimento de plântulas aos 21 dias após a co-inoculação de bactérias com potencial biotecnológico em sementes de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk em casa de vegetação52

Tabela 7. Valores de R da análise de similaridade de ANOSIM com base no gene 16S rDNAs das comunidades bacterianas do solo rizosférico de plântulas de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk aos 21 dias após as co-inoculações de bactérias promotoras de crescimento de planta55

Tabela 8. Altura média de planta, número de folhas e de perfilhos, e área foliar de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk, conforme as co-inoculações de bactérias com potencial biotecnológico e cortes realizados com intervalos de 35 dias57

Tabela 9. Intensidade de verde da folha, massa de forragem, comprimento e massa seca de raiz de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk, conforme as co-inoculações de bactérias com potencial biotecnológico e cortes realizados com intervalos de 35 dias58

Tabela 10. Nitrogênio total e percentual de nitrogênio acrescido via fixação biológica na parte aérea e raiz de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk, conforme as co-inoculações de bactérias com potencial biotecnológico e cortes realizados com intervalos de 35 dias59

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Caracterização química do solo na camada 0,0-0,2 m no início do período experimental (novembro de 2012), em diferentes postos nas pastagens de *Brachiaria decumbens* Stapf. com e sem a introdução de leguminosas arbóreas Gliricídia (*Gliricidia sepium* Jacq.) e Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.)78

Tabela 2. Logs x das densidades populacionais das comunidades bacterianas diazotróficas rizosféricas de plantas de *Brachiaria decumbens* Stapf. em cultivo exclusivo e consorciado com as leguminosas Gliricídia (*Gliricidia sepium* Jacq.) e Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) em diferentes épocas do ano, período seco (coleta no mês de novembro) e chuvoso (coleta no mês de junho)82

Tabela 3. Índice de diversidade de Shannon-Weaver das comunidades bacterianas diazotróficas rizosféricas de plantas de *Brachiaria decumbens* Stapf. em cultivo exclusivo e consorciado com leguminosas Gliricídia (*Gliricidia sepium* Jacq.) e Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) em diferentes épocas do ano, período seco (coleta no mês de novembro) e chuvoso (coleta no mês de junho)86

Tabela 4. Produção de massa de forragem (g m²) de plantas de *Brachiaria decumbens* Stapf. em cultivo exclusivo e consorciado com leguminosas Gliricídia (*Gliricidia sepium* Jacq.) e

Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) em diferentes épocas do ano, período seco (coleta no mês de novembro) e chuvoso (coleta no mês de junho) 89

Tabela 5. Nitrogênio total e relação C/N de plantas de *Brachiaria decumbens* Stapf. em cultivo exclusivo e consorciado com leguminosas Gliricídia (*Gliricidia sepium* Jacq.) e Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) em diferentes épocas do ano, período seco (coleta no mês de novembro) e chuvoso (coleta no mês de junho) 91

Tabela 6. Percentagem de nitrogênio derivado do ar e quantidade de nitrogênio fixado biologicamente (g m^{-2}) em plantas de *Brachiaria decumbens* Stapf. em cultivo exclusivo e consorciado com leguminosas Gliricídia (*Gliricidia sepium* Jacq.) e Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) em diferentes épocas do ano, período seco (coleta no mês de novembro) e chuvoso (coleta no mês de junho) 92

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1. Análise da componente principal (PC) do polimorfismo de fragmentos de restrição do gene 16s rDNAs das comunidades bacterinas do solo rizosférico de plântulas de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk aos 21 dias após as co-inoculações de bactérias promotoras de crescimento de planta.55

CAPÍTULO 3

Figura 1. Precipitação pluvial mensal de novembro de 2012 a junho de 2014 na Estação Experimental de Itambé-PE, Instituto Agrônomo de Pernambuco. 76

Figura 2. Dendrograma de similaridade com base no Coeficiente de Jaccard e agrupado através do algoritmo *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average* da análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do gene *nifH* do DNA de solo rizosférico de plantas de *Brachiaria decumbens* Stapf. sem e com inclusão das leguminosas Gliricídia (*Gliricidia sepium* Jacq.) e Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) em diferentes épocas do ano, período seco (coleta no mês de novembro) e chuvoso (coleta no mês de junho). B: Plantas de braquiária em cultivo exclusivo; Plantas de braquiária mais próxima a Gliricídia (GL) e Sabiá (SL); 3,75 m de distância da Gliricídia (GLB) e Sabiá (SLB); 7,5 m de distância da Gliricídia (BB) e Sabiá (SB). 84

Figura 3. Dendrograma de similaridade com base no Coeficiente de Jaccard e agrupado através do algoritmo *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average* da análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do gene 16S do rDNA de solo rizosférico de plantas de *Brachiaria decumbens* Stapf. sem e com inclusão das leguminosas Gliricídia (*Gliricidia sepium* Jacq.) e Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) em diferentes épocas do ano, período seco (coleta no mês de novembro) e chuvoso (coleta no mês de junho). B: Plantas de braquiária em cultivo exclusivo; Plantas de braquiária mais próxima a Gliricídia (GL) e Sabiá (SL); 3,75 m de distância da Gliricídia (GLB) e Sabiá (SLB); 7,5 m de distância da Gliricídia (BB) e Sabiá (SB). 85

RESUMO GERAL

As gramíneas do gênero *Brachiaria* são largamente utilizadas por todo o Brasil devido a sua capacidade de tolerância a uma série de condições ambientais, muitas vezes desfavoráveis a utilização de outras espécies forrageiras. Entretanto, elevado percentual das áreas de pastagem cultivadas encontra-se em estágios diversos de degradação, tendo como principal causa a não reposição de nutrientes ao solo. A redução na disponibilidade de nitrogênio é o fator mais limitante para o desenvolvimento das pastagens tropicais, porém sua aplicação via adubação eleva os custos de produção e proporciona danos ao meio ambiente. Alternativas como o uso de bactérias diazotróficas e com outras características de potencial de promoção de crescimento vegetal tem ganhado destaque. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a inoculação e co-inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico e com outras características biotecnológicas na germinação, emergência e produção de *B. decumbens* cultivar Basilisk, além de buscar analisar a influência de leguminosas arbóreas na densidade, diversidade e capacidade de fixação biológica de nitrogênio da comunidade bacteriana diazotrófica associadas a *B. decumbens* Stapf. cultivadas em sistema silvipastoril. Foram realizados três experimentos. No experimento 1, avaliou-se a inoculação de bactérias visando a aplicação biotecnológica na germinação e crescimento inicial de plântulas com até 21 dias. As sementes utilizadas foram de *B. decumbens* cultivar Basilisk. em câmara de germinação. O experimento foi realizado na Unidade Acadêmica de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UAG/UFRPE) e utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 25 tratamentos, sendo 24 inoculações, 12 bactérias isoladas de cada espécie vegetal sendo elas *B. decumbens* Stapf. e *B. humidicola* (Rendle) Schweick. e uma testemunha. Cada tratamento teve 4 repetições de 50 sementes. O experimento 2, foi realizado na UAG/UFRPE, onde avaliou-se a co-inoculação de bactérias isoladas de *B. decumbens* Stapf. e *B. humidicola* (Rendle) Schweick. com potencial de promoção de crescimento vegetal em plantas de *B. decumbens* cultivar Basilisk. na emergência, desenvolvimento inicial de plântulas com até 21 dias, e nas características morfológicas e fisiológicas de plantas na fase de crescimento vegetal, além da produtividade das plantas sob estresse de corte. Este experimento foi realizado em casa de vegetação, sob delineamento inteiramente casualizado com sete tratamentos, cinco co-inóculos, uma adubação química e uma testemunha, com três cortes de avaliação e intervalo

entre os cortes de 35 dias, com 10 repetições por corte. O experimento 3 foi realizado na Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco, IPA-Itambé-PE. Analisou-se a influência das leguminosas arbóreas, Gliricídia (*Gliricidia sepium* Jacq.) e Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.), e da sazonalidade climática na densidade, diversidade e capacidade de fixação biológica de nitrogênio da comunidade bacteriana diazotrófica associadas a rizosfera de plantas de *B. decumbens* Stapf. cultivadas em sistema silvipastoril. As pastagens eram dispostas em delineamento de blocos ao acaso, com três repetições de um hectare cada. As avaliações ocorreram durante o período seco e chuvoso, por dois anos consecutivos. As inoculações e co-inoculações proporcionaram incremento na germinação, no crescimento inicial de plantas com até 21 dias, em ambiente controlado e casa de vegetação, além do aumento nas características morfológicas, fisiológicas, e na produtividade vegetal, os co-inóculos promoveram efeitos similares ou iguais da adubação química. Tendo as bactérias homólogas a *B. decumbens* e com alta produção de ácido indol acético ocasionado os maiores crescimentos nas gramíneas avaliadas. A presença das leguminosas arbóreas Gliricídia e Sabiá em pastagens de *B. decumbens* Stapf. em sistema silvipastoril e a sazonalidade, influenciaram a densidade e a variabilidade genética da população bacteriana diazotrófica e da comunidade total associadas ao nicho rizosfera da gramínea, bem como, geraram alterações na produção da massa de forragem, nos teores de nitrogênio total e na relação carbono/nitrogênio da gramínea, além do percentual de nitrogênio na gramínea fixado biologicamente e a quantidade de nitrogênio fixado biologicamente por m².

Palavras-chave: bactérias diazotróficas associadas à braquiária, fixação biológica de nitrogênio, inoculação bacteriana, interação bactéria planta, microbiota bacteriana diazotrófica

CONTRIBUTION OF PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIAS IN *Brachiaria decumbens* STAPF. GROWN IN PERNAMBUCO

ABSTRACT

The *Brachiaria* grasses are widely used throughout Brazil due to the tolerance capacity of a ranged environmental conditions, often unfavorable of using another forage species. However, a high percentage of cultivated pasture land is on many stages of degradation. The cause of it is the spare refilling of nutrients in the soil. The reduced nitrogen availability is the most limiting factor to the development of tropical pastures. Although, their application via fertilizers raise the production costs and provide environmental damage. Alternatives such as using diazotrophs and other potential characteristics of plant growth promotion has gained prominence. For this reason, this study aimed of evaluating the inoculation and co-inoculation nitrogen fixing bacterias and other biotech traits in germination, emergence and production of *B. decumbens* cv Basilisk, and seeking to analyze the influence of leguminous plants in density, diversity and the community of diazotrophic bacterial capacity of biological fixation of nitrogen associated with *B. decumbens* Stapf. grown in a silvopastoral system. Three experiments were conducted. On the first experiment, it was evaluated the bacteria inoculation, aiming to biotechnological applications in germination and early seedling growth up to 21 days. The seeds that were used was *B. decumbens* cv. Basilisk, in a germinating chamber. The experiment was conducted at the Academic Unit of Garanhuns of the Federal Rural University of Pernambuco (UAG/UFRPE) and it was performed a completely randomized design with 25 treatments, 24 inoculations, 12 bacterias were isolated from each plant species which are *B. decumbens* Stapf. and *B. humidicola* (Rendle) Schweick. and an untreated control. Each treatment had four replications of 50 seeds. The second experiment was conducted at UAG/UFRPE, which were evaluated the co-inoculation of isolated bacteria from *B. decumbens* Stapf. and *B. humidicola* (Rendle) Schweick. with potential for plant growth promotion in *B. decumbens* cv Basilisk in initial emergency development of seedlings up to 21 days and the physiological and morphological characteristics of plants in plant growth stage plus the productivity of plants under stress court. This experiment was conducted in a greenhouse in a completely randomized design with seven treatments, five co-inoculants, chemical fertilizer

and an untreated control, with three rating cuts and range between 35 days of cuts, with 10 repetitions per court. The third one was conducted at the Experimental Station of the Agronomic Institute of Pernambuco, IPA-Itambé-PE. It was analyzed the influence of tree legumes, *Gliricidia* (*Gliricidia sepium* Jacq.) and *Sabia* (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.), and seasonality in density, diversity and the capacity of communities of diazotrophic bacterial having biological nitrogen fixation associated on plant rhizosphere *B. decumbens* Stapf. grown in a silvopastoral system. The pastures were arranged in a randomized blocks design with three replicates, one hectare each. The assessments were occurred during the dry and rainy season, for two consecutive years. Inoculations and co-inoculations were provided to increase germination, initial plant growth up to 21 days in a controlled environment greenhouse plus the increase in morphological, physiological characteristics, and plant productivity, the co-inoculants promoted similar effects equal or chemical fertilizer. Having the homologous bacteria *B. decumbens* and high production skeptical indole acid caused the largest increases in assessed grasses. The presence of leguminous tree *Gliricidia* and *Sabia* in pastures of *B. decumbens* Stapf. in silvopastoral system and seasonality influenced the density and genetic variability of diazotrophic bacterial population and the total community associated with the rhizosphere niche of grass as well, turning on changes in the mass of forage production, the total nitrogen and carbon ratio/nitrogen from grass, besides the nitrogen percentage in the grassy biologically fixed and the amount of nitrogen fixed biologically by m².

Key words: bacterial inoculation, biological nitrogen fixation, diazotrophs associated with *Brachiaria*, diazotrophic bacterial microbiota, plant bacteria interaction

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O nitrogênio (N) apresenta grande relevância na produção agrícola, principalmente em relação ao custo total de implantação e manutenção das culturas (Wemheuer et al., 2016). O preço atual dos fertilizantes nitrogenados está relacionado a vários fatores, tais como, aumento da demanda causada por uma crescente necessidade global de alimentos, dieta mais diversificada e com isso, maior quantidade de fertilizantes nitrogenados sendo requerido, aumento da produção vegetal necessária para produção de biocombustível e aumento dos custos de transporte (Bhattacharjee et al., 2008; Afonso et al., 2011; Olivares et al., 2013; Socolow, 2016).

O fertilizante é uma *commodity* sujeita às forças globais de mercado, à volatilidade e aos riscos (Oliveira et al., 2010). De elevada importância, tanto para as plantas como para a nutrição animal, o N contribui para o aumento da capacidade de suporte da pastagem, prolongando a capacidade produtiva e melhorando a qualidade da dieta e o desempenho animal (Angus & Povos, 2013; Silveira et al., 2015; Stott & Gourley, 2016).

Portanto, práticas de manejo que aumentem a eficiência do uso de fertilizantes nitrogenados e, principalmente, que aperfeiçoem os processos biológicos envolvidos no fornecimento deste nutriente para as plantas são de grande importância para a diminuição dos custos de produção das culturas (Chubatsu et al., 2011). Nas gramíneas, o N acumulado pode ser proveniente de duas fontes distintas, uma amplamente conhecida que é resultante da absorção do N presente no solo de forma natural ou incorporado pela prática da fertilização e, outra, relacionada com a fixação biológica do N (FBN), por bactérias ditas diazotróficas, associadas às plantas. Esta última é considerada como de suma importância e potencialmente promissora para muitas espécies vegetais cultivadas por todo o mundo (Roesch et al., 2010; Andreote et al., 2014).

As bactérias exercem inúmeros efeitos positivos oriundos do seu metabolismo no solo e nas plantas, em relações mutualísticas e comensais, entre estes benefícios, pode-se citar, além da FBN, a solubilização de fosfato inorgânico e a síntese de fitohormônios (Andreote et al., 2014; Glick, 2015). Essas bactérias podem estar presentes em diferentes habitats, apresentando elevada diversidade morfológica, fisiológica e genética o que lhes confere enorme potencial para utilização agrícola como produtos biotecnológicos capazes de promover o crescimento dos vegetais (Moreira et al., 2010; Castro et al., 2011). Porém, a diversidade fisiológica e genética das comunidades bacterianas associadas ao vegetal e presentes no solo podem ser influenciadas pelos diferentes tipos de manejo aplicados ao solo e a planta, a espécie vegetal cultivada, época do ano e ação animal (Reis Júnior et al., 2004; Garrido et al., 2010; Chávez et al., 2011; Wang et al., 2016).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a inoculação e co-inoculação de bactérias diazotróficas e com potencial de aplicação biotecnológica na germinação, emergência e produção vegetal de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk, bem como, analisar a influência de leguminosas arbóreas na densidade, diversidade e capacidade de FBN da comunidade bacteriana diazotrófica rizosférica de *B. decumbens* Stapf. cultivada em sistema silvipastoril.

CAPÍTULO 1

**Contribuição de bactérias promotoras de crescimento de planta em *Brachiaria*
decumbens Stapf. cultivadas em Pernambuco**

REFERENCIAL TEÓRICO

1. Importância do nitrogênio em pastagens de *Brachiaria* spp.

As plantas forrageiras apresentam importância para pecuária mundial e principalmente para brasileira, uma vez que a produção de carne e leite é baseada quase que exclusivamente nos sistemas de produção a pasto (Rubel et al., 2015). Dentre as características predominantes desses sistemas produtivos, destacam-se as melhores condições de bem-estar animal e o baixo custo de produção, frente aos sistemas de criação com alimentos concentrados (Hempson et al., 2015; Leis et al., 2015; Murgueitio et al., 2015).

Originárias da região dos Grandes Lagos em Uganda, África, as *Brachiaria* spp. foram introduzidas no Brasil em 1960 (Seiffert, 1980; Soares Filho, 1994). Atualmente, é o principal gênero de gramíneas utilizado na forma de pastagens, ocupando aproximadamente 80% dos 200 milhões de hectares cultivados por todo o território nacional (EMBRAPA, 2014), tendo destaque a espécie *B. decumbens* Stapf. (Martuscellos et al., 2009). O gênero *Brachiaria* foi reclassificado taxonomicamente como *Urochloa* (Torres-González & Morton, 2005). No entanto, a nomenclatura *Brachiaria* continua sendo utilizada, devido ao reconhecimento e uso pelos pesquisadores da área.

O sucesso dessas forrageiras deve-se à sua adaptabilidade aos diversos sistemas de produção, tolerância às limitações e ou condições restritivas de utilização (Jank et al., 2013), alta produção de matéria seca e crescimento durante a maior parte do ano (Euclides et al., 2010). Contudo, elevado percentual das áreas de pastagens encontra-se com algum grau de degradação, tendo como principais causas a não reposição de nutrientes para o solo e as plantas e o manejo inadequado (EMBRAPA, 2014; Dias Filho, 2015). Como também, a superlotação animal e a reduzida taxa de germinação de sementes, proporcionada pela qualidade nem sempre satisfatória e dormência elevada (Pereira et al., 2011; Vendramini et al., 2014).

Considerado o nutriente fundamental para manutenção da produtividade e persistência dos vegetais, o nitrogênio (N) é constituinte de diversas biomoléculas que participam da síntese dos compostos orgânicos que formam a estrutura do vegetal e suas características morfológicas (Taiz & Zeiger, 2013). Neste contexto, a adubação nitrogenada pode estimular a produtividade dos pastos, de acordo com os níveis de N utilizados e as espécies cultivadas (Buzetti et al., 2015; Silva et al., 2015; Lopes et al., 2016).

A elevada dinâmica no solo apresentada pelo nitrogênio, bem como o seu potencial poluidor e o elevado custo dos fertilizantes nitrogenados, fazem com que seja necessária a busca de alternativas viáveis que minimizem a aplicação deste nutriente no solo e prolongue sua disponibilidade para a planta (Hungria et al., 2016). No intuito de disponibilizar o N de forma contínua, a médio e longo prazo, a associação micro-organismos diazotróficos (capazes de fixar o N atmosférico) com plantas passa a obter destaque (Araújo et al., 2014).

Entre as alternativas que podem ser utilizadas, há o consórcio de leguminosas e gramíneas (Apolinário et al., 2015), com enfoque no sistema silvipastoril, com o uso de leguminosas arbóreas. Este sistema é capaz de proporcionar uma série de vantagens, tais como, elevação dos teores de matéria orgânica do solo, redução dos processos erosivos, eficiência na ciclagem e diminuição das perdas dos nutrientes por lixiviação, desta forma, podendo contribuir significativamente com a redução do processo de degradação das pastagens (Kobiyama et al., 2001; Paciullo et al., 2014; Chen et al., 2015; Solorio et al., 2016). Além de melhorias no que tange aos fatores nutricionais e de qualidade do pasto (Silveira et al., 2015), condições de conforto térmico para os animais (Karki & Goodman, 2015) e possibilita uma renda adicional ao produtor (Bussoni et al., 2015).

As leguminosas, por apresentarem associação mais eficiente com bactérias diazotróficas em relação as demais famílias vegetais (Freitas et al., 2010), podem ser capazes

de transferir parte do N fixado para outra planta, quando em consorcio (Louam et al., 2015). Outra alternativa, que visa viabilizar o N nas pastagens, é o estudo da inoculação de microorganismos com potencial biotecnológico em gramíneas forrageiras (Richardson et al., 2009; Hungria et al., 2016), neste sentido, o melhor entendimento sobre as interações entre bactérias diazotróficas e plantas, tem ganhado importância (Compant et al., 2010; Andreote et al., 2014).

2. Comunidade bacteriana do solo

O sistema solo é um dos mais ricos ambientes em densidade e diversidade microbiana (Mendes et al., 2015), essas elevadas densidades e diversidades, influenciam e contribuem na decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes (Toda et al., 2010), formação do solo (Moreira & Siqueira, 2006), e na manutenção da resiliência do sistema (Nacke et al., 2011).

Altos teores de biomassa microbiana têm relação com solos mais estáveis (Chaer et al., 2009). Fatores de ocorrências naturais e antrópicos, podem influenciar essas comunidades e, conseqüentemente, interferir nas suas atividades, nos processos biológicos e bioquímicos do solo, alterando a produtividade agrícola e a sustentabilidade dos agroecossistemas (Wessén et al., 2011; Souza et al., 2012; Azar et al., 2013; Wemheuer et al., 2016). Assim, tornando-se uma ferramenta importante no monitoramento de alterações ambientais decorrentes da exploração agropecuária, no planejamento e na avaliação das práticas de manejo (Oliveira et al., 2014; Rashid et al., 2016).

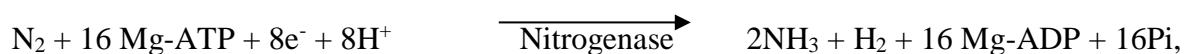
A estrutura e a funcionalidade das comunidades microbianas tem relação estreita com as propriedades químicas e físicas do solo, bem como, o tipo de uso e ocupação (Hayden et al., 2010; Rasche et al., 2011). Ao considerar a associação entre bactérias e plantas, estas são sensíveis às alterações bióticas e abióticas (Lange et al., 2014), de tal forma que as interações estabelecidas entre as diversas espécies de bactérias e plantas são capazes de determinar a

composição e a formação das comunidades bacterianas, alteradas dentre outros fatores, pelos genótipos e estágio fenológicos do vegetal (Magnani et al., 2010; Murphy et al., 2016), pelos genótipos do micro-organismos (Andreote et al., 2009; Andreote et al., 2014) e pelo próprio ambiente (Vargas et al., 2015).

3. Fixação biológica de nitrogênio: interação bactérias diazotróficas e gramíneas forrageiras

As plantas absorvem o N na forma de amônio (NH_4^+) ou de nitrato (NO_3^-) ou por meio da fixação biológica do N atmosférico (FBN) (Deb et al., 2015). Correspondendo à aproximadamente 78% dos gases da atmosfera, o N atmosférico (N_2) é altamente estável, devido a sua tripla ligação covalente, tornando-se indisponível para as plantas. Porém, essa disponibilidade pode ser afetada quando o N é fixado por processos industriais ou naturais (Taiz & Zieger, 2013).

Capazes de colonizar diferentes ambientes, os micro-organismos diazotróficos reduzem o N_2 a amônia (NH_3) por meio do complexo enzimático da nitrogenase, sendo frequentemente mais caracterizado o processo dependente do molibdênio (Mo) e ferro (Fe), codificado pela ação dos genes *nif* (*nitrogen fixation*) (Nunes et al., 2003; Franche et al., 2009; Hoffman et al., 2014; Stein & Klotz, 2016), seguindo a reação:



(onde, e^- simboliza elétron e Pi simboliza o fosfato inorgânico).

Composto por duas metalo-proteínas, a Fe-proteína, codificada pelo gene *nifH* e a MoFe-proteína codificada pelos genes *nifD* e *nifK* (Levy-Booth et al., 2014), a atividade reativa requer elevado gasto energético, além da presença de redutores como a ferredoxina e flavodoxina e de uma via de assimilação da amônia. Devido os genes que codificam a nitrogenase apresentarem-se altamente conservados nos diazotróficos de vida livre,

associativos e simbiontes (Figueiredo et al., 2013; Santi et al., 2013), permite-se a avaliação da diversidade genética de indivíduos ou comunidades de diazotróficos (Ueda et al., 1995; Poly et al., 2001).

Sendo a planta um amplo e diversificado nicho de colonização por bactérias (Andreote et al., 2014; Panizzon et al., 2016), estas podem ser organizadas de acordo com o seu local de colonização em três grupos (Moreira et al., 2010). O primeiro, formado por bactérias de vida livre que habitam a rizosfera e o solo, o segundo por bactérias associativas, epifíticas, capazes de colonizar os tecidos vegetais na superfície externa, e o terceiro grupo colonizando o interior do tecido vegetal, ocupando espaços intra e intercelulares, endofíticas (Richardson et al., 2009). Podendo ser encontradas nos diversos órgãos vegetais como raízes, colmo, folhas, sementes, pólen e dentro de nódulos de leguminosas (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006; Magnani et al., 2010), sendo o sistema radicular o principal nicho de colonização, tanto de bactérias endofíticas quanto epifíticas (Castro et al., 2011; Lima et al., 2015).

A primeira associação estudada detalhadamente entre gramíneas forrageiras e bactérias diazotróficas, data de 1966 com a Grama-batatais (*Paspalum notatum* cultivar Batatais) e *Azotobacter paspali* (Baldani & Baldani, 2005; Döbereiner, 1965). Percebendo-se que essa interação contribuía com aproximadamente 10% do N assimilado pela planta, cerca de 20 kg de N ha⁻¹ ano⁻¹ via fixação biológica (Reis Júnior et al., 2008).

Diversos estudos têm comprovando a associação de bactérias diazotróficas com gramíneas forrageiras, entre essas, plantas do gênero *Brachiaria* spp. (Reis Júnior et al., 2006; Kelemu et al., 2011; Silva et al., 2013), Capim-elefante (Videira et al., 2013; Dubeux Júnior et al., 2014b), Sorgo (Yoon et al., 2015), Grama-bermuda (Bauer et al., 2012; Liu et al., 2012), *Panicum virgatum* (Dohleman et al., 2012; Bahulikar et al., 2014), Capim-colonião (Huo et

al., 2012), entre outras espécies de gramíneas, como Trigo (Stets et al., 2015), Milho (Matsumura et al., 2015), Arroz (Beutler et al., 2016) e Cana-de-açúcar (Taulé et al., 2016).

A FBN em gramíneas forrageiras é responsável por incorporar aproximadamente 30 a 45 kg de N ha⁻¹ ano⁻¹ no sistema solo planta, em condições extensivas de cultivo de *Brachiaria*, (Boddey & Victoria, 1986). Silva et al. (2010), avaliando pastagens de *B. humidicola* (Rendle) Schweick., *B. decumbens* Stapf. e Capim-elefante, observaram contribuição da FBN de 10 a 42% do N total da planta. Moraes et al. (2009) e Perin et al. (2004) observaram contribuição média de 51% e 61% avaliando plantas de Capim-elefante e Milheto, respectivamente. Embora não suprindo as exigências totais das plantas, a quantidade de N fixado em algumas gramíneas pode ser suficiente para proporcionar um balanço nulo ou positivo de N em sistemas de manejo mais extensivos, permitindo maior longevidade da pastagem (Reis Júnior et al., 2004).

Alta diversidade e inúmeros efeitos positivos tem sido observado na associação de bactérias diazotróficas e gramíneas forrageiras (Pedrosa et al., 2011), estes influenciados pela espécie vegetal ou cultivar (Reis Júnior et al., 2004; Wemheuer et al., 2016), manejo (Coelho et al., 2009; Wang et al., 2016), época do ano (Garrido et al., 2010) e ação animal sob a vegetação, quando em pastejo (Chávez et al., 2011).

4. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio em pastagens

A FBN incorpora nos ecossistemas terrestres aproximadamente 128 Tg N ano⁻¹, suprindo 15% das necessidades de N de todos os tipos de biomas (Taiz & Zieger, 2013; Stein & Klotz, 2016). Em solos agrícolas, com cultivo de plantas não leguminosas, a contribuição da FBN por bactérias de vida livre e associativas não é tão significativa quanto a contribuição dos simbioses (Andreote et al., 2014). Entretanto, considerando as grandes extensões de terras naturais e cultivadas com gramíneas forrageiras e cereais, esta contribuição torna-se importante. Em algumas áreas de pastagens sem aplicação de fertilizantes nitrogenados, a FBN

tem mantido níveis razoáveis de produtividade, devido a associação bactéria diazotrófica-planta (Moreira et al., 2010; Okumura et al., 2013; Pankievicz et al., 2015).

Em pastos consorciados, parte do N presente nas gramíneas poderá ter sido transferido via planta leguminosa (Chalk et al., 2014; Zhang et al., 2016). Cerca de 75% do N presente na biomassa das leguminosas é oriundo da FBN (Barcellos et al., 2008), podendo esse valor variar com a espécie, fase de crescimento e época do ano (Beneditti, 2013), com a taxa de FBN variando aproximadamente entre 80 a 350 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N para algumas leguminosas como o Calopogônio, Feijão Guandu, Gliricídia e Amendoim forrageiro (Formentini et al., 2008).

O N fixado biologicamente pelas leguminosas pode ser transferido às gramíneas de forma direta ou indireta (Hewitt et al., 2016). Entre essas formas há, a exsudação direta de N solúvel das raízes das leguminosas (Nyfeler et al., 2011), senescência e decomposição dos nódulos (Fustec et al., 2011), decomposição das folhas e ramos (Rasmussen et al., 2012; Munroe & Isaac, 2014), e excrementos de animais em pastejo (Liu et al., 2011).

A transferência direta de N da leguminosa para a espécie vegetal em consórcio apresenta baixos valores, em torno de 10 kg ha⁻¹ de N, menos de 1,5% do N do solo que circunda as raízes e nódulos é proveniente da FBN (Wearner, 1988), sendo a maior parte do N da leguminosa transferido de forma indireta (Pegoraro et al., 2011). A renovação radicular é uma característica particular de cada espécie e está relacionada ao estresse, ao qual a planta for submetida, como a desfolhação (Costa et al., 2012; Andreoli et al., 2015). Entretanto, além da capacidade de renovação, a dinâmica de decomposição dos tecidos radiculares é fundamental para a transferência de N (Beneditti, 2013).

A deposição de resíduos vegetais no solo apresenta papel relevante na ciclagem e conservação do N no sistema (Liu et al., 2011). Apolinário et al. (2016) observaram aumento nas taxas de decomposição da matéria orgânica e na ciclagem de N da serapilheira em

pastagens de *B. decumbens* Stapf. consorciadas com leguminosas arbóreas, frente ao cultivo exclusivo da braquiária.

A entrada de N, via resíduos de excreção dos animais, ocorre de forma heterogênea (Ferreira et al., 2011), e pode ser influenciada pela distribuição desuniforme dos excrementos nas áreas de pastagem, taxa de lotação do pasto, características próprias do animal (peso, espécie, raça e sexo), sistema de manejo da pastagem, localização das aguadas e topografia do terreno (Silva Neto et al., 2011; Dubeux Júnior et al., 2013). Para Dubeux Júnior et al. (2009), a excreta animal apresenta efeito positivo na ciclagem de nutrientes e pode contribuir para melhorar a qualidade do solo. Vale salientar que apenas parte dos nutrientes retorna ao solo via excreta animal, a outra parte é retida no organismo animal, além da exportação por meio de produtos como carne, leite e lã (saídas do sistema).

Em ensaio de decomposição de fezes de bovinos sob pastejo de *B. decumbens* Stapf. em sistemas silvipastoris compostos por leguminosas arbóreas, Dubeux Júnior et al. (2014a) observaram que apenas uma pequena proporção do N contido nas fezes foi liberado durante os 256 dias de incubação. É importante ressaltar que os teores nutricionais do alimento consumido pelo animal e fatores como digestibilidade e taxa de passagem, implicarão na concentração do nutriente nas fezes (Benedetti, 2013).

5. Benefícios de bactérias promotoras de crescimento de planta inoculadas em gramíneas

Inúmeros são os efeitos positivos esperados e observados a partir da inoculação de bactérias em plantas não leguminosas (Suyal et al., 2016). Algumas bactérias que se associam ao vegetal podem exercer diferentes benefícios e são denominadas bactérias promotoras de crescimento de planta (Puri et al., 2015; Santoyo et al., 2016). Os efeitos positivos podem ocorrer por influência direta, com o aumento da solubilização e entrada de nutrientes, produção

de reguladores de crescimento vegetal (fitohormônios) ou por influência indireta, como supressão de patógenos, por produção de sideróforos ou antibióticos (Andreote et al., 2014; Glick, 2015).

A inoculação de bactérias promotoras de crescimento em gramíneas forrageiras tem proporcionado aumento no índice de velocidade de germinação, bem como, no comprimento na parte aérea de 35,6% e raiz 32,8% em plantas de *Panicum virgatum* cultivar Alamo, aos 30 dias de emergência inoculadas com *Burkholderia phytofirmans* (Kim et al., 2012). Kelemu et al. (2011) constataram incremento na massa de raiz e parte aérea ao avaliar plantas de *B. brizantha* CIAT 6294 aos 65 dias, inoculadas via sementes com bactérias diazotróficas.

Caro et al. (2014), co-inoculando *Azospirillum* SRGM2 e *Enterobacter agglomerans* UV1 em Capim-tanzânia, verificaram aumento de 45,6% da matéria seca da parte aérea. Araújo et al. (2012), inoculando bactérias diazotróficas do gênero *Bacillus* spp. em *B. brizantha* e avaliando as plantas em três cortes com intervalos de 45 dias, observaram aumento na massa de forragem, área foliar e intensidade de verde das folhas, número de folhas e perfilhos na média dos três cortes efetuados.

Nas demais gramíneas de interesse agrônômico, como o Arroz, a inoculação proporcionou o aumento na massa seca, conteúdo de N e produção de grãos em condições de casa de vegetação e campo (Rana et al., 2015; Kandel et al., 2015; Rangjaroen et al., 2015). Silva et al. (2004) trabalhando com plantas de Trigo e Cevada, tratadas com e sem inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum*, observaram supressão de patógeno, fungo *Bipolaris sorokiniana*, causador da mancha marrom nessas plantas.

Contudo, a formulação de inoculantes eficientes não é tarefa fácil, devendo-se atentar para diversas características, entre as quais, o veículo e a forma de inoculação (Zilli et al., 2010; Malusá et al., 2012; Milani et al., 2013; Rivera et al., 2014), tipos de solo, alta capacidade de

concorrência com bactérias indígenas (Afzal et al., 2010), especificidade bactéria hospedeiro (Bianchet et al., 2013), sendo verificada entre diferentes culturas ou até mesmo genótipos do vegetal (Saikia et al., 2012). Como relatado por Roesch et al. (2005) e Souza et al. (2015) ao avaliarem a reinoculação de bactérias diazotróficas em Trigo, observaram especificidade entre micro-organismos e diferentes cultivares de vegetal.

Estudos em várias regiões do Brasil e no mundo, estão buscando identificar, isolar e inocular bactérias diazotróficas ou com outras características de promoção de crescimento de planta, assim surge uma nova gama de produtos, os inoculantes, que visam substituir ou diminuir a utilização de fertilizantes nitrogenados industriais que são onerosos e proporcionam efeitos adversos no meio ambiente. Assim, os inoculantes tornam-se uma alternativa frente aos fertilizantes químicos (Suyal et al., 2016).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFZAL, M.; YOUSAF, S.; REICHENAUER, T.G.; KUFFNER, M.; SESSITTSCH, A. Soil type affects plant colonization, activity and catabolic gene expression of inoculated bacterial strains during phytoremediation of diesel. **Journal of Hazardous Materials**, v.186, p.1568-1575, 2010.

AFONSO, J.R.; ART, O.; COSTA, D.S. et al. Combinações de fontes de nitrogênio no desenvolvimento e rendimento do feijoeiro. **Pesquisa Agropecnologica Tropical**, v.41, p.391-398, 2011.

ANDREOLLA, V.R.M.; MORAES, A.; BONA FILHO, A.; SANDITI, I.E.; BONINI, A.K.; DEISS, L. Pastejo e nitrogênio no azevem sobre a quantidade física do solo e produtividade do feijão. **Engenharia Agrícola**, v.35, p.11-26, 2015.

ANDREOTE, F.A.; GUMIERE, T.; DURRER, A. Exploring interactions of plant microbiomes. **Scientia Agrícola**, v.71, p.528-539, 2014.

ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.417-432, 2009.

ANGUS, J.F.; POVOS, M.B. Nitrogen from Australian dryland pastures. **Crop & Pasture Science**, v.63, p.746-758, 2013.

APOLINÁRIO, V.X.O.; DUBEUX, J.C.B.; LIRA, M.A.; FERREIRA, R.L.C.; MELLO, A.C.L.; COELHO, D.L.; MUIR, J.P.; SAMPAIO, E.V.S.B. Decomposition of arboreal legume fractions in a silvopastoral system. **Crop Science**, v.1, p.1-24, 2016.

APOLINÁRIO, V.X.O.; DUBEUX JÚNIOR, J.C.B.; LIRA, M.A.; FERREIRA, L.C.R.; MELLO, A.C.L.; SANTOS, M.V.F.; SAMPAIO, E.V.S.B.; MUIR, J.P. Tree legumes provide marketable wood and add nitrogen in wan-climate silvopasture systems. **Alliance of Crop, Soll, and Evironmental Science Societies**, v.107, p.1915-1321, 2015.

ARAÚJO, F.F.; GUABERTO, L.M.; SILVA, I.F. Bioprospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em *Brachiaria brizantha*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, p.521-527, 2012.

ARAÚJO, E.O.; MARTINS, M.R.; MERCANTE, F.M. *Herbaspirillum seropedicae* inoculation and nitrogen fertilization on nitrogen use efficiency of different corn genotypes. **African Journal of Agricultural**, v.40, p.3025-3031, 2014.

AZAR, G.S.; ARAÚJO, A.S.F.; OLIVEIRA, M.E.; AZEVÊDO, D.M.M.R. Biomassa e atividade microbiana do solo sob pastagem em sistemas de monocultura e silvopastoril. **Ciências Agrárias**, v.34, p.2727-2736, 2013.

BAHULIKAR, R.A.; TORRES-JEREZ, I.; WORLEY, E. Diversity of nitrogenfixing bacteria associated with switch grass in the native tall grass prairie of Northern Oklahoma. **Applied Environmental Microbiol**, v.80, p.5636-5643, 2014.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Histoy on the biological nitrogen fixation research in graminaceo us plants: special emphasis on the Brazillian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p.549-579, 2005.

BARBOSA, J.Z.; CONSALTER, R.; VARGAS MOTTA, A.C. Fixação biológica de nitrogênio em poaceae. **Revista Evidência**, v.12, p.7-18, 2012.

BARCELLOS, A.O.; RAMOS, A.K.B.; VILELA, L.; MARTHA JÚNIOR, G.B.; Sustentabilidade da produção de animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.51-67, 2008.

BAUER, J.T.; KLECZEWSKI, N.M.; BEVER, J.D.; ARGILA, K.; REYNOLDS, H.L. Nitrogen-fixing bacteria, arbuscular mycorrhizal fungi, and the productivity and structure of prairie grassland communities. **Oecologia**, v.170, p.1089-1098, 2012.

BEUTLER, A.; BURG, G.M.; DEAK, E.A.; SCHMIDT, M.R.; GALON, L. Bactéria fixadora de nitrgênio e produtividade e desenvolvimento de arroz irrigado por inundação. **Revista Caatinga**, v.29, p.11-17, 2016.

BENEDITTI, E. **Leguminosas e sistemas silvipastoril**, 1.ed. Uberlândia: EDFU, 2013. 127p.

BHATTACHARJEE, R.B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S.N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for nan-legumes: prospects and challenges. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.80, p.199-209, 2008.

BIANCHET, P.; SANGOI, L.; KLAUBERG, O.K.; MIQUELLUTI, D.J.; FERREIRA, M.A.; VIEIRA, J. Formulações simples e mista de inoculantes com bactérias diazotróficas, sob diferentes doses de nitrogênio na cultura do arroz irrigado. **Ciências Agrárias**, v.34, p.2555-2566, 2013.

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

BUSSONI, A.; JUAN, C.; FERNÁNDEZ, E.; BOSCANI, M.; CUBBAGE, F.; BENTANCUR, O. Integrated beef and wood production in Uruguay: potential and limitations. **Agroforest Syst**, v.89, p.1107-1118, 2015.

BUZETTI, S.; FERNANDES, J.C.; DUPAS, E.; TEIXEIRA FILHO, M.C.M.; ANDREOTTI, M. Sources and rates of nitrogen fertilizer used in Mombasa grineagrass in the Brazilian Cerrado region. **African Journal of Agricultural Research**, v.10, p.2076-2082, 2015.

CARO, D.M.C.; RUBIANO, M.F.G.; FANDIÑO, B.A.R. Inoculation with *Azospirillum* spp. and *Enterobacter agglomerans* in guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.) in the Cesar Department (Colombia). **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, v.67, p.7271-7280, 2014.

CASTRO, C.B.; KIDD, P.S.; FERNÁNDES, Á.P.; WEYENS, N.; ACEA, M.J.; VANGRONSVELD, J. Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterisation. **Plant Soil**, v.340, p.413-433, 2011.

CHAER, G.M.; FERNANDES, M.; MYROLD, D.D.; BOTTOMLEY, P. Shifts in microbial community composition and physiological profiles across a gradient of induced soil degradation. **Soil Science Society of America Journal**, v.73, p.1327-1334, 2009.

CHALK, P.M.; POVOS, M.B.; McNEILL, A.M.; BODDEY, R.M.; UNKOVICH, M.J.; GARDENER, M.J.; SILVA, C.F.; CHEN, D. Methodologies for estimating nitrogen transfer between legumes and companion species in agro-ecosystems: a review of ¹⁵N-enriched techniques. **Soil Biology and Biochemistry**, v.73, p.10-21, 2014.

CHÁVES, L.F.; ESCOBAR, L.F.; ANGHINONI, I.; CARVALHO, P.C.F.; MEURER, E.J. Diversidade metabólica e atividade microbiana no solo em sistemas de integração lavoura-pecuária sob intensidades de pastejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.1254-1261, 2011.

CHEN, W.; HUANG, D.; LIU, N.; ZHANG, Y.; BADGERY, W.B.; WANG, X.; SHEN, Y. Improved grazing management may increase soil carbon sequestration in temperate steppe. **Scientific Reports**, v.5, p.1038-1053, 2015.

CHUBATSU, L.S.; MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M. et al. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant Soil**, v.356, p.197-207, 2011.

COELHO, M.R.; MARRIEL, I.E.; JENKINS, S.N., LANYON, C.V.; SELDIN, L.; O'DONNELL, A.G. Molecular detection and quantification of *nifH* gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. **Applied Soil Ecology**, v.42, p.48-53, 2009.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo-and endosphere of plant: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biotechnology**, v.42, p.669-678, 2010.

COSTA, M.A.T.; TORMENA, C.A.; LUGÃO, S.M.B.; FIDALSKI, J.; NASCIMENTO, W.G.; MEDEIROS, F.M. Resistência do solo à penetração e produção de raízes e de forragem em diferentes níveis de intensificação de pastejo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.36, p.993-1004, 2012.

DEB, K.; DEB, B.; PANDEY, P. Isolation and characterization of root nodule bacterial associated with *Cassia alata* of Southern parts of Assam, India. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**. v.3, p.58-63, 2015.

DIAS FILHO, M.B. **Degradação de pastagens: processos, causas e estratégias de recuperação**. 4ed. Belém: Edição do autor, 2015. 215p.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa Agrobiologia, 1995. 60p.

DOHLEMAN, F.G; HEATON, E.A.; ARUNDALE, R.A.; LONGO, S.P. Seasonal dynamics of above-and below-ground biomass and nitrogen partitioning in *Miscanthus × giganteus* and *Panicum virgatum* across three growing seasons. **Global Change Biology Bioenergy**, v.4, p.534-544, 2012.

DUBEUX JÚNIOR, J.C.B.; LIRA, C.C.; FREITAS, E.V.; SANTOS, M.V.F.; LIRA, M.A.; DYKSTRA, C.; SANTOS, E.R.S.; TENÓRIO FILHO, F. Decomposition of cattle dung on mixed grass-legume pastures. **Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales**, v.2, p.60-62, 2014a.

DUBEUX JÚNIOR, J.C.B.; OLIVEIRA, J.T.C.; MIRANDA, K.R.; LIRA JÚNIOR, M.A.; SANTOS, M.V.F.; LIRA, M.A.; FREITAS, E.V. Isolation of root endophytic bacteria in elephant grass (*Pennisetum purpureum*) cultivars. **Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales**, v.2, p.40-41, 2014b.

DUBEUX JÚNIOR, J.C.B.; SANTOS, M.V.F.; MELLO, A.C.L. Ciclagem de nutrientes em pastagens. In: REIS, R.A.; BERNARDES, T.F.; SIQUEIRA, G.R. (Ed.1). **Forragicultura: ciência tecnologia e gestão dos recursos forrageiros**. Jaboticaba: Maria de Lourdes Bradel, 2013. p.81-90.

DUBEUX JÚNIOR, J.C.B.; SOLLENBERGER, L.E.; GASTON, L.A.; VENDRAMINI, J.M.B.; INTERRANTE, S.M.; STEWANT, R.L. Animal behavior and soil nutrient

redistribution in continuously stocked *Pensacola bahiagrass* pastures managed at different intensities. **Crop Science**, v.49, p.1503-1510, 2009.

EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL. **Diagnóstico das pastagens no Brasil**. Belém: Embrapa Amazônia Ambiental, 2014, 36p. (Embrapa Amazônia Ambiental. Documento, 402). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/102203/1/DOC-402.pdf>>. Acesso em: 01 abr 2016.

EUCLIDES, V.P.B.; VALLE, C.B.; MACEDO, M.C.M.; ALMEIDA, R.G.; MONTAGNER, D.B.; BARBOSA, R.A. Brazilian scientific progress in pasture research during the first decade of XXI century. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.151-168, 2010.

FERREIRA, L.C.B.; MACHADO FILHO, L.C.P.; HOETZEL, M.J.; LABARRÈRE, J.G. O efeito de diferentes disponibilidades de sombreamento na dispersão das fezes dos bovinos nas pastagens. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.6, p.137-146, 2011.

FIGUEIREDO, M.V.B.; MERGULHÃO, A.C.E.S.; SOBRAL, J.K.; LIRA JÚNIOR, M.A.; ARAÚJO, A.S.F. Biological nitrogen fixation: importance, associated diversity, and estimates. **Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances**, v.1, p.267-289, 2013.

FORMENTINI, E.A.; LÓSS, F.R.; BAYERL, M.P.; LOVATI, R.D.; BAPTISTI, E. **Cartilha sobre adubação verde e compostagem**. Vitória: INCAPER, 2008. 27p.

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant Soil**, v.321, p.35-59, 2009.

FREITAS, A.D.S.; SAMPAIO, E.V.S.B.; SANTOS, C.E.R.S.; FERNANDES, A.R. Biological nitrogen fixation in tree legumes of the Brazilian semi-arid Caatinga. **Journal of Arid Environments**, v.74, p.344-349, 2010.

FUSTEC, J.; LESUFFLEUR, F.; MAHIEU, S.; CLIQUET, J.B. Nitrogen rhizodeposition of legumes. **Sustainable Agriculture**, v.2, p.869-881, 2011.

GARRIDO, M.F.; CARDENAS, D.M.; BONILLA, R.R.; BALDANI, V.L. Effect of the edaphoclimatic factors and pasture species on the diversity of diazotrophic bacteria. **Pastos y Forrajes**, v.33, p.1-11, 2010.

GLICK, B.R. Introduction to plant growth-promoting bacteria. **Benficial Plant-Bacterial Interação**, v.1, p.1-28, 2015.

HAYDEN, H.L.; DRAKE, J.; IMHOF, M.; OXLEY, A.P.A.; NORNG, S.; MELE, P.M. The abundance of nitrogen cycle genes *amoA* and *nifH* depends on land-uses and soil types in South-Eastern Australia. **Soil Biology & Biochemistry**, v.42, p.1774-1783, 2010.

HEMPSON, G.P.; ARCHIBALD, S.; BOND, W.J.J.; ELLIS, R.P.; GRANT, C.C.; KRUGER, F.J.; KRUGER, L.M.; MOXLEY, C.; OWEN-SMITH, N.; PEEL, M.J.S.; SMIT, I.P.J.; VIXKERS, K.J. Ecology of grazing lawns in Africa. **Biological Reviews**, v.90, p.979-994, 2015.

HEWITT, D.K.L.; MILLS, G.; HAYES, F.; NORRIS, D.; COYLE, M.; WILKINSON, S.; DAVIES, W. N-fixation in legumes - as assessment of the potential thrat posed by ozone pollution. **Environmental Pollution**, v.208, p.909-918, 2016.

HOFFMAN, B.M.; LUKOYANOV, D.; YANG, Z.Y.; DEAN, D.R.; SEEFELDT, L.C. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. **Chemical Reviews**, v.114, p.1041-1062, 2014.

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

HUO, W.; ZHUANG, C.H.; CAO, Y.; PU, M.; YAO, H.; LOU, L.Q.; CAI, Q.S. Paclobutrazol and plant-growth promoting bacterial endophyte *Pantoea* sp. enhance copper tolerance of guinea grass (*Panicum maximum*) in hydroponic culture. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.34, p.139-150, 2012.

JANK, L.; BRAZ, T.G.S.; MARTUSCELLO, J.A. Gramíneas de clima tropical. In: REIS, R.A.; BERNARDES, T.F.; SIQUEIRA, G.R. (Ed.1). **Forragicultura: ciência tecnologia e gestão dos recursos forrageiros**. Jaboticaba: Maria de Lourdes Bradel, 2013. p.109-124.

KANDEL, S.L.; HERSCHBERGER, N.; KIM, S.H.; DORT, S.L. Diazotrophic endophytes of poplar and willow for growth promotion of rice plants in nitrogen-limited conditions. **Crop Science**, v.55, p.1765-1772, 2015.

KARKI, U.; GOODMAN, M.S. Microclimatic differences between mature loblolly-pine silvopasture ans open-pasture. **Agroforestry Systems**, v.89, p.319-325, 2015.

KELEMU, S.; FORY, P.; ZULETA, C.; RICAURTE, J.; RAO, I.; LASCANO, C. Detecting bacterial endophytes in tropical grasses of the *Brachiaria* genus and determining their role in improving plant growth. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p.965-976, 2011.

KIM, S.; LOWMAN, S.; HOU, G.; NOWAK, J.; FLINN, B.; MEI, C. Growth promotion and colonization of switch grass (*Panicum virgatum*) cv. Alamo by bacterial endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. **Biotechnology for Biofuels**, v.5, p.1-10, 2012.

KOBIYAMA, M.; MINELLA, J.P.G.; FABRIS, R. Áreas degradadas e sua recuperação. **Informe Agropecuário**, v.22, p.10-17, 2001.

LANGE, M.; HABEKOST, M.; EISENHAUER, N.; ROSCHER, C.; BESSLER, H.; ENGELS, C.; OELMANN, Y.; SCHEU, S.; WILCKE, W.; SCHULZE, E.D.; GLEIXNER, G. Biotic and abiotic properties mediating plant diversity effects on soil microbial communities in an experimental grassland. **Plant Diversity and Soil Microbial Communities**, v.9, p.1-9, 2014.

LEIS, C.M.; CHERUBINI, E.; RUVIANO, C.F.; SILVA, V.P.; LAMPERT, V.N.; SPIES, A.; SOARES, S.R. Carbon footprint of milk production in Brazil: a comparative case study. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, v.20, p.46-60, 2015.

LEVY-BOOTH, D.J.; PRESCOTT, C.E.; GRAYSTON, S.J. Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. **Soil biology and Biochemistry**, v.75, p.11-25, 2014.

LIMA, J.V.L.; WEBER, O.B.; CORREIA, D.; SOARES, M.A.; SENABIO, J.A. Endophytic bacteria in cacti native to a Brazilian semi-arid region. **Plant Soil**, v.389, p.25-33, 2015.

LIU, T.; NAN, Z.; HOU, F. Grazing intensity effects on soil nitrogen mineralization in semi-arid grassland on the Loess Plateau of northern China. **Nutrient Cycling Agroecosystems**, v.91, p.67-75, 2011.

LIU, X.L.; LU, Y.; LUO, M.; WU, H.; WANG, C.C. Isolating endophytic diazotrophic bacteria from three xerophilic gramineae grasses to determine their nitrogen fixation and plant growth-promoting. **Acta Agrestia Sicca**, v.4, p.412-418, 2012.

LOPES, M.N.; CÂNDIDO, M.J.D.; POMPEU, R.C.F.F.; SILVA, R.G.; NETO, L.B.M.; CARNEIRO, M.S.S. Tillering dynamics in massai grass fertilized with nitrogen and grazed by sheep. **Bioscience Journal**, v.32, p.446-454, 2016.

LOUAM, G.; LOPES, E.P.; FRUSTEC, J.; MARY, D.B.; VOISIN, A.S.; CARVALHO, P.C.F.; GASTAL, F. The amounts and dynamics of nitrogen transfer to grasses differ in alfalfa and White clover-based grass-legume mixtures as a result of rooting strategies and rhizodeposit quality. **Plant and Soil**, v.389, p.289-305, 2015.

MAGNANI, G.S.; DIDONET, C.M.; CRUZ, L.M.; PICHETH, C.F.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetic Molecular Research**, v.9, p.250-258, 2010.

MALUSÁ, E.; SAS-PASZT, L.; CIESIELSKA, J. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. **The Scientific World Journal**, v.101, p.201-213, 2012.

MARTUSCELLO, J.A.; JANK, L.; NETO, M.M.G.; LAURA, V.A.; CUNHA, D.N.F.V. Produção de gramíneas do gênero *Brachiaria* sob níveis de sombriamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.1183-1190, 2009.

MATSUMURA, E.E.; SECCO, V.A.; MOREIRA, R.S.; SANTOS, O.J.A.P.; HUNGRIA, M.; OLIVEIRA, A.L.M. Composition and activity of endophytic bacterial communities in field-grown maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Annals of Microbiology**, v.65, p.2187-2200, 2015.

MENDES, L.W.; TSAI, S.M.; NAVARRETE, A.A.; HOLLANDER, M.; VEEN, J.A.V.; KURAMAE, E.E. Soil-borne microbiome: linking diversity to function. **Microbial Ecology**, v.70, p.255-265, 2015.

MILANI, K.M.L.; SANTOS, O.J.A.P.; SILVA, M.; DIANA, L.; BARREIRA, B.; OLIVEIRA, A. Influência do meio de cultivo sobre a população e produção de exopolissacarídeos por *Azospirillum brasilense* Ab-V5. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.2, p.212-215, 2013.

MORAIS, R.F.; SOUZA, B.J.; LEITE, J.M.; SOARES, L.H.B.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. Elephant grass genotypes for bioenergy production by direct biomass combustion. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.133-140, 2009.

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

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

MUNROE, J.W.; ISAAC, M.E. N₂-fixing trees and the transfer of fixed-N for sustainable agroforestry: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v.34, p.417-427, 2014.

MURGUEITIO, E.; BARAHONA, R.; CHARÁ, J.D.; FLORES, M.X.; MAURICIO, R.M. MOLINA, J.J. The intensive silvopastoral systems in Latin America sustainable alternative to face climatic change in animal husbandry. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v.49, p.541-554, 2015.

MURPHY, C.A.; FOSTER, B.L.; GAO, C. Temporal dynamics in rhizosphere bacterial communities of three perennial grassland species. **Agronomy**, v.6, p.1-17, 2016.

NACKE, H.; THURMER, A.; WOLLHWERR, A.; WILL, C.; HODAC, L.; HEROLD, N.; SCHÖNING, I.; SCHRUMPF, M.; DANIEL, R. Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. **Plos One**, v.6, p.1700-1722, 2011.

NUNES, F.S.; RAIMONDI, A.C.; NIEDWIESKI, A.C. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**, v.26, p.872-879, 2003.

NYFELER, D.; HUGUENIN-ELIE, O.; SUTER, M.; FROSSARD, E.; LÜSCHER, A. Grass-legume mixtures can yield more nitrogen than legume pure stands due to mutual stimulation of nitrogen uptake from symbiotic and non-symbiotic sources. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.140, p.155-163, 2011.

OKUMURA, R.S.; MARIANO, D.C.; DALLACORT, R.; ALBUQUERQUE, A.N.; LOBATO, A.K.S.; GUEDES, E.M.S.; OLIVEIRA NETO, C.F.; CONCEIÇÃO, H.E.O.; ALVES, G.A.R. *Azospirillum*: a new and efficient alternative to biological nitrogen fixation in grass. **Journal of Food Agriculture & Environment**, v.11, p.1142-1146, 2013.

OLIVARES, J.; BEDMAR, E.J.; SANJUÁN, J. Biological nitrogen fixation in the context of global change. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.26, p.486-494, 2013.

OLIVEIRA, A.L.M.; COSTA, K.R.; FERREIRA, D.C.; MILANI, K.L.; SANTOS, O.J.A.P.; SILVA, M.B.; ZULUAGA, M.Y.A. Biodiversity of soil bacteria and its applications for a sustainable agriculture. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.3, p.56-77, 2014.

OLIVEIRA, F.C.; ROSA, M.J.; CAIXETA FILHO, J.V. Estimativa da oferta de fertilizantes como carga de retorno no ambiente portuário brasileiro entre 2005 e 2009. **Informações Econômicas**, v.40, p.45-43, 2010.

PACIULLO, D.S.C.; PIRES, M.F.A.; AROEIRA, L.J.M.; MORENZ, M.J.F.; MAURÍCIO, R.M.; GOMIDE, C.A.M.; SILVEIRA, S.R. Sward characteristics and performance of dairy cows in organic grass-legume pastures shaded by tropical trees. **The Animal Consortium**, v.8, p.1264-1271, 2014.

PANIZZON, J.P.; PITZ JÚNIOR, H.L.; KNAAK, N.; ZIEGLER, D.R.; RAMOS, R.C.; FIUZA, L.M. Bacteria-soil-plant interaction: this relationship to generate can inputs and new products for the food industry. **Rice Research: Open Access**, v.4, p.7-16, 2016.

PANKIEVICZ, V.C.S.; AMARAL, F.P.; SANTOS, K.F.D.N.; AGTUCA, B.; XU, Y.; SCHUELLER, M.J.; ARISI, A.C.M.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; STACEY, G.; FERRIERI, R. Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. **The Plant Journal**, v.81, p.907-919, 2015.

PEDROSA, F.O.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; AYUB, R.A.; COLAUTO, N.B.; FERNANDEZ, M.A.; FUNGANO, M.H.P.; GRISARD, E.C.; HUNGRIA, M.; MADEIRA, H.M.F.; NODARI, R.O.; OSAKU, C.A. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **Plos Genetis**, v.7, p.1-10, 2011.

PEGORARO, R.F.; SILVA, I.R.; NOVAIS, R.F.; BARROS, N.F.; FONSECA, S.; DAMBROZ, C.S. Estoques de carbono e nitrogênio nas frações da matéria orgânica em Argissolo sob eucalipto e pastagem. **Ciência Florestal**, v.21, p.261-273, 2011.

PEREIRA, C.E.; OLIVEIRA, J.A.; ROSA, M.C.M.; KIKUT, A.L.P. Armazenamento de sementes de braquiária peletizadas e tratadas com fungicida e inseticida. **Ciência Rural**, v.41, p.2060-2065, 2011.

PERIN, A.; SANTOS, R.H.S.; URQUIAGA, S.; GUERRA, J.G.M.; CECON, P.R. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolados e consorciado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.35-40, 2004.

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

PURI, A.; PADDA, K.P.; CHANWAY, C.P. Can a diazotrophic endophyte originally isolated from lodgepole pine colonize an agricultural crop (cotton) and promote its growth?. **Soil Biology & Biochemistry**, v.89, p.210-216, 2015.

RANA, A.; KABI, S.R.; VERMA, S.; ADAK, A.; PAL, M.; SHIVAY, Y.S.; PRASANNA, R.; NAIN, L. Prospecting plant growth promoting bacteria and cyanobacteria as options for enrichment of macro-and micronutrients in grains in rice-wheat cropping sequence. **Cogent Food & Agriculture**, v.1, p.1-16, 2015.

RANGJAROEN, C.; RERKASEM, B.; TEAUMROONG, N.; NOISANGIAM, R.; LUMYONG, S. Promoting plant growth in a comercial rice cultivar by endophytic diazotrophic bacteria isolated from rice landraces. **Annals of Microbiology**, v.65, p.253-266, 2015.

RASCHE, F.; KNAPP, D.; KAISER, C.; KORANDA, M.; KITZLER, B.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; RICHTER, A.; SESSITSCH, A. Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal communities in soils of a temperate beech forest. **Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology**, v.5, p.389-402, 2011.

RASHID, M.I.; MUJAWAR, L.H.; SHAHZAD, T.; ALMEELBI, T.; ISMAIL, I.M.I.; OVES, M. Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. **Microbiological Research**, v.183, p.26-41, 2016.

RASMUSSEN, J.; SOEGAARD, K.; PIRHOFER-WALZL, K. N²-fixation and residual N effect of four legume species and four companion grass species. **European Journal of Agronomy**, v.36, p.66-74, 2012.

REIS JÚNIOR, 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 Ciência do Solo**, v.32, p.1139-1146, 2008.

REIS JÚNIOR, F.B.; REIS, V.R.; TEIXEIRA, K.R.S. Restrição do 16S-23S DNA rintergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.431-438, 2006.

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

RICHARDSON, A.E.; BAREA, J.M.; MCNEILL, A.M.; PRIGENT-COMBARET, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant Soil**, v.321, p.321-339, 2009.

RIVERA, D.; OBANDO, M.; BARBOSA, H.; TAPIAS, D.R.; BUITRAGO, R.B. Evaluation of polymers for the liquid rhizobial formulation and their influence in the *Rhizobium*-Cowpea interaction. **Université Sciences Nantes**, v.19, p.265-275, 2014.

ROESCH, L.F.W.; CAMARGO, F.O.; SELBACH, P.A.; SÁ, E.S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ciência Rural**, v.35, p.1201-1204, 2005.

ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; JACCQUES, R.J.S. Biogeography of diazotrophic bacteria in soils. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v.26, p.1503-1058, 2010.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **The American Phytopathological Society**, v.19, p.827-837, 2006.

RUBEL, T.K.; PAUL, B.; WHITE, D.; RAO, I.M.; HOEK, R.V.D.; CASTRO, A.; BOVAL, M.; LERNER, A.; SCHNEIDER, L.; PETERS, M. LivestockPlus: forages, sustainable intensification, and food security in the tropics. **Royal Swedish Academy of Sciences**, v.44, p.685-693, 2015.

SAIKIA, S.P.; BORA, D.; GOSWAMI, A.; MUDOI K.D.; GOGOI A. A review on the role of *Azospirillum* in the yield improvement of non leguminous crops. **African Journal of Microbiology Research**, v.6, p.1085-1102, 2012.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological Nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v.111, p.743-767, 2013.

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; OROZCO-MOSQUEDA, M.C.; GLICK, B. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v.183, p.92-99, 2016.

SEIFFERT N.F. **Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria***. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 1980. 83p. (Embrapa-CNPGC. Boletim Técnico 1).

SILVA, A.A.O.; FELIPE, T.A.; BACH, E.E. Ação do *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento de plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV95033). **Revista Científica da América Latina y el Caribe, Espanã y Portugal**, v.3, p.29-35, 2004.

SILVA, H.M.S.S.; DUBEUX JÚNIOR, J.C.B.; SILEVEIRA, M.L.; FREITAS, E.V.; SANTOS, M.V.F.; LIRA, M.A. Stocking rate and nitrogen fertilization affect root decomposition of elephantgrass. **Agronomy Journal**, v.107, p.1331-1338, 2015.

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. **Archivos de Zootecnia**, v.59, p.21-30, 2010.

SILVA, M.C.P.; FIGUEIREDO, A.F.; ANDREOTE, F.D.; CARDOSO, E.J.B.N. Plant growth promoting bacteria in *Brachiaria brizantha*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.29, p.163-171, 2013.

SILVA NETO, S.P.; SILVA, R.G.; SANTOS, A.C.; GAMA, F.R.; GUERRA, M.S.S.; BRITO, M.J.D. Padrões espaciais de deposição de fezes por bovinos de corte em áreas de pastagem. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12, p.538-550, 2011.

SILVEIRA, M.F.; DIAS, A.M.O.; MENEZES, L.F.G.; MARTINELLO, C.; VONZ, D.; CAREGNATTO, N.E. Produção e qualidade de forragem de cornichão sobressemeado em diferentes densidades de semeadura em pastagem de estrela africana e azevém. **Bioscience Journal**, v.31, p.1801-1808, 2015.

SOARES FILHO, C.V. Recomendação de espécies e variedades de *Brachiaria* para diferentes condições. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 11., 1994, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1994. p.25-48.

SOCOLOW, R. Fitting on the Earth: challenges of carbon and nitrogen cycle to preserve the habitability of the planet. **Engineering**, v.2, p.21-32, 2016.

SOLORIO, F.J.; BASU, S.K.; SARABIA, L.; AYALA, A.; RAMIREZ, L.; AGUILAR, C.; ERALES, J.A.; KU, J.C.; WRIGHT, J. The potencial of silvopastoral systems for milk and meat organic production in the tropics. **Organic Farming for Sustainable Agriculture**, v.9, p.169-183, 2016.

SOUZA, L.M.; SCHLEMMER, F.; ALENCAR, P.M.; LOPES, A.A.C.; PASSOS, S.R.; XAVIER, G.R.; FERNANDES, M.F.; MENDES, I.C.; REIS JÚNIOR, F.B. Estrutura metabólica e genética de comunidades bacterianas em solo de cerrado sob diferentes manejos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, p.1-8, 2012.

SOUZA, R.F.B.; GUIMARÃES, V.F.; PINTO JÚNIOR, A.S.; COSTA, A.C.P.R.; OFFEMANN, L.C.; FUCHS, F.; COELHO, G.F. Physiological quality of corn seeds reinoculated with diazotrophic bacteria. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.14, p.148-153, 2015.

SOTT, K.J.; GOURLEY, C.J.P. Intensification, nitrogen use and recovery in grazing-based dairy systems. **Agricultural Systems**, v.144, p.101-112, 2016.

STEIN, L.Y.; KLOTZ, G.M. The nitrogen cycle. **Current Biology**, v.26, p.94-98, 2016.

STETS, M. I.; ALQUERES, S.M.C.; SOUZA, E.M.; PEDROZA, F.O.; SCHMID, M.; HARTMANN, A.; CRUZ, L.M. Quantification of *Azospirillum brasilense* FP2 bacteria in wheat roots by strain-specific quantitative PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.81, p.6700-6709, 2015.

SUYAL, D.C.; SONI, R.; SAI, S.; GOEL, R. Microbial Inoculants as Biofertilizer. **Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity**, v.1, p.311-318, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 1876p.

TAULÉ, C.; CASTILLO, A.; VILLAR, S.; OLIVARES, F.; BATTISTONI, F. Endophytic colonization of sugarcane (*Saccharum officinarum*) by the novel diazotrophs *Shinella* sp. UYSO₂₄ and *Enterobacter* sp UYSO₁₀. **Plant and Soil**, v.1, p.1-16, 2016.

TODA, F.E.; VASQUES, T.; ARAÚJO, M.F.F. Biomassa microbiana e sua correlação com a fertilidade de solos em diferentes distemas de cultivo. **Colloquium Agrariae**, v.6, p.1-7, 2010.

TORRES GONZÁLEZ, A.M.; MORTON, C.M. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Illinois, v.37, p.36-44, 2005.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. **Journal Bacteriol**, v.177, p.1414-1417, 1995.

VARGAS, R.S.; BATAIOLLI, R.; COSTA, P.B.; LISBOA, B.; PASSAGLIA, L.M.P.; BENEDUZI, A.; VARGAS, L.K. Microbial quality of soil from the Pampa biome in response to different grazing pressures. **Genetics and Molecular Biology**, v.38, p.205-212, 2015.

VENDRAMINI, J.M.B.; DUBEUX JÚNIOR, J.C.B.; SILVEIRA, M.L. Nutrient cycling in tropical pasture ecosystems. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.9, p.308-315, 2014.

VIDEIRA, S.S.; SILVA, M.C.P.; GALISA, P.S.; DIAS, A.C.F.; NISSINEN, R.; DIVAN, V.L.B.; ELSAS, J.D.V.; BALDANI, J.I.; SALLES, J.F. Culture-independent molecular approaches reveal a mostly unknown high diversity of active nitrogen-fixing bacteria associated with *Pennisetum purpureum* - a bioenergy crop. **Plant and Soil**, v.373, p.737-754, 2013.

WANG, J.; ZHANG, D.; ZHANG, L.; LI, J.; RAZA, W.; HUANG, Q.; SHEN, Q. Temporal variation of diazotrophic community abundance and structure in surface and subsoil under four fertilization regimes during a wheat growing season. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.216, p.116-124, 2016.

WEARNER, R.W. Isotope dilution as a method for measuring nitrogen transfer from forage legumes to grass. In: BECK, D.P.; MATERON, L.A. **Nitrogen fixation by legumes in mediterranean agriculture**. Netherlands: ICARDA, 1988. p.358-365.

WEMHEUER, F.; WEMHEUER, B.; KRETZSCHMAR, D.; PFEIFFER, B.; HERZOG, S.; DANIEL, R.; VIDAL, S. Impact of grassland management regimes on bacterial endophyte diversity differs with grass species. **Letters in Applied Microbiology**, v.62, p.323-329, 2016.

WESSÉN, E.; SÖDERSTRÖM, M.; STENBERG, M.; BRU, D.; HELLMAN, M.; WELSH, A.; THOMSEN, F.; KLEMEDTSON, L.; PHILIPPOT, L.; HALLIN, S. Spatial distribution of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across a 44-hectare farm related to ecosystem functioning. **The ISME Journal**, v.5, p.1213-1225, 2011.

YOON, V.; TIAN, G.; VESSEY, K.; MACFIE, S.M.; DANGI, O.P.; KUMER, A.K.; FORRO, T. Colonization efficiency of different sorghum genotypes by *Glucanacetobacter diazotrophicus*. **Plant and Soil**, v.389, p.243-256, 2015.

ZILLI, J.E.; SMIDERLE, O.J.; FERNANDES JÚNIOR, P.I. Eficiência agrônômica de diferentes formulações de inoculantes contendo *Bradyrhizobium* na cultura da soja em Roraima. **Revista Agroambiente On-line**, v.4, p.56-61, 2010.

ZHANG, H.Y.; YU, Q.; TRUMBORE, S.E. YANG, J.J.; HAN, X.G. Impacts of leguminous shrub encroachment on neighboring grass include transfer of fixed nitrogen. **Oecologia**, v.180, p.1213-1222, 2016.

CAPÍTULO 2

Germinação e crescimento de plantas de *Brachiaria decumbens* Stapf. inoculadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal, em dois ambientes

Resumo - Na busca por técnicas que aumentem a germinação, o crescimento inicial e a maior produção de gramíneas forrageiras, a inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas forrageiras torna-se uma alternativa viável para incrementar a produtividade dos sistemas pastoris. Neste sentido, objetivou-se avaliar o efeito da inoculação de bactérias promotoras de crescimento de planta isoladas de *B. decumbens* Stapf. e *B. humidicola* (Rendle) Schweick. sobre a germinação, emergência, crescimento e produção de plantas de *B. decumbens* cultivar Basilisk, bem como, verificar a influência da adição dos co-inóculos na comunidade bacteriana indígena do solo. Foram conduzidos dois experimentos na Unidade Acadêmica de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco, ambos com delineamento experimental inteiramente casualizado. O experimento 1 realizado em câmara de germinação, com 25 tratamentos, sendo 24 inóculos bacterianos, 12 isolados de cada espécie vegetal *B. decumbens* Stapf. e *B. humidicola* (Rendle) Schweick. e a testemunha. As variáveis analisadas foram percentual de sementes germinadas aos sete dias pós semeadura, índice de velocidade de germinação, número de pelos absorventes e de plúmulas por plântula; comprimento de raiz primária, hipocótilo e total de plântula, e massa seca de plântula. O experimento 2, realizado em casa de vegetação, comparou cinco co-inoculações (MIXs), o tratamento com adubação química e a testemunha sem co-inóculo e sem adubação. Os MIXs foram formulados levando em consideração as espécies vegetais de onde as bactérias foram detectadas e isoladas, exceto o MIX 1 composto por isolados que obtiveram destaque em teste de germinação (experimento 1). A promoção do crescimento vegetal foi analisada em diferentes momentos do desenvolvimento vegetal, na emergência, no crescimento inicial das plântulas aos 21 dias após a semeadura e na fase vegetativa em três ciclos de corte, com intervalo entre eles de 35 dias. Além da promoção de crescimento verificou-se a influência da adição de co-inóculos na comunidade bacteriana indígena do solo aos 21 dias após a semeadura de sementes co-inoculadas. As variáveis analisadas na fase de emergência foram o índice de velocidade de emergência e percentual de sementes germinadas ao fim do período experimental. Para avaliar o crescimento inicial das plântulas as variáveis foram número de plúmulas por plântula, altura de plântula, diâmetro de pseudocolmo a cinco centímetros do solo, área foliar da plúmula primária, intensidade do verde das plúmulas primárias e massa seca de parte aérea por plântula. Na fase vegetativa foram avaliadas altura média de planta, número de folhas e de perfilhos, área foliar, intensidade de verde da folha, massa de forragem, comprimento e massa seca de raiz, nitrogênio total e percentual de nitrogênio acrescido via

fixação biológica na parte aérea e raiz. Em câmara de germinação observou-se que houve incrementos da inoculação nas características de germinação e crescimento inicial de plantas de *B. decumbens* cultivar Basilisk frente a testemunha. Em casa de vegetação os MIXs elevaram a germinação de sementes, bem como, contribuíram para um maior crescimento da planta aos 21 dias após a semeadura e na fase vegetativa. Os processos de co-inoculação e a adubação química alteraram a comunidade bacteriana rizosférica no solo aos 21 dias após a semeadura. Os tratamentos com bacterianas homologas a planta inoculada e com maiores produções de ácido indol acético tiveram destaque, com aumento nas características de germinação e a promoção do crescimento do vegetal. Estudos futuros em ambiente de campo e envolvendo outros componentes do sistema pastoril são necessários, visando a formulação de um produto com menores impactos ambientais e de menor custo para o produtor.

Palavras-chave: bactérias homologas, colonização bacteriana, crescimento vegetal, interação bactéria planta, gramínea forrageira, rizobactérias indígenas de solo

Germination and growth of *Brachiaria decumbens* Stapf. inoculated with bacteria that promote plant growth in two environments

Abstract - In the search for techniques that increase germination, initial growth and increased production of forage grasses, inoculation of growth promoting bacteria in forages it becomes a viable alternative to increase the productivity of pastoral systems. In this sense, the objective was to evaluate the effect of inoculation of bacteria that promote plant growth isolated from *B. decumbens* Stapf. and *B. humidicola* (Rendle) Schweick. on germination, emergence, growth and production plants of *B. decumbens* cv Basilisk as well, check the influence of the addition of co-inoculants in the indigenous bacterial community in the soil. Two experiments were conducted in UFRPE-UAG, both *experimental design was completely randomized*. The experiment 1 was conducted in a growth chamber with 25 treatments, 24 bacterial inoculum, 12 isolates of each species *B. decumbens* Stapf. and *B. humidicola* (Rendle) Schweick. and the control treatment The variables analyzed were: percentage of seeds germinated seven days after sowing, germination speed index, the number of absorbent hair and plumule per plant, primary root length, hypocotyls and total seedling, and seedling dry weight. Experiment 2 was conducted in a greenhouse, five co-inoculations (MIXs) compared, treatment with chemical fertilizer and control without co-inoculum and without fertilization. The MIXs were formulated taking into account the species from which the bacteria were detected and isolated except the MIX 1 composed of isolates obtained featured germination test (experiment 1). The plant growth promoting was analyzed at different times of plant development: seedling emergence, early growth at 21 days after sowing and vegetative stage in three cutting cycles, with intervals of between 35 days. In addition to the plant growth promoting was verified the influence of the addition of the co-inoculant to indigenous soil bacterial community at 21 days after sowing co-inoculated seeds. The variables analyzed in the emergency stage were: emergence speed index and percentage of seeds germinated at the end of the trial period. To evaluate the initial seedling growth variables were: number of plumule per plant, seedling height, pseudoculm diameter at five centimeters above soil, leaf area of primary plumule, amount of green primary plumule and dry mass of aerial part per plant. In the vegetative stage were evaluated: average plant height, number of leaves and tillers, leaf area, green intensity on leaf, herbage mass, length and root dry weight, total nitrogen and nitrogen percentage increased via fixation in aerial part and root. In growth chamber it was observed that were increases in the initial inoculation germination

and growth characteristics of plants to *B. decumbens* cv Basilisk in relation to control treatment. In the greenhouse the MIXs increased seed germination and contributed to further growth of the plant at 21 days after sowing and vegetative stage. The co-inoculation processes and chemical fertilization altered the rhizospheric bacterial community in the soil at 21 days after sowing. Treatments with homologous bacterial the inoculated plant and higher indole acetic acid production stood out, with an increase in germination characteristics and the promotion of plant growth. Future studies in this field and other components of the pastoral system are necessary, aimed at the formulation of a product with less environmental impact and lower cost to the producer.

Key words: bacterial colonization, forage grass, homologous bacteria, indigenous soil, rhizobacteria, plant bacteria interaction, plant growth

INTRODUÇÃO

Mundialmente, as pastagens constituem o meio mais prático e econômico para alimentar o gado (Auld et al., 2016; Knaus, 2016). No Brasil, as vastidões de terra e as condições climáticas favoráveis potencializam a criação de animais em sistemas de produção a pasto (Lossau et al., 2015; Cardoso et al., 2016). Contudo, o sucesso da atividade pecuária extensiva pode ser afetado pela qualidade do pasto e sua produção de matéria seca de forragem, consequentemente interferindo no desempenho animal e na capacidade de suporte das pastagens (Casasús et al., 2012; Sollenberger et al., 2013).

Dos 200 milhões de hectares de pastagens presentes no território brasileiro (EMBRAPA, 2014), elevado percentual das áreas cultivadas são formadas com gramíneas do gênero *Brachiaria* spp. (= *Urochloa* spp.) e se encontram com algum grau de degradação (Roa-Fuentes et al., 2015). Vários fatores contribuem para esta degradação, entre estes, a inadequação das espécies forrageiras às condições locais que interferem no estabelecimento e permanência do vegetal, a reduzida taxa de germinação de sementes proporcionada pela qualidade nem sempre satisfatória e dormência elevada (Pereira et al., 2011), e especialmente a perda da fertilidade do solo com a extração de nutrientes via produtos de origem animal e lixiviação (Oliveira et al., 2013; Dias-Filho, 2015). A redução na disponibilidade de nitrogênio (N) é o fator mais limitante para o desenvolvimento das pastagens tropicais e o ganho do peso animal (Hungria et al., 2013).

A elevada dinâmica no solo apresentada pelos fertilizantes nitrogenados, bem como o seu potencial poluidor e o elevado custo, faz necessária a busca de alternativas viáveis que minimizem a aplicação destes nutrientes no solo e prolongue sua disponibilidade para a planta (Hungria et al., 2016). No intuito de disponibilizar o N em forma contínua ao vegetal e proporcionar efeitos benéficos na germinação de sementes, emergência e crescimento vegetal

(Figueiredo et al., 2010), a utilização de bactérias na forma de inóculo tem ganhado destaque (Bashan et al., 2014). As bactérias inoculadas podem apresentar diferentes atividades bioquímicas que influenciam no crescimento e desenvolvimento dos vegetais, tais como, a fixação de N atmosférico (diazotróficas), produção de fitohormônios e solubilização de fosfato inorgânico (Silva et al., 2013; Araújo et al., 2014), sendo denominadas bactérias promotoras de crescimento de planta (BPCP) (Andreote et al., 2014).

Embora as inoculações simples, uma única espécie de micro-organismo por inóculo, possam proporcionar um maior crescimento vegetal, a co-inoculação, uso de mais de uma espécie de micro-organismo por inóculo (MIX), visa auxiliar a sobrevivência da população microbiana inoculada no solo e ou planta (Joe et al., 2009), elevando a probabilidade de sucesso, superando os possíveis efeitos positivos obtidos quando o micro-organismo é utilizado de forma isolada (Sánchez et al., 2014). Os efeitos benéficos das BPCP podem sofrer influência do genótipo do vegetal onde será inoculada, como também da composição das comunidades microbianas associadas devido a processos metabólicos específicos, além das condições ambientais (Philippot et al., 2013; Murphy et al., 2016; Wemheuer et al., 2016) e do genótipo da bactéria utilizada (Araújo et al., 2012).

A inoculação de bactérias isoladas da espécie vegetal ou cultivar específico que se deseja inocular (bactérias homologas), possivelmente possibilita a obtenção de resultados favoráveis, devido a adaptação do micro-organismo às condições bióticas do vegetal, facilitando a colonização frente a comunidade microbiota indígena presente na planta ou no solo (Sumner, 1990; Bashan et al., 2014). Explorar os benefícios que vários micro-organismos podem fornecer ao vegetal e ao meio ambiente quando inoculados torna-se de fundamental importância em programas de desenvolvimento e recuperação de pastagem (Vogel et al., 2014). Neste aspecto, objetivou-se avaliar o efeito da inoculação de BPCP isoladas de *B. decumbens*

Stapf. e *B. humidicola* (Rendle) Schweick. sobre a germinação, emergência, crescimento e produção de plantas de *B. decumbens* cultivar Basilisk, bem como, verificar a influência da adição dos co-inóculos na comunidade bacteriana indígena do solo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos, ambos na Unidade Acadêmica de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco, um conduzido em câmara de germinação (experimento 1) e outro em casa de vegetação (experimento 2). Utilizou-se sementes comerciais de *B. decumbens* cultivar Basilisk, com valor cultural de 50%, e 24 bactérias diazotróficas pertencentes à coleção de culturas microbianas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana, 12 bactérias isoladas de cada espécie vegetal, *B. decumbens* Stapf. e *B. humidicola* (Rendle) Schweick., de diferentes nichos de colonização, endofítico de raiz e rizosfera. Essas bactérias foram escolhidas por possuírem potencial biotecnológico, sendo positivas para solubilização de fosfato inorgânico, produção da molécula *quorum sensing*, enzimas extracelulares (celulase, pectinase e amilase) e do fitohormônio ácido indol acético (AIA) (Tabela 1), conforme Oliveira (2012).

Tabela 1. Caracterização de origem e potencial biotecnológico de isolados bacterianos diazotróficos inoculados em sementes de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk

Código do isolado	Gênero bacteriano*	QS	Enzimas (IE)				ISP	AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
			CE	P-5	P-8	AM		CLT	SLT
Isolados de <i>Brachiaria decumbens</i> Stapf. no nicho Endofítico de Raiz									
UAGB68	-	+	0,000	0,000	4,254	3,633	0,000	66,533	0,000
UAGB69	<i>Enterobacter</i>	-	0,000	0,000	4,736	0,000	0,000	162,100	0,000
UAGB70	<i>Microbacterium</i>	-	0,000	0,000	7,333	4,577	0,000	3,610	0,000
UAGB154	<i>Klebsiella</i>	-	0,000	0,000	1,092	0,000	2,056	100,080	14,644
UAGB156	<i>Klebsiella</i>	+	0,000	0,000	1,177	0,000	1,374	67,177	20,800
UAGB167	<i>Rhizobium</i>	+	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	138,641	15,940
Isolados de <i>Brachiaria decumbens</i> Stapf. no nicho Rizosfera									
UAGB71	<i>Sinomonas</i>	-	0,000	4,003	3,764	2,765	0,000	113,670	0,000
UAGB80	<i>Sphingomonas</i>	-	0,000	0,000	1,869	1,622	2,037	5,844	0,000
UAGB96	-	+	0,000	3,047	1,638	0,000	0,000	0,000	0,000
UAGB139	<i>Burkholderia</i>	+	0,000	0,000	2,988	0,000	5,484	4,722	2,533
UAGB147	<i>Rhizobium</i>	+	0,000	4,764	3,742	0,000	4,262	10,555	0,000
UAGB150	<i>Rhizobium</i>	-	1,038	6,275	4,394	2,477	3,155	5,033	3,999

*: Dados do sequenciamento em anexo; +: Positivos para a característica avaliada; -: Negativo para característica avaliada; QS: Produção da molécula *quorum sensing*; IE: Índice Enzimático (relação diâmetro do halo de hidrolise e o diâmetro da colônia bacteriana); CE: Produção de celulase; P-5: Produção de pectinase a pH 5,0; P-8: Produção de pectinase a pH 8,0; AM: Produção de amilase; ISP: Índice de solubilização do fosfato inorgânico; AIA: de ácido indol acético; CLT: Produção de AIA em meio de cultura com fornecimento do aminoácido precursor L-Triptofano; SLT: Produção de AIA sem L-Triptofano.

Fonte: Oliveira (2012)

Continuação tabela 1...

Código do isolado	Gênero bacteriano*	QS	Enzimas (IE)				ISP	AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
			CE	P-5	P-8	AM		CLT	SLT
Isolados de <i>B. humidicola</i> (Rendle) Schweick. no nicho Endofítico de Raiz									
UAGB01	<i>Pantoea</i>	+	0,000	0,000	4,256	1,807	3,827	35,521	5,469
UAGB93	<i>Burkholderia</i>	+	0,000	0,000	0,000	0,000	4,120	56,483	0,000
UAGB94	<i>Burkholderia</i>	+	0,000	0,000	0,000	0,000	4,565	62,999	0,000
UAGB105	<i>Burkholderia</i>	+	1,685	0,000	0,000	0,000	3,050	51,785	23,877
UAGB106	<i>Burkholderia</i>	+	1,653	0,000	0,000	0,000	3,493	49,231	26,333
UAGB110	<i>Enterobacter</i>	+	6,715	0,000	0,000	0,000	3,733	2,090	0,855
Isolados de <i>B. humidicola</i> (Rendle) Schweick. no nicho Rizosfera									
UAGB10	<i>Bacillus</i>	+	1,200	0,000	4,864	1,090	0,000	13,482	9,211
UAGB39	-	+	0,000	0,000	4,065	1,300	0,000	47,380	0,000
UAGB60	<i>Klebsiella</i>	+	0,000	0,000	2,299	2,204	0,000	4,982	0,000
UAGB119	<i>Enterobacter</i>	+	1,238	0,000	0,000	0,000	2,793	3,733	15,600
UAGB128	<i>Ralstonia</i>	-	0,000	0,000	0,000	0,000	3,050	10,980	8,877
UAGB132	-	+	3,300	0,000	0,000	0,000	4,610	1,369	9,933

*: Dados do sequenciamento em anexo; +: Positivos para a característica avaliada; -: Negativo para característica avaliada; QS: Produção da molécula *quorum sensing*; IE: Índice Enzimático (relação diâmetro do halo de hidrolise e o diâmetro da colônia bacteriana); CE: Produção de celulase; P-5: Produção de pectinase a pH 5,0; P-8: Produção de pectinase a pH 8,0; AM: Produção de amilase; ISP: Índice de solubilização do fosfato inorgânico; AIA: de ácido indol acético; CLT: Produção de AIA em meio de cultura com fornecimento do aminoácido precursor L-Triptofano; SLT: Produção de AIA sem L-Triptofano.

Fonte: Oliveira (2012)

O experimento 1 foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 25 tratamentos, 24 inoculações e a testemunha sem inóculo, com quatro repetições de 50 sementes cada. Para obtenção dos inóculos, colônias puras de bactérias foram incubadas em meio de cultura líquido, TSA 10% (*Trypcase Soy Agar*) acrescido de 0,05% de triptofano. Em seguida, as culturas bacterianas foram diluídas em solução tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e a densidade óptica ajustada para 0,095, em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 630 nm, correspondendo a 10^6 unidades formadoras de colônia mL⁻¹. As sementes foram desinfetadas superficialmente com solução de NaOCl 1% por 5 min, lavadas em água destilada, e imersas no inóculo por 30 min sob leve agitação (Lima, 2012).

A semeadura foi realizada em substrato de papel tipo *Germitest* umedecido com água destilada 2,5 vezes o seu peso e mantida em câmara de germinação, à temperatura de 25 ± 5 °C, sob fotoperíodo de 12 h, durante 21 dias. A contagem de sementes germinadas foi realizada diariamente, tendo início ao sétimo dia após a semeadura (vigor de germinação), seguindo a recomendação da Regra para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

A determinação do índice de velocidade de germinação (IVG) ocorreu como proposto por Maguire (1962). Para avaliação da promoção de crescimento vegetal, ao término do experimento foram analisadas as seguintes variáveis: número de pelos absorventes, considerando apenas os pelos com comprimento igual ou superior a 3 mm; número de plúmulas; comprimento de raiz primária, distância entre o cotilédone e o fim da raiz primária estendida; comprimento de hipocótilo, distância entre o cotilédone e a base da primeira plúmula em plantas estendidas, e o comprimento total da plântula estendida. Para determinação do peso da massa seca de plântula, as amostras foram secas em estufa a 55 °C por 72 h.

No experimento 2 o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com sete tratamentos, sendo cinco MIXs (Tabela 2), um tratamento que recebeu apenas adubação química e a testemunha sem inóculo e sem adubação química. Para formulação dos MIXs,

levou-se em consideração as espécies vegetais onde as bactérias foram detectadas e isoladas, abrangendo ambos os nichos de colonização (Tabela 1), exceto o MIX 1, que foi composto por isolados que se destacaram no experimento 1. A promoção do crescimento vegetal foi analisada em diferentes momentos do desenvolvimento vegetal, na emergência, no crescimento inicial das plântulas aos 21 dias após a semeadura e na fase vegetativa.

Tabela 2. Agrupamentos dos isolados bacterianos para formulação dos co-inóculos utilizados em sementes de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk

Co-inóculos	Isolados bacterianos	Espécies vegetais de origem dos isolados bacterianos
MIX 1	Isolados diferenciados*	-----
MIX 2	UAGB10 - UAGB39 - UAGB60 UAGB94 - UAGB106 - UAGB132	<i>B. humidicola</i> (Rendle) Schweick.
MIX 3	UAGB68 - UAGB71 - UAGB80 UAGB96 - UAGB147 - UAGB167	<i>B. decumbens</i> Stapf.
MIX 4	UAGB01 - UAGB93 - UAGB105 UAGB110 - UAGB119 - UAGB128	<i>B. humidicola</i> (Rendle) Schweick.
MIX 5	UAGB69 - UAGB70 - UAGB139 UAGB150 - UAGB154 - UAGB156	<i>B. decumbens</i> Stapf.

* Isolados bacterianos que se destacaram no Experimento 1.

Inicialmente, no dia zero, em cada vaso 15 sementes co-inoculadas com BPCP foram semeadas, no 5º dia após a semeadura iniciou-se as avaliações de emergência, no 21º dia após a semeadura ocorreu o fim da avaliação da emergência e a avaliação das características de crescimento inicial, além do desbaste, permanecendo apenas duas plantas por vaso. No 35º dia após a semeadura, tempo zero do experimento da fase vegetativa, ocorreu o corte de uniformização, deixando as plantas a 10 cm acima do solo, no 70º dia após a semeadura o primeiro corte de avaliação, no 105º e 140º dias após a semeadura o segundo e terceiro corte de avaliação, respectivamente.

Para avaliação da emergência e crescimento inicial das plântulas, as unidades experimentais consistiram de vasos de 7,5 L com 15 sementes cada, todos os tratamentos com 30 repetições. Na fase vegetativa as unidades experimentais foram vasos de 7,5 L com duas plantas de braquiária cada, nesta fase foram realizados três ciclos de corte com intervalos entre eles de 35 dias (70°, 105° e 140° dias após a semeadura). A cada ciclo as plantas eram rebaixadas a 10 cm de altura da superfície do solo, e 10 vasos eram avaliados por tratamento. Cabe salientar que os vasos avaliados foram escolhidos aleatoriamente. Nos vasos não avaliados eram realizados os desbastes a 10 cm de altura da superfície do solo, adubados no tratamento com adubação e reinoculados nos tratamentos com inoculação. Os 10 vasos avaliados por ciclo de corte eram descartados, para avaliação do sistema radicular.

O solo utilizado é classificado como Latosso Amarelo (EMBRAPA, 2006), tendo a análise química indicado: pH 5,22; 5,22 mg dm³ de P; 0,24 cmol_c dm³ de K; 4,70 cmol_c dm³ de Ca; 2,80 cmol_c dm³ de Mg; 0,30 cmol_c dm³ de Al³⁺; 0,65 cmol_c dm³ de H+Al. Inicialmente realizou-se a correção do solo de todo o experimento pelo método de saturação de base. Para o tratamento com adubação química utilizou-se NPK na formulação 30-60-30. O superfosfato triplo e o cloreto de potássio para adubação em fundação e o sulfato de amônio parcelado em três aplicações, sendo a primeira aplicação após o corte de uniformização e nos dias 70° e 105° após a semeadura. Todas as adubações com base nas Recomendações de Adubação para o Estado de Pernambuco (Cavalcanti, 2008). Para controle da umidade dos vasos, determinou-se sua capacidade de pote, sendo a reposição da água realizada por pesagem diária dos vasos, repondo-se a água evapotranspirada.

O cultivo dos isolados bacterianos, o preparo dos inóculos individuais por bactéria e a desinfecção superficial das sementes foi realizada de maneira semelhante ao experimento 1. Ressalta-se, que as formulações dos co-inóculos ocorreram a partir de culturas individuais com posterior mistura e homogeneização conforme a tabela 2, seguido da imersão das sementes no

co-inóculo por 30 min sob agitação e posterior semeadura, a 2 cm de profundidade. Após cobertura das sementes, foi adicionado 0,05 L do co-inóculo ao solo, fato que se repetiu após o corte de uniformização e nos dias 70° e 105° após a semeadura.

Para emergência e crescimento inicial de plântulas as variáveis avaliadas foram, primeira contagem de plântulas emergidas, ocorrida no 5° dia após a semeadura, considerando-se emergida as plântulas que expuseram a primeira plúmula. O índice de velocidade de emergência (IVE) foi determinado como proposto por Maguire (1962), e no 21° dia após a semeadura, o percentual de sementes germinadas foi calculado, contabilizando-se o número de plântulas por vaso. Também ao final do ensaio foram realizadas as avaliações relativas ao efeito da promoção do crescimento vegetal nas plântulas com as variáveis, número de plúmulas por plântula, altura de plântula utilizando régua graduada, onde foi considerada a distância entre o solo até a ponta da plúmula mais alta não estendida, e o diâmetro do pseudocolmo a 5 cm do solo, utilizando paquímetro digital.

A estimativa da área foliar da plúmula primária foi realizada segundo as recomendações de Bianco et al. (2000), levando-se em consideração os parâmetros dimensionais, largura e comprimento da plúmula, as medições foram realizadas com paquímetro digital. A intensidade do verde das plúmulas foi avaliada utilizando-se o medidor portátil SPAD-502 (*Soil Plant Analysis Development*), clorofilômetro, mensurando-se as plúmulas primárias na porção intermediária. A determinação da massa seca da parte aérea das plântulas, ocorreu com corte rente ao solo e o material vegetal seco em estufa, a 55 °C por 72 h.

Para análise da comunidade bacteriana total presente no solo rizosférico no 21° dia após a semeadura, as amostras de solo rizosférico foram coletadas de cada vaso, posteriormente homogeneizada a cada 10 vasos formando uma amostra composta, totalizando três amostras compostas por tratamento. Antes da implantação do experimento três amostras do solo foram coletadas (solo zero). Após as coletas, os solos tiveram seus DNAs total extraídos com Power

Soil DNA kit (MoBio; EUA), seguindo com a avaliação de integridade por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1x (40mM de Tris-acetato; 1 MM de EDTA).

Na amplificação do gene 16s rDNA utilizou-se os *primers* PO27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e R1387 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3') e a reação de amplificação seguindo as recomendações de Heuer et al. (1997). O produto da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão 1x TAE e corado com *Blue greenloading*.

Para a análise do polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) os produtos da PCR do gene 16s rDNA foram digeridos com as enzimas de restrição HindIII, HaeIII e MboI. Para cada enzima foram preparadas misturas individuais contendo 7 µL do produto da PCR, 10 X do tampão específico para cada enzima; 2 U da enzima de restrição e 2,7 µL de água ultrapura. As digestões foram realizadas a 37 °C por 10 horas. Os produtos da digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,5% em tampão 1x TAE e corado com *Blue greenloading*.

Na fase vegetativa as plantas foram analisadas para características morfológicas e fisiológicas e produção. Na parte aérea das plantas, mensurou-se a altura média de planta por vaso com trena graduada, considerando a distância desde a superfície do solo até a folha mais alta não estendida. Posteriormente, contabilizou-se o número de perfilhos e folhas vivas por vaso. Três folhas totalmente expandidas por vaso tiveram seus comprimentos desde a ponta até a lígula e larguras no terço médio das lâminas foliares mensurados, os dados biométricos foram utilizados para estimativa da área foliar segundo as recomendações de Bianco et al. (2000). Nas mesmas folhas, no terço médio das lâminas foliares foi avaliado a intensidade de verde das folhas, utilizando o medidor portátil SPAD-502 (*Soil Plant Analysis Development*), clorofilômetro.

Para determinação da produção de massa de forragem acima de 10 cm do solo por vaso, as amostras foram cortadas e secas em estufa de circulação de ar forçada, a 55° C por 72 h.

Nas avaliações do sistema radicular, mensurou-se o comprimento da maior raiz, após o sistema radicular ser lavado e desembaraçado. A determinação da massa seca da raiz ocorreu semelhantemente a massa de forragem da parte aérea.

Amostras da parte aérea e raiz por ciclo de corte foram secas, moídas e analisadas quanto às concentrações de N total e abundância de átomos de ^{15}N como descrito por Trivelin (1973). A expressão para o cálculo do percentual de N da planta derivado do ar foi estimado pela equação descrita por (Shearer & Kohl, 1986):

$$\%N_{\text{da}} = \left[\frac{\delta^{15}\text{N}(\text{planta referência}) - \delta^{15}\text{N}(\text{planta fixadora})}{\delta^{15}\text{N}(\text{planta referência}) - B} \right] \times 100$$

Em que: %N_{da} é o percentual de N da planta fixadora que é derivado do ar, $\delta^{15}\text{N}$ (referência) é a abundância de ^{15}N da planta controle não fixadora, $\delta^{15}\text{N}$ (fixadora) é a abundância de ^{15}N da planta fixadora e B (também chamado valor B) é o valor de $\delta^{15}\text{N}$ para plantas fixadoras cultivadas na ausência de N.

Cabe salientar que a planta referência utilizada foi a *B. decumbens* do tratamento testemunha sem inóculo e sem adubação, semelhante aos trabalhos de Freitas et al. (2010) e Schultz et al. (2012), assim possibilitando inferir o percentual de N da fixação biológica acrescido pelas co-inoculações, e considerando zero quando inferior a planta referência. Para o valor B da equação, valor de ^{15}N para plantas fixadoras cultivadas na ausência de N, considerou-se zero, valor este comumente utilizado na avaliação em gramíneas (Chalk et al., 2016).

No experimento 1 utilizando o programa estatístico SISVAR 5.1 (Ferreira, 2011) visando contrastar os efeitos dos tratamentos inoculados com a testemunha e os inoculados isolados da *B. decumbens* com os inoculados isolados de *B. humidicola*, foram realizados contrastes ortogonais utilizando os testes t e F a 5%. A comparação das médias de todos os

tratamentos em relação a testemunha foi realizada pelo teste de Dunnett a 5%, os tratamentos que se sobressaíram foram comparados entre si, para cada variável, pelo teste de Tukey a 1%.

No experimento 2 para as características de emergência e crescimento inicial das plântulas os dados foram submetidos ao teste de Tukey a 5% por meio do software estatístico SISVAR 5.1. A diversidade genética da comunidade bacteriana rizosférica foi avaliada pela análise de componente principal e a significância nas separações das comunidades bacterianas determinadas pela análise de similaridade de ANOSIM, ambos utilizando o software PAST 1.9 (Hammer et al., 2000). A análise de ANOSIM observa diferenças significativas com base em algoritmos de distâncias médias entre grupos gerando correlação R. Valores $R > 0,75$ indica que os grupos se encontram bem separados, para $0,25 > R < 0,75$ os grupos separam-se, porém apresentam sobreposições e, valores $R < 0,25$ não existe separação entre os grupos (Clarke & Gorley, 2001).

Na fase vegetativa os dados foram analisados em esquema fatorial 7 x 3, sete tratamentos: cinco co-inoculações, uma adubação e a testemunha sem inóculo e sem adubação, e três ciclos de corte, 70°, 105° e 140° dias após a semeadura, aplicando-se o teste de Tukey a 5% para as médias no programa estatístico SISVAR 5.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em condições de câmara de germinação (experimento 1) o grupo de bactérias inoculadas promoveram o aumento na germinação e o crescimento de plântulas de *B. decumbens* cultivar Basilisk, frente ao tratamento Testemunha (Tabela 3), tendo o grupo de bactérias homologas a espécie de braquiária inoculada, maiores incrementos nas variáveis primeira contagem de sementes, IVG, número de pelos absorventes, comprimento de raiz primária, hipocótilo e plântula total (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação entre grupos de médias por contrastes ortogonais para as características de germinação e crescimento inicial de plântulas de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk, após a inoculação em sementes com bactérias promotoras de crescimento vegetal

Média	PC	IVG	NRS	NP	Comprimento			Massa seca
					RP	Hipocótilo	Total	
	-- % --				----- cm -----			-- g --
IBD	38,916	2,939	7,135	1,279	4,336	7,376	11,368	0,006
IBH	33,541	2,580	6,948	1,291	3,944	7,285	10,694	0,011
Inoculados	36,229	2,760	7,041	1,285	4,140	7,330	11,031	0,009
Testemunha	22,500	1,971	2,885	0,706	3,878	3,728	5,767	0,006
Geral	35,680	2,728	6,875	1,262	4,129	7,186	10,820	0,009
Inoculados vs Testemunhas								
Teste t	2,575*	2,079*	4,191*	4,452*	0,677*	5,796*	4,267*	0,527*
Teste F	6,633*	4,321*	17,566*	19,817*	0,458*	33,595*	18,208*	0,278*
Isolados inoculados de <i>B. decumbens</i> vs Isolados inoculados de <i>B. humidicola</i>								
Teste t	2,497*	2,370*	0,475*	-0,164 ^{ns}	2,104*	0,366*	1,318*	-2,810 ^{ns}
Teste F	6,237*	5,616*	0,225*	0,270 ^{ns}	4,428*	0,134*	1,737*	0,079 ^{ns}

PC: Primeira contagem de sementes germinadas; IVG: Índice de velocidade de germinação; NRS: Número de pelos absorventes; NP: Número de plúmulas; RP: Comprimento de raiz primária; IBD: Média dos inoculados isolados de *B. decumbens*; IBH: Média dos inoculados isolados de *B. humidicola*; ^{ns}: Não Significativo; *: Significativo a 5% de probabilidade.

Para a primeira contagem de sementes germinadas e o IVG em condições de câmara de germinação, 8,3% e 20,8% dos inóculos destacaram-se em relação a tratamento Testemunha (Tabela 4). Dentro de cada variável entre os inóculos com destaque não foram observadas diferenças estatísticas (Tabela 5). Com os tratamentos inoculados com as bactérias *Klebsiella* (UAGB154) e *Rhizobium* (UAGB167) proporcionando os maiores incrementos em relação a testemunha, com 108,8% e 80,2% para características de primeira contagem de sementes germinadas e IVG, respectivamente. Oliveira et al. (2009) enfatizam a importância do elevado vigor das sementes como forma de obter germinação uniforme e conseqüentemente um maior IVG.

Tabela 4. Características de germinação e crescimento inicial de plântulas de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk, após a inoculação em sementes de bactérias com potencial biotecnológico, com permanência de 21 dias em câmara de germinação a temperatura de 25±5 °C sob fotoperíodo de 12 h

Tratamentos	PC	IVG	NRS	NP	Comprimento			Massa seca
					RP	Hipocótilo	Total	
	-- % --				----- cm -----			-- g --
UAGB01	33,000 ^{ns}	2,549 ^{ns}	9,389*	1,022 ^{ns}	3,948 ^{ns}	7,335 ^{ns}	11,264 ^{ns}	0,056 ^{ns}
UAGB93	33,500 ^{ns}	2,462 ^{ns}	8,700*	1,150 ^{ns}	5,333*	7,537 ^{ns}	10,725 ^{ns}	0,007 ^{ns}
UAGB94	19,500 ^{ns}	1,412 ^{ns}	7,961 ^{ns}	0,997 ^{ns}	4,132 ^{ns}	7,209 ^{ns}	10,025 ^{ns}	0,008 ^{ns}
UAGB105	41,500 ^{ns}	3,112 ^{ns}	7,225 ^{ns}	1,175 ^{ns}	3,755 ^{ns}	7,517 ^{ns}	11,272 ^{ns}	0,008 ^{ns}
UAGB106	30,000 ^{ns}	2,224 ^{ns}	6,575 ^{ns}	1,275 ^{ns}	4,017 ^{ns}	6,687 ^{ns}	10,367 ^{ns}	0,009 ^{ns}
UAGB110	21,500 ^{ns}	1,769 ^{ns}	8,082*	1,477*	3,177 ^{ns}	7,448 ^{ns}	9,135 ^{ns}	0,007 ^{ns}
UAGB10	39,500 ^{ns}	3,509*	6,522 ^{ns}	1,130 ^{ns}	3,843 ^{ns}	7,214 ^{ns}	11,090 ^{ns}	0,007 ^{ns}
UAGB39	39,500 ^{ns}	3,054 ^{ns}	4,939 ^{ns}	1,287 ^{ns}	3,762 ^{ns}	8,575*	12,304*	0,006 ^{ns}
UAGB60	38,500 ^{ns}	2,881 ^{ns}	5,725 ^{ns}	1,625*	3,205 ^{ns}	7,203 ^{ns}	10,237 ^{ns}	0,008 ^{ns}
UAGB119	33,500 ^{ns}	2,593 ^{ns}	5,650 ^{ns}	1,425*	4,262 ^{ns}	5,762 ^{ns}	10,025 ^{ns}	0,008 ^{ns}
UAGB128	37,500 ^{ns}	2,773 ^{ns}	4,633 ^{ns}	1,333 ^{ns}	3,969 ^{ns}	7,833*	10,862 ^{ns}	0,007 ^{ns}
UAGB132	35,000 ^{ns}	2,625 ^{ns}	7,975 ^{ns}	1,600*	3,927 ^{ns}	7,100 ^{ns}	11,027 ^{ns}	0,007 ^{ns}
UAGB68	41,500 ^{ns}	3,197 ^{ns}	5,525 ^{ns}	1,400*	4,250 ^{ns}	7,447 ^{ns}	11,697 ^{ns}	0,009 ^{ns}
UAGB69	34,500 ^{ns}	2,593 ^{ns}	5,800 ^{ns}	1,300 ^{ns}	3,535 ^{ns}	6,687 ^{ns}	10,222 ^{ns}	0,007 ^{ns}
UAGB70	37,500 ^{ns}	2,725 ^{ns}	5,812 ^{ns}	1,081 ^{ns}	3,426 ^{ns}	7,200 ^{ns}	10,067 ^{ns}	0,008 ^{ns}
UAGB154	47,000*	3,532*	8,400*	1,005 ^{ns}	5,420*	7,792*	13,212*	0,005 ^{ns}
UAGB156	26,500 ^{ns}	2,025 ^{ns}	11,550*	1,300 ^{ns}	4,740 ^{ns}	7,082 ^{ns}	11,822*	0,006 ^{ns}
UAGB167	46,000*	3,558*	9,800*	1,450*	4,685 ^{ns}	7,335 ^{ns}	12,320*	0,006 ^{ns}
UAGB71	41,000 ^{ns}	3,209*	5,400 ^{ns}	1,425*	4,585 ^{ns}	8,732*	13,117*	0,006 ^{ns}
UAGB80	42,000 ^{ns}	3,152 ^{ns}	6,705 ^{ns}	1,283 ^{ns}	5,229*	8,708*	12,205*	0,004 ^{ns}
UAGB96	32,500 ^{ns}	2,446 ^{ns}	8,087*	1,281 ^{ns}	4,160 ^{ns}	7,177 ^{ns}	10,905 ^{ns}	0,008 ^{ns}
UAGB139	36,000 ^{ns}	2,734 ^{ns}	4,950 ^{ns}	1,150 ^{ns}	4,415 ^{ns}	6,497 ^{ns}	10,912 ^{ns}	0,007 ^{ns}
UAGB147	38,500 ^{ns}	2,903 ^{ns}	5,875 ^{ns}	1,325 ^{ns}	4,645 ^{ns}	6,030 ^{ns}	9,160 ^{ns}	0,007 ^{ns}
UAGB150	44,000 ^{ns}	3,205*	7,725 ^{ns}	1,350 ^{ns}	2,945 ^{ns}	7,835*	10,780 ^{ns}	0,007 ^{ns}
Testemunha	22,500	1,971	2,885	0,706	3,878	3,728	5,767	0,006
CV (%)	29,66	27,46	27,81	20,42	19,83	17,64	22,30	25,11

PC: Primeira contagem de sementes germinadas; IVG: Índice de velocidade de germinação; NRS: Número de pelos absorventes; NP: Número de plúmulas; RP: Comprimento de raiz primária; ^{ns}: Não significativo, pelo teste de Dunnett, em nível de 5% de probabilidade; *: Significativo e superior a testemunha, pelo teste de Dunnett, em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 5. Características de germinação e crescimento inicial de plântulas de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk, após a inoculação em sementes de bactérias com potencial biotecnológico, com permanência de 21 dias em câmara de germinação a temperatura de 25±5 °C sob fotoperíodo de 12 h, dos tratamentos superior a testemunha, pré-selecionados pelo teste de Dunnett

Tratamentos	PC	IVG	NRS	NP	Comprimento		
					RP	Hipocótilo	Total
	-- % --				----- cm -----		
UAGB01	-	-	9,389B	-	-	-	-
UAGB93	-	-	8,700B	-	5,333A	-	-
UAGB110	-	-	8,082B	1,477A	-	-	-
UAGB10	-	3,509A	-	-	-	-	-
UAGB39	-	-	-	-	-	8,575A	12,304A
UAGB60	-	-	-	1,625A	-	-	-
UAGB119	-	-	-	1,425A	-	-	-
UAGB128	-	-	-	-	-	7,833A	-
UAGB132	-	-	-	1,600A	-	-	-
UAGB68	-	-	-	1,400A	-	-	-
UAGB154	47,000A	3,532A	8,400B	-	5,420A	7,792A	13,212A
UAGB156	-	-	11,550A	-	-	-	11,822A
UAGB167	46,000A	3,558A	9,800B	1,450A	-	-	12,320A
UAGB71	-	3,209A	-	1,425A	-	8,732A	13,117A
UAGB80	-	-	-	-	5,229A	8,708A	12,205A
UAGB96	-	-	8,087B	-	-	-	-
UAGB150	-	3,205A	-	-	-	7,835A	-
CV (%)	9,69	7,03	13,41	17,45	10,33	15,51	18,86

-: Dados não superiores a testemunha após análise pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade;

PC: Primeira contagem de sementes germina das; IVG: Índice de velocidade de germinação;

NRS: Número de pelos absorventes; NP: Número de plúmulas; RP: Comprimento de raiz primária; Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a

1% de probabilidade.

Plântulas vigorosas podem competir mais eficientemente em condições de estresse por luz, nutrientes e água, influenciando o estabelecimento da população vegetal na pastagem, assim diminuindo o número de plantas invasoras, contribuindo para menores perdas de água e erosão do solo e reduzindo o tempo de espera para entrada de animais na pastagem (Araújo et al., 2010; Zuffo et al., 2014). A inoculação de BPCP tem proporcionado o aumento na germinação em condições controladas em sementes de outras gramíneas como o Centeio (*Secale cereale* L.) (Merzaeva & Shinkikh, 2010), Milho (*Zea mays* L.) (Mascierelli et al., 2013) e Arroz (*Oryza sativa* L.) (Araújo et al., 2010).

Para as variáveis número de pelos absorventes e de plúmulas, 29,2% dos inóculos destacaram-se em relação ao tratamento Testemunha (Tabela 4). Entre os inóculos que se sobressaíram na variável número de pelos absorventes por plântula, o tratamento com a bactéria *Klebsiella* (UAGB 156) destacou-se, com incremento de 300,3% em relação a testemunha (Tabela 5). Para o número de plúmulas por plântula não foram observadas diferenças entre os tratamentos pre-selecionados pelo teste de Dunnett (Tabela 5), tendo a bactéria *Klebsiella* (UAGB60) proporcionado o maior incremento frente a testemunha, com aumento de 131,4%.

No comprimento de raiz primária 12,5% dos inóculos se sobressaíram em relação ao tratamento Testemunha (Tabela 4). Para o comprimento do hipocótilo e total de plântula 25,0% dos tratamentos obtiveram destaque em relação a testemunha (Tabela 4). Não observando diferenças entre os inóculos pré-selecionados pelo teste de Dunnett para as variáveis comprimento de raiz primária, hipocótilo e total de plântula (Tabela 5). Os maiores incrementos frente a testemunha foram observados com as bactérias *Klebsiella* (UAGB154) para as variáveis comprimento de raiz primária e total de plântula, com aumentos de 39,7% e

129,1%, respectivamente, e com a *Sinomonas* (UAGB71) na variável comprimento de hipocótilo, com aumento de 134,2%.

Nos tratamentos com os maiores percentuais de incremento frente a testemunha, as bactérias *Klebsiella* (UAGB60), *Klebsiella* (UAGB156), *Klebsiella* (UAGB154), *Rhizobium* (UAGB167) e *Sinomonas* (UAGB71), as três últimas apresentam produção de AIA *in vitro* superior a $100,08 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 1). Possivelmente favorecendo o maior percentual de sementes germinadas na primeira contagem e o IVG, além das características de comprimento de raiz primária, hipocótilo e total de plântula. Nos demais tratamentos as produções de AIA variaram de 4,98 a $67,17 \mu\text{g mL}^{-1}$, provavelmente a interação micro-organismo planta assumiu papel fundamental nos resultados biológicos positivos desta parceria.

Os micro-organismos capazes de produzir auxina podem exercer efeitos benéficos sobre o desenvolvimento da planta, principalmente no sistema radicular, além do aumento da germinação e emergência (Araújo et al., 2012; Mia et al., 2012), com melhorias do desenvolvimento e arquitetura do sistema radicular. As plantas infectadas por BPCP que produzem AIA elevam a capacidade de absorção de água e de nutrientes do solo e por consequência potencializam seu desenvolvimento e as chances do estabelecimento da cultura (Malhotra & Srivastava, 2009; Puente et al., 2009; Machado et al., 2013). Entretanto, o crescimento da planta pode não interferir na massa seca vegetal, devido à ação deste fitohormônio sobre o alongamento celular e turgência vacuolar (Conceição et al., 2008), como observado neste estudo.

As cinco bactérias que obtiveram com os maiores percentuais de incremento frente a testemunha no experimento 1, foram utilizadas para compor o MIX 1 do experimento 2, destas, apenas a *Klebsiella* (UAGB60) apresenta como planta de origem a *B. humidicola* (Rendle) Schweick. (Tabela 1), evidenciando a influência do fator genótipo da planta e da bactéria para

o sucesso da inoculação. Semelhante ao observado em condições de casa de vegetação com o MIX 3 composto com bactérias homologas a cultivar *B. decumbens*, com resultados assemelhando-se a adubação química e estatisticamente superiores a testemunha em todas as variáveis analisadas, exceto para a primeira contagem de plântulas emergidas (Tabela 6). Cabe salientar que todos os MIXs avaliados promoveram incremento em no mínimo duas variáveis entre todas avaliadas.

Tabela 6. Características de emergência e promoção de crescimento de plântulas aos 21 dias após a co-inoculação de bactérias com potencial biotecnológico em sementes de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk em casa de vegetação

Tratamentos	IVE	PSG	NP	AP	DP	AF	SPAD	MS
	----	%	----	---- cm	----	cm ²	----	g plântula ⁻¹
MIX 1	7,833 b	52,225 b	3,000 a	11,480 b	0,126 c	3,123 b	24,426 b	0,103 b
MIX 2	7,933 b	74,000 a	3,000 a	11,968 b	0,155 a	4,592 a	25,553 b	0,148 b
MIX 3	9,866 a	65,780 a	3,000 a	12,843 a	0,153 a	5,172 a	26,643 a	0,237 a
MIX 4	7,833 b	52,225 b	3,011 a	12,113 b	0,145 a	4,445 a	25,941 b	0,182 b
MIX 5	11,100 a	53,555 b	3,011 a	11,580 b	0,138 b	4,873 a	26,996 a	0,147 b
AQ	10,666 a	72,000 a	3,000 a	12,603 a	0,156 a	4,152 a	26,586 a	0,289 a
Testemunha	8,333 b	55,555 b	2,864 b	11,647 b	0,138 b	3,470 b	25,555 b	0,160 b
CV (%)	19,64	24,02	3,67	14,16	15,76	23,85	11,25	23,25

AQ: Adubação química; IVE: Índice de velocidade de emergência; PSG: Percentual de sementes germinadas ao fim do período experimental; NP: Número de plúmulas por plântula; AP: Altura de plântula; DP: Diâmetro de pseudocolmo a cinco centímetros do solo; AF: Área foliar da plúmula primária; SPAD: Medição da intensidade do verde das plúmulas primárias; MS: Massa seca de parte aérea por plântula. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

O não aumento nas variáveis analisadas após as co-inoculações possivelmente pode ser atribuído à presença da comunidade bacteriana indígena do solo ou planta, que interferem na capacidade das bactérias inoculadas em se estabelecer e competir com a microbiota nativa, bem como, às condições físicas e químicas do solo que podem ser desfavoráveis para seu adequado estabelecimento (Bécquer et al., 2013).

Houve incremento frente a testemunha no IVE de 18,4% e 33,2%, pelos MIXs 3 e 5, e no percentual de sementes germinadas ao fim do período experimental de 33,2% e 18,4%, pelos MIXs 2 e 3, respectivamente (Tabela 6). A quebra da dormência e o rápido desenvolvimento do embrião em sementes inoculadas com BPCP, podem influenciar significativamente no aumento da emergência de plântulas (Shahverdi et al., 2014). Resultados semelhantes foram observados por Sánchez-Yáñez et al. (2014) avaliando sementes de Milho (*Zea mays* L.) e Caro et al. (2014) em sementes de *Panicum maximum* Jacq.

Para o número de plúmulas por plântula, todos os MIXs contribuíram positivamente. Para altura de plântula o MIX 3 promoveu acréscimo de 10,2% em relação ao tratamento Testemunha. No diâmetro de pseudocolmo os MIXs 2; 3 e 4 elevaram em 7,1% e para a área foliar da plúmula primária os MIXs 2; 3; 4 e 5 proporcionaram aumento superior a 28,2% frente ao tratamento Testemunha (Tabela 6). Embora quase todos os tecidos vegetais sejam capazes de produzir níveis baixos de AIA, os meristemas apicais de caules e as folhas jovens são os principais locais de síntese desses fitohormônios. Nos primórdios foliares a auxina acumula-se no ápice, à medida que as folhas se desenvolvem, acúmulos destes fitohormônios podem ser detectados nas margens das folhas (Taiz & Zeiner, 2013). Desta forma, bactérias que produzem AIA podem exercer efeito positivo nos parâmetros dimensionais das folhas (Araújo et al., 2012).

No índice de SPAD os MIXs 3 e 5 obtiveram destaque, proporcionando aumento em relação ao tratamento Testemunha de 4,2% e 5,7% respectivamente, nos níveis de pigmentos fotossintéticos (Tabela 6). Pelo fato do N ser um dos constituintes da clorofila, o teor deste pigmento pode ser usado como um indicador do nível de N nas folhas (Bianchet et al., 2013; Canellas et al., 2013). Bactérias diazotróficas associadas a plantas podem fornecer o N de forma mais efetiva, elevando seus níveis e conseqüentemente elevando os teores de clorofila (Kelume et al., 2011). Resultados semelhantes foram observados por Chauhan et al. (2013) ao co-inocular diferentes estirpes bacterianas em Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.).

Para massa seca de plântulas o MIX 3 proporcionou incremento de 50,0% frente ao tratamento Testemunha (Tabela 6). O aumento na produtividade em plantas inoculadas com bactérias diazotróficas possivelmente ocorre devido ao aumento do N disponível (Shahverdi et al., 2014). Este nutriente suprido via fixação biológica (Araújo et al., 2014), além de estimular a produção vegetal, facilita a produção de fitohormônios por bactérias, que por sua vez, favorecem o desenvolvimento de raízes e conseqüentemente a absorção de N, fósforo e outros nutrientes indispensáveis ao desenvolvimento vegetal (Tripathi et al., 2013).

No tocante à comunidade bacteriana rizosférica, as co-inoculações e a adubação promoveram a mudança nas comunidades bacterianas já na fase inicial de crescimento do vegetal (Figura 1). Entre os MIXs 2; 3 e 4 as sobreposições demonstram por meio da análise ANOSIM uma maior similaridade das comunidades entre os solos inoculados ($R < 0,111$) (Tabela 7). Cabe salientar que apenas a germinação das sementes promoveu a alteração na comunidade bacteriana do solo. Segundo Salamone et al. (2012), a inoculação de BPCP altera a comunidade indígena do solo, favorecendo a heterogeneidade da comunidade bacteriana (Trabelsi et al., 2011).

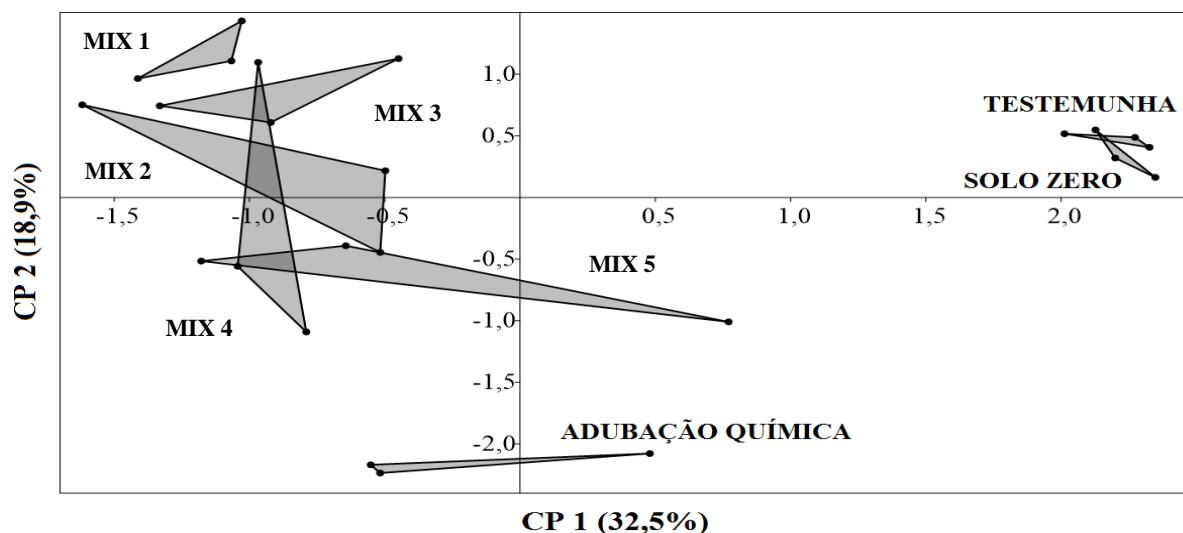


Figura 1. Análise da componente principal (PC) do polimorfismo de fragmentos de restrição do gene 16s rDNAs das comunidades bacterianas do solo rizosférico de plântulas de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk aos 21 dias após as co-inoculações de bactérias promotoras de crescimento de planta.

Tabela 7. Valores de R da análise de similaridade de ANOSIM com base no gene 16s rDNAs das comunidades bacterianas do solo rizosférico de plântulas de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk aos 21 dias após as co-inoculações de bactérias promotoras de crescimento de planta

Tratamentos	MIX 1	MIX 2	MIX 3	MIX 4	MIX 5	AQ	Testemunha
MIX 1	-	-	-	-	-	-	-
MIX 2	0,370	-	-	-	-	-	-
MIX 3	0,500	0,037	-	-	-	-	-
MIX 4	0,481	0,074	0,111	-	-	-	-
MIX 5	0,796	0,296	0,592	0,020	-	-	-
AQ	1,000	0,981	1,000	0,592	0,722	-	-
Testemunha	1,000	0,889	1,000	0,815	0,852	1,000	-
Solo Zero	1,000	1,000	1,000	0,778	0,833	1,000	0,574

AQ: Adubação química; $R > 0,75$ grupos encontram-se bem separados; $0,25 > R < 0,75$ grupos estão separados, porém apresentam sobreposições; $R < 0,25$ não há separação entre os grupos.

Na fase vegetativa todas as variáveis analisadas tiveram efeito positivo das co-inoculações, apresentando interações entre os períodos de corte e os tratamentos. Os MIXs tiveram comportamentos distintos entre as variáveis estudadas e ciclos de avaliação, porém de forma geral os co-inóculos 1 e 3 destacaram-se dos demais e do tratamento Testemunha, superando ou assemelhando-se ao tratamento Adubação em um maior número de variáveis (Tabelas 8, 9 e 10). Esses resultados, possivelmente devem-se à composição dos MIXs 1 e 3 com bactérias homologas à planta inoculada, bem como, ao maior desenvolvimento das plântulas até 21° após a semeadura, MIX 3 e a avaliação prévia da interação bactéria planta, com o MIX 1 composto por isolados que obtiveram destaque em teste de germinação (exeperimento 1).

Tabela 8. Altura média de planta, número de folhas e de perfilhos, e área foliar de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk, conforme as co-inoculações de bactérias com potencial biotecnológico e cortes realizados com intervalos de 35 dias

Tratamentos	Corte 1	Corte 2	Corte 3	CV (%)	Corte 1	Corte 2	Corte 3	CV (%)
	Altura média de planta (cm vaso ⁻¹)				Número de perfilhos (número vaso ⁻¹)			
MIX 1	74,316 Ba	46,997 Ab	35,340 Ac	12,12	22,598 ABc	30,488 ABCb	49,200 ABa	11,91
MIX 2	68,752 Ca	46,447 Ab	27,588 Bc		19,361 Bc	28,900 BCb	42,888 Ca	
MIX 3	68,703 Ca	46,194 ABb	27,500 Bc		21,366 ABc	31,396 ABb	45,300 BCa	
MIX 4	73,035 Ba	42,525 BCb	25,711 BCc		20,005 Bc	25,421 CDb	37,000 DEa	
MIX 5	67,818 Ca	41,609 Cb	26,822 BCc		20,328 Bc	27,734 BCb	42,000 CDa	
Adubação	78,951 Aa	39,650 Cb	25,330 BCc	26,076 Ac	33,200 Ab	52,400 Aa		
Testemunha	70,534 BCa	39,509 Cb	23,290 Cc	18,799 Bb	20,733 Db	33,900 Ea		
CV (%)	16,25				11,27			
	Número de folhas vivas (número vaso ⁻¹)				Área foliar (cm ² por folha)			
MIX 1	92,077 ABb	105,009 ABb	172,200 ABa	10,84	48,680 Aa	33,004 Ab	26,559 Ac	8,72
MIX 2	79,804 Bc	106,900 ABb	150,111 Ca		45,169 ABa	32,672 ABb	23,386 ABc	
MIX 3	94,793 ABc	114,649 Ab	158,400 BCa		44,239 Ba	32,620 ABb	23,020 ABc	
MIX 4	82,006 Bb	91,434 Bb	129,500 DEa		46,506 ABa	31,974 ABb	24,153 ABc	
MIX 5	79,325 Bc	107,528 ABb	147,000 CDa		47,387 ABa	31,194 ABb	27,075 Ac	
Adubação	106,548 Ab	110,837 Ab	183,400 Aa	49,353 Aa	31,192 ABb	20,605 Bc		
Testemunha	77,154 Bb	72,744 Cb	118,650 Ea	40,720 Ca	28,530 Bb	19,650 Bc		
CV (%)	9,95				7,67			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 9. Intensidade de verde da folha, massa de forragem, comprimento e massa seca de raiz de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk, conforme as co-inoculações de bactérias com potencial biotecnológico e cortes realizados com intervalos de 35 dias

Tratamentos	Corte 1	Corte 2	Corte 3	CV (%)	Corte 1	Corte 2	Corte 3	CV (%)
	SPAD*				Massa de forragem (g vaso ⁻¹)			
MIX 1	31,792 Ba	33,733 Aa	33,030 ABa	5,50	23,425 Ba	14,065 BCDb	15,460 Ab	10,44
MIX 2	29,767 Bb	31,471 Aab	33,477 ABa		21,680 Ca	14,921 BCb	15,364 Ab	
MIX 3	30,502 Bb	33,076 Aa	33,070 ABa		23,975 Ba	14,739 BCb	14,029 ABb	
MIX 4	31,445 Ba	32,330 Aa	33,588 ABa		24,285 Ba	15,358 Bb	12,108 CDc	
MIX 5	32,124 Ba	32,622 Aa	31,380 Ca		24,355 Ba	13,331 CDb	12,373 BCb	
Adubação	35,071 Aa	33,750 Aa	35,770 Aa	27,134 Aa	21,262 Ab	13,497 ABCc		
Testemunha	29,596 Bab	28,068 Bab	30,750 Ba	21,187 Ca	12,497 Db	11,609 Cb		
CV (%)	5,81				9,73			
	Comprimento de raiz (cm vaso ⁻¹)				Massa seca de raiz (g vaso ⁻¹)			
MIX 1	90,637 ABab	108,218 Aa	96,300 Aab	8,88	33,556 Aa	30,355 Aa	24,767 Aa	20,98
MIX 2	89,504 ABa	96,244 ABa	84,906 Aa		33,012 Aa	20,482 Ab	24,599 Aab	
MIX 3	87,233 ABb	103,043 Aa	88,975 Ab		36,716 Aa	25,709 Ab	23,075 Ab	
MIX 4	82,135 BCa	82,866 CDa	82,866 Aa		34,775 Aa	27,656 Aab	21,740 Ab	
MIX 5	90,777 ABa	90,618 Ca	88,432 Aa		27,463 ABa	19,914 Aa	23,870 Aa	
Adubação	93,218 Aa	94,300 Ba	93,546 Aa	34,432 Aa	25,133 Ab	24,252 Ab		
Testemunha	71,562 Ca	73,400 Da	76,687 Ba	20,903 Ba	26,581 Aa	19,829 Aa		
CV (%)	9,33				22,58			

*SPAD: Medição da intensidade do verde das folhas, utilizando-se o medidor *Soil Plant Analysis Development*. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 10. Nitrogênio total e percentual de nitrogênio acrescido via fixação biológica na parte aérea e raiz de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk, conforme as co-inoculações de bactérias com potencial biotecnológico e cortes realizados com intervalos de 35 dias

Tratamentos	Corte 1	Corte 2	Corte 3	CV	Corte 1	Corte 2	Corte 3	CV
	Nitrogênio total na parte aérea (mg g ⁻¹)				Nitrogênio total da raiz (mg g ⁻¹)			
MIX 1	14,950 Bb	15,555 Ab	19,305 Aa	4,14	10,991 Aa	7,121 ABb	7,595 Ab	4,91
MIX 2	14,271 Bb	14,601 Ab	16,982 BCa		9,412 Ba	7,300 ABb	6,871 ABb	
MIX 3	14,200 Bb	14,702 Ab	16,691 BCDa		11,222 Aa	6,922 Bb	6,623 ABb	
MIX 4	14,352 Ba	14,903 Aa	15,093 Da		9,534 Ba	7,526 ABb	7,300 ABb	
MIX 5	13,555 Bc	15,401 Ab	17,000 BCa		10,585 Aa	8,021 Ab	6,436 Bc	
Adução	17,253 Aa	15,302 Ab	17,604 Ba		10,893 Aa	7,275 ABb	7,064 ABb	
Testemunha	14,404 Bb	14,105 Ab	15,433 CDa		9,290 Ba	6,922 Bb	6,455 Bb	
CV (%)	6,37				4,24			
	Percentual de nitrogênio acrescido pela co-inoculação na parte aérea				Percentual de nitrogênio acrescido pela co-inoculação na raiz			
MIX 1	0,438 Ab	2,828 ABa	3,795 Aa	26,53	0,183 Ac	1,400 Ab	2,241 Aa	21,96
MIX 2	0,000 Bb	2,682 ABa	1,870 Ba		0,119 Ab	1,051 Aa	1,712 Ba	
MIX 3	0,577 Ab	3,095 Aa	2,220 ABa		0,189 Ac	1,256 Ab	2,110 Aa	
MIX 4	0,500 Ab	2,089 ABa	2,076 ABa		0,000 Bc	1,019 Ab	2,008 Aa	
MIX 5	0,594 Ab	2,529 ABa	3,168 ABa		0,191 Ac	1,337 Ab	2,089 Aa	
Adução	0,478 Aa	0,551 Ca	0,823 Ca		0,000 Bc	0,866 Bb	1,512 Ba	
CV (%)	20,59				24,73			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Como observado nas variáveis morfológicas e fisiológicas, altura média de plantas, número de perfilhos e folhas, área foliar, intensidade de verde da folha, massa de forragem, comprimento e massa seca de raiz (Tabelas 8, 9 e 10), e em outros estudos, a inoculação e co-inoculação de BPCP em diferentes gramíneas tem implicado na melhoria do crescimento e produção vegetal (Hungria et al., 2010; Carvalhais et al., 2013; Haiyambo et al., 2015). Os cortes de avaliação propiciaram diminuição na variável altura média de planta, porém com a rebrota, Cortes 2 e 3, maiores valores foram observados para o número de perfilhos e folhas por vaso, além da redução da área foliar (Tabela 8). Os incrementos constatados em tais características nas plantas de braquiária inoculadas possivelmente ocorreram devido ao melhor estado nutricional do vegetal e à maior concentração de fitohormônio.

As BPCP estão sendo empregadas com sucesso em diferentes espécies forrageiras em todo o mundo, beneficiando a planta por mecanismos diversos como a fixação biológica de nitrogênio, produção de fitohormônios, solubilização de fosfato inorgânico (Bashan & Bashan, 2010; Hungria et al., 2016). Kim et al. (2012) verificaram aumento no comprimento de parte aérea de *Panicum virgatum* cultivar Alamo, inoculadas com *Burkholderia phyfirmans*. Araújo et al. (2012) inoculando *Bacillus* sp. em sementes de *B. brizantha* cultivar Marandú verificaram incremento com o decorrer dos cortes de avaliação, no perfilhamento das plantas inoculadas. Guimarães et al. (2011) constataram aumento no número de folhas de *B. decumbens* inoculadas com estirpes de *Azospirillum* spp.

As bactérias diazotróficas e produtoras de auxina, quando inoculadas podem desempenhar efeitos benéficos sobre o sistema radicular (Mia et al., 2012), como observado no comprimento e massa seca de raiz das plantas de braquiária nos três cortes de avaliação (Tabela 9). Plantas infectadas elevam a capacidade de absorção de água e de nutrientes do solo (Malhotra & Srivastava, 2009; Machado et al., 2013; Okumura et al., 2013). Entretanto, houve

redução no peso da massa seca de raiz com o avançar dos cortes (Tabela 9), possivelmente as rebrotas tenderam a mobilizar nutrientes da raiz para o desenvolvimento da parte aérea do vegetal, contudo não foi observado alteração no comprimento radicular.

As co-inoculações proporcionaram maiores concentrações de N na planta, este proveniente da fixação biológica (Tabela 10). No que se refere ao percentual de N acrescido via fixação biológica, menores valores são observados no Corte 1, posteriormente com as reinoculações nos Cortes 2 e 3 maiores percentuais foram constatados. Provavelmente as reinoculações de BPCP contribuíram para a bioaugmentação das bactérias inoculadas, gerando uma maior taxa de fixação biológica de N e melhor desenvolvimento das plantas, semelhante ao observado por Kelemu et al. (2011) reinoculando BPCP em sementes de *Brachiaria* sp. Cabe salientar que plantas adubadas quimicamente apresentam menores ou nulas taxas de fixação biológica de N, como relatado por Kox et al. (2016).

A associação micro-organismo planta pode promover inúmeros benefícios, sendo capazes de reduzir a necessidade do uso de fertilizantes e promover o crescimento vegetal (Egamberdiyeva et al., 2007; Silva et al., 2013). Entretanto, os genótipos dos organismos envolvidos na associação podem implicar na expressão fenotípica das características bacterianas (Loredo-Osti et al., 2004). Portanto, a exploração de BPCP representa uma alternativa promissora para o melhor desenvolvimento e aperfeiçoamento da produção agrícola, tendo as pastagens vasto potencial para investigações e aplicações de inóculos e co-inóculos de BPCP visando um rápido estabelecimento da gramínea, bem como, uma maior produção vegetal, com menos custos ao produtor e reduzindo danos ambientais.

CONCLUSÕES

A inoculação e co-inoculação de BPCP em sementes *B. decumbens* cultivar Basilisk mostrou-se eficiente tanto em ambiente de câmara de germinação como em casa de vegetação. Os tratamentos com bacterianas homologas a planta inoculada e com maiores produções de AIA tiveram destaque, com aumento nas características de germinação e a promoção do crescimento do vegetal.

Em casa de vegetação os tratamentos MIX 1 e MIX 3 tiveram destaque, superando a testemunha e assemelhando-se ao tratamento Adubação nas diferentes fases do desenvolvimento das plantas avaliadas. Os processos de co-inoculação de BPCP e a adubação química alteraram a comunidade bacteriana rizosférica no solo.

Estudos futuros em ambiente de campo e envolvendo outros componentes do sistema pastoril são necessários, de forma a melhor compreender a influencia dos inóculos e co-inóculos no vegetal, assim visando a formulação de um produto com menores impactos ambientais e de menor custo para o produtor.

REFERÊNCIAS

AFZAL, M.; YOUSAF, S.; REICHENAUER, T.G.; KUFFNER, M.; SESSITTSCH, A. Soil type affects plant colonization, activity and catabolic gene expression of inoculated bacterial strains during phytoremediation of diesel. **Journal of Hazardous Materials**, v.186, p.1568-1575, 2010.

ANDREOTE, F.A.; GUMIERE, T.; DURRER, A. Exploring interactions of plant microbiomes. **Scientia Agricola**, v.71, p.528-539, 2014.

ARAÚJO, A.E.S.; ROSSETTO, C.A.V; BALDAN, V.L.D.; BALDANI, J.I. Germinação e vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p.932-939, 2010.

ARAÚJO, E.O.; MARTINS, M.R.; MERCANTE, F.M. *Herbaspirillum seropedicae* inoculation and nitrogen fertilization on nitrogen use efficiency of different corn genotypes. **African Journal of Agricultural**, v.40, p.3025-3031, 2014.

ARAÚJO, F.F.; GUABERTO, L.M.; SILVA, I.F. Bioprospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em *Brachiaria brizantha*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, p.521-527, 2012.

BASHAN, Y.; BASHAN, L.E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—A critical assessment. **Advances in Agronomy**. v.78, p.77-136, 2010.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E.; PRABHU, S.R.; HERMANDEZ, J.P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant Soil**, v.378, p.1-33, 2014.

BIANCO, S.; BRENDOLAN, R.A.; ALVES, P.L.C.A.; PITELLI, R.A. Estimativa de área doliar de plantas daninhas: *Brachiaria decumbens* Stapf. e *Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf. **Revista Planta Daninha**, v.18, p.79-84, 2000.

BÉCQUER, C.J.; SALAS, B.; SLASKI, J.; ARCHAMBAULT, D.; ANYA, A. Influence of rhizospheric bacteria on germination and initial growth of *Sporobolus cryptandrus* (Torr.) A. Gray. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v.47, p.431-436, 2013.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. 2009. 399p. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mapa/ACS. Brasília.

CANELLAS, L.P.; BALMORI, D.M.; MÉDICI, L.O.; AGUIAR, N.O.; CAMPOSTRINI, E.; ROSA, R.C.C.; FAÇANHA, A.R.; OLIVEIRAS, F.L. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant Soil**, v.366, p.119-132, 2013.

CARDOSO, A.S.; BERNDT, A.; LEYTEM, A.; ALVES, B.J.R.; CARVALHO, I.N.O.; SOARES, L.H.B.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Impacto f the intensification of beef production in Brazil on greenhouse gas emissions and land use. **Agricultural Systems**, v.143, p.86-96, 2016.

CARO, D.M.C.; RUBIANO, M.F.G.; FANDIÑO, B.A.R.; BUITRAGO, R.R.B. Inoculación con *Azospirillum* spp y *Enterobacter agglomerans* en pasto Guinea (*Panicum maximum* Jacq.) en el Departamento de Cesar (Colombia). **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v.67, p.7271-7280, 2014.

CASASÚS, I.; RIEDEL, J.L.; BLANCO, M.; BERNUÉS, A.; Exetnsive livestock production systems and the environment. **European Federation of Animal Sciences**, v.131, p.81-88, 2012.

CAVALCANTI, F.J.A. **Recomendações de adubação para o Estado de Pernambuco**. 3.ed. Recife, IPA, 2008. 212p.

CARVALHAIS, L.C.; DENNIS, P.G.; FAN, B.; FEDOSEYENKO, D.; KIERUL, K.; BECKER, A.; VON WIREN, N.; BORRISS, R. Linking plant nutritional status to plant-microbe interactions. **Plos One**, v.8, p.1-13, 2013.

CHALK, P.M.; INÁCIO, C.T.; BALIEIRO, F.C.; ROUWS, J.R.C. Do techniques based on ^{15}N enrichment and ^{15}N natural abundance give consistent estimates of the symbiotic dependence of N_2 -fixing plants?. **Plant Soil**, v.399, p.415-426, 2016.

CHAUHAN, H.; BAGYARAJ, D.J.; SHARMA, A. Plant growth-promoting bacterial endophytes from sugarcane and their potential in promoting growth of the host under field conditions. **Expert en Agriculture**, v.49, p.43-52, 2013.

CLARKE, K.R.; GORLEY, R.N. **PRIMER v5: User manual/tutorial**, PRIMER-E.Plymouth, UK, 2001. 91p.

CONCEIÇÃO, P.M.; DUARTE VIEIRA, H.D.; CANELLAS, L.P.; MARQUES JÚNIOR, R.B.; OLIVARES, F.L. Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.545-548, 2008.

DIAS FILHO, M.B. **Degradação de pastagens: processos, causas e estratégias de recuperação**. 4ed. Belém: Edição do autor, 2015. 215p.

EGAMBERDIYEVA, D. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. **Applied Soil Ecology**, v.36, p.184-189, 2007.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos/Centro Nacional de Pesquisas de Solos, 2006, 285p.

EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL. **Diagnóstico das pastagens no Brasil**. Belém: Embrapa Amazônia Ambiental, 2014, 36p. (Embrapa Amazônia Ambiental. Documento, 402). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/102203/1/DOC-402.pdf>>. Acesso em: 01 abr 2016.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011.

FREITAS, A.D.S.; SAMPAIO, E.V.S.B.; SANTOS, C.E.R.S.; FERNANDES, A.R. Biological nitrogen fixation in tree legumes of the Brazilian semi-arid Caatinga. **Journal Arid Environ**, v.74, p.344-349, 2010.

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

GUIMARÃES, S.L.; BONFIM-SILVA, E.M.; POLIZEL, A.C.; CAMPOS, T.S. Produção de Capim Marandu inoculado com *Azospirillum* spp. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v.7, p.13-20, 2011.

HAIYAMBO, D.H.; CHIMWAMUROMBE, P.M.; REINHOLD-HUREK, B. Isolation and screening of rhizosphere bacteria from grasses in east kavango region of Namibia for plant growth promoting characteristics. **Current Microbiology**, v.71, p.566-571, 2015.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rDNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Appl Environ Microbiol**, v.63, p.3233-3241, 1997.

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

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v.49, p.791-801, 2013.

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

JOE, M.M.; JALEEL, C.A.; SIVAKUMAR, P.K.; ZHAO, X.C.; KARTHIKEYAN, B. Co-aggregation in *Azospirillum brasilense* MTCC-125 with other PGPR strains: Effect of physical and chemical factors and stress endurance ability. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.40, p.491-499, 2009.

KELEMU, S.; FORY, P.; ZULETA, C.; RICAURTE, J.; RAO, I.; LASCANO, C. Detecting bacterial endophytes in tropical grasses of the *Brachiaria* genus and determining their role in improving plant growth. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p.965-976, 2011.

KIM, S.; LOWMAN, S.; HOU, G.; NOWAK, J.; FLINN, B.; MEI, C. Growth promotion and colonization of switch grass (*Panicum virgatum*) cv. Alamo by bacterial endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. **Biotechnology for Biofuels**, v.5, p.1-10, 2012.

KNAUS, W. Perspectives on pasture versus indoor feeding of dairy cows. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.96, p.9-17, 2016.

KOX, M.A.R.; LÜKE, C.; FRITZ, C.; ELZEN, E.V.D.; ALLEN, T.V.; HUUB, J.M.; LAMERS, L.P.M.; JETTEN, M.S.M.; ETTWIG, K. Effects of nitrogen fertilization on diazotrophic activity of microorganisms associated with *Sphagnum magellanicum*. **Plant and Soil**, v.14, p.1-18, 2016.

LIMA, D.R.M. **Bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco**. 2012. 110p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

LOREDO-OSTI, C.; LÓPEZ-REYES, L.; ESPINOSA-VICTORIA, D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas. **Terra Latino American**, v.22, p.225-239, 2004.

LOSSAU, S.; FISCHER, G.; TRAMBEREND, S.; VENLTHUIZEN, H.; KLEINSCHMIT B.; SCHOMACKER, R. Brazil's current and future land balances: is there residual land for bioenergy production?. **Biomass and Bioenergy**, v.81, p.452-461, 2015.

MACHADO, R.G.; SÁ, E.L.S.; BRUXEL, M.; GIONGO, A.; SANTOS, N.S.; NUNES, A.S. Indoleacetic acid producing rhizobia promote growth of tanzania grass (*Panicum maximum*) and pensacola grass (*Paspalum sauriae*). **International Journal of Agriculture & Biology**, v.15, p.827-834, 2013.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedlings emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176-177, 1962.

MALHOTRA, M.; SRIVASTAVA, S. Stress-responsive indol-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. **European Journal of Soil Biology**, v.45, p.73-80, 2009.

MERZAEVA O.V.; SHIROKIK, I.G. The Production of auxins by the endophytic bacteria of winter rye. **Prikladnaya Biokhimiya in Mikrobiologiya**, v.46, p.51-57, 2010.

MIA, M.A.B.; SHAMSUDDIN, Z.H.; MAHMOOD, M. Effects of rhizobia and plant growth promoting bacteria inoculation on germination and seedling vigor of lowland rice. **African Journal Biotechnol**, v.16, p.37-58, 2012.

MURPHY, C.A.; FOSTER, B.L.; GAO, C. Temporal dynamics in rhizosphere bacterial communities os three perennial grassland species. **Agronomy**, v.6, p.1-17, 2016.

OLIVEIRA, A.C.S.; MARTINS, G.N.; SILVA, R.F.; VIEIRA, H.D. Testes de vigor em sementes baseados no desempenho de plântulas. **Revista Científica Internacional**, v.4, p.1-21, 2009.

OKUMURA, R.S.; MARIANO, D.C.; DALLACORT, R.; ALBUQUERQUE, A.N.; LOBATO, A.K.S.; GUEDES, E.M.S.; NETO, C.F.O.; CONCEIÇÃO, H.E.O.; ALVES, G.A.R. *Azospirillum*: A new and eficiente alternative to biological nitrogen fixation in grasses. **Jornal of Food, Agriculture & Environment**, v.11, p.1142-1146, 2013.

OLIVEIRA, J.T.C. **Caracterização fisiológica e genética de bactérias potencialmente diazotróficas associadas a capim braquiária**. 2012. 143p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Garanhuns, Garanhuns.

OLIVEIRA, T.C.; PEREIRA, D.N.; BRITO, T.E.; AGOSTINI, J.A.F.; LIMA, P.F.; SILVA, A.V.; SANTOS, C.S.; BREGAGNOLI, M. Diagnóstico e recuperação de áreas de pastagens degradadas. **Revista Agrogeoambiental**, v.1, p.49-53, 2013.

PEREIRA, C.E.; OLIVEIRA, J.A.; ROSA, M.C.M.; KIKUT, A.L.P. Armazenamento de sementes de braquiária peletizadas e tratadas com fungicida e inseticida. **Ciência Rural**, v.41, p.2060-2065, 2011.

PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J.M.; LEMANCEAU, P.; PUTTEN, W.H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v.11, p.789-799, 2013.

PUENTE, M.L.; GARCIA, J.E.; ALEJANDRO, P. Effect of the bacterial concentration of *Azospirillum brasilense* in the inoculum and its plant growth regulator compounds on crop yield of corn (*Zea mays* L.) in the field. **World Journal of Agricultural Science**, v.5, p.604-608, 2009.

ROA-FUENTES, L.L.; MARTINEZ-GARZA, C.; ETCHEVERS, J.; CAMPO, J. Recovery of soil C and N in a tropical pasture: passive and active restoration. **Land Degradation & Development**, v.26, p.201-210, 2015.

SALAMONE, I.E.G.; FUNES, J.M.; SALVO, L.P.D.; ORTEGA, J.S.E.; D'AURIA, F.; FERRANDO, L.; SCAVINO, A.F. Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impacto f plant genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production. **Applied Soil Ecology**, v.61, p.196-204, 2012.

SÁNCHEZ, A.C.; GUTIÉRREZ, R.T.; SANTANA, R.C.; URRUTIA, A.R.; FAUVART, M.; MICHIELS, J.; VANDERLEYDEN, J. Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. **European Journal of Soil Biology**, v.62, p.105-112, 2014.

SCHULTZ, N.; MORAIS, R.F.; SILVA, J.A.; BAPTISTA, R.B.; OLIVEIRA, R.P.; LEITE, J.M.; PEREIRA, W.; CARNEIRO JÚNIOR, J.B.; ALVES, B.J.R.; BALDANI, J.I.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, p.261-268, 2012.

SHAHVERDI, M.; MIRSHKARI, B.; RAHMANI, H.A.; RASHIDI, V.; ARDAKANI, M.R. Response of forage quality in Persian clover upon co-inoculation with native *Rhizobium leguminosarum symbiovar* (sv.) *trifoli* RTB₃ and plant-growth promoting *Pseudomonas fluorescens* 11168 under diferente levels of chemical fertilizers. **African Journal of Microbiology Research**, v.8, p.155-161, 2014.

SHEARER, G.; KOHL, D.H. N₂-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. **Australian Journal Plant Physiol**, v.3, p.699-756, 1986.

SILVA, M.C.P.; FIGUEIREDO, A.F.; ANDREOTE, F.D.; CARDOSO, E.J.B.N. Plant growth promoting bacteria in *Brachiaria brizantha*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.29, p.163-171, 2013.

SOLLEMBERGER, L.; COLEMAN, S.W.; VENDRAMINI, J.M.B. As interações entre plantas e herbívoros em pastagens. In: REIS, R.A.; BERNARDES, T.F.; SIQUEIRA, G.R. (Ed.1). **Forragicultura: ciência tecnologia e gestão dos recursos forrageiros**. Jaboticaba: Maria de Lourdes Bradel, 2013. p.69-92.

SUMNER, M.E. Crop responses to *Azospirillum inoculation*. **Advances in Soil Sciences**, v.12, p.54-123, 1990.

VOGEL, G.F.; MARTINKOSKI, L.; RUZICKI, M. Efeitos da utilização de *Azospirillum brasilense* em poáceas forrageiras: importâncias e resultados. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.10, p.1-6, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TRABELSI, D.; MENGONI, A.; AMMAR, H.B.; MHAMDI, R. Effect of on-field inoculation of *Phaseolus vulgaris* with rhizobia on soil bacterial communities. **Federation of European Microbiological Societies**, v.77, p.211-222, 2011.

TRIPATHI, J.; SINGH, A.K.; TIWARI P.; MENAKA, Y.M. Comparative effectiveness of different isolates of *Azospirillum* on nitrogen fixation and yield and yield attributing characters of tomato in Chhattisgarh. **African Journal of Microbiology Research**, v.7, p.3615-3620, 2013.

TRIVELIN, P.C.O.; SALATI, E.; MATSUI, E. **Preparo das amostras para análise de 15N por espectrometria de massa**. 2.ed. Piracicaba, CENA, 1973. 41p.

WEMHEUER, F.; WEMHEUER, B.; KRETZSCHMAR, D.; PFEIFFER, B.; HERZOG, S.; DANIEL, R.; VIDAL, S. Impact of grassland management regimes on bacterial endophyte diversity differs with grass species. **Letters in Applied Microbiology**, v.62, p.323-329, 2016.

ZUFFO, A.M.; ANDRADE, F.R.; SILVA, L.M.A.; MENEZES, K.O.; SILVA, R.L.; PIAULINO, A.C. Profundidade de semeadura e superação de dormência no crescimento inicial de sementes de *Brachiaria dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf (1919) cv. Llanero. **Revista Ceres**, v.61, p.948-955, 2014.

CAPÍTULO 3

Interação de bactérias diazotróficas associadas a pastagens de *Brachiaria decumbens*

Stapf. em sistema silvipastoril com leguminosas arbóreas

Resumo - O tipo de manejo e as diferentes espécies vegetais que ocupam o solo podem exercer influência na quantidade, diversidade e funcionalidade das comunidades microbianas diazotróficas e de vida livre no solo ou associadas ao vegetal, conseqüentemente, interferindo nos processos biológicos e bioquímicos do solo. Neste sentido, objetivou-se avaliar a influência de leguminosas arbóreas Gliricídia (*Gliricidia sepium* Jacq.) e Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) e da sazonalidade climática na densidade e diversidade da comunidade bacteriana diazotrófica presente no nicho rizosfera de gramínea *Brachiaria decumbens* Stapf. Cultivadas em sistema silvipastoril, bem como, estimar a percentagem de nitrogênio fixado biologicamente por bactérias diazotróficas. As coletas de solo rizosférico (0,0-0,2 m) e material vegetal (0,25 m²) de plantas de *B. decumbens* Stapf. ocorreram na Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco, Itambé-PE, durante dois anos consecutivos. No decorrer do ano os ciclos de coletas ocorreram nos períodos chuvoso (mês de junho) e seco (mês de novembro), nos anos de 2012 a 2014, tendo a primeira avaliação ocorrido em novembro de 2012 e a última em junho de 2014. Os tratamentos avaliados foram, pastagem exclusiva de *B. decumbens* e três pontos em cada pastagem consorciada em diferentes distâncias da leguminosa, na planta de *B. decumbens* mais próxima da leguminosa, e nas distâncias de 3,75 m e 7,5 m após a leguminosa. As pastagens estavam dispostas em delineamento de blocos ao acaso, com três repetições, com o arranjo dos dados em parcela subdividida no tempo, tendo como variáveis a densidade bacteriana diazotrófica rizosférica, a diversidade bacteriana rizosférica fixadora de nitrogênio e total, a produção de massa seca de forragem, nitrogênio total e relação carbono/nitrogênio da planta de *B. decumbens*, além do percentual de nitrogênio nas plantas fixado biologicamente e o nitrogênio fixado biologicamente por m². Alta densidade bacteriana diazotrófica foi observada nos diferentes pontos de coleta e épocas do ano, com variações no número mais provável de células bacterianas diazotróficas por grama de solo rizosférico fresco de $4,00 \times 10^4$ a $7,00 \times 10^7$. Porém, não observou-se diferença entre os logs x das densidades bacterianas entre os tratamentos, já entre as épocas do ano os períodos com maior precipitação apresentou maiores densidades. A presença das leguminosas arbóreas e a sazonalidade climática alteraram a diversidade bacteriana, tanto diazotrófica como a total. Maior produção de massa de forragem de *B. decumbens* Stapf. foi observado com o distanciamento das leguminosas, tendo as menores produções ocorrido nos períodos de estiagem e nos tratamentos próximos das leguminosas. Nas variáveis nitrogênio total e relação carbono/nitrogênio das gramíneas, houve variação apenas com a sazonalidade climática. O

percentual de nitrogênio e a quantidade de nitrogênio fixado biologicamente por m² nas gramíneas elevaram-se com o distanciamento das leguminosas. Trabalho futuros são necessários, com envolvimento de outros componentes do sistema, de forma a melhor compreender a influência da presença de leguminosas arbóreas na comunidade bacteriana diazotrófica associada a gramínea forrageira em sistema silvipastoril.

Palavras-chave: densidade bacteriana, diversidade bacteriana, fixação biológica de nitrogênio, interação bactéria planta, gramínea forrageira

Interactions between diazotrophic bacteria associated with pastures of *Brachiaria decumbens* Stapf. and leguminous trees in silvopastoral system

Abstract - The type of management and the different species that occupy the ground can influence the quantity, diversity and functionality of diazotrophic and free-living microbial communities in the soil or associated with the plant, thus interfering with biological and biochemical processes in soil. In this sense, the objective of this study was to evaluate the influence of legume *Gliricidia* (*Gliricidia sepium* Jacq.) and *Sabia* (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) and seasonality in density and diversity of the bacterial community present in the rhizosphere diazotrophic of *Brachiaria decumbens* Stapf. Grown in silvopastoral system and estimate the percentage of biologically fixed nitrogen by diazotrophs. The collect of rhizosphere soil samples (0.0-0.2 m) and plant material (0.25 m²) of *B. decumbens* Stapf. occurred at the Experimental Station of the Agronomic Institute of Pernambuco located in Itambé-PE, for two consecutive years. During the year of 2012 and 2014 the collections cycles occurred in rainy periods (June) and dry periods (November) with the first evaluation occurred in November 2012 and the last in June 2014. The treatments evaluated were: exclusive grazing *B. decumbens* and three points in each pasture consortium at different distances from legumes, in *B. decumbens* plant closest to the legume, at distances of 3.75 m and 7.5m after legumes. Pastures were arranged in a randomized blocks design, with three replications, with the arrangement of the data in split plot in time, with the variables: bacterial density diazotrophic rhizospheric, the rhizospheric *diversity of nitrogen-fixing bacterial*, total dry matter production, total nitrogen and carbon/nitrogen ratio of *B. decumbens*, percentage of nitrogen in plants biologically fixed and biologically fixed nitrogen per m². High diazotrophic bacterial density was observed among the different collection points and times of the year, with variations in the likely number of diazotrophic bacterial cells per gram of fresh rhizosphere soil of 4.00×10^4 to 7.00×10^7 . However, no difference was observed between the logs x bacterial densities between treatments, as between season periods with higher precipitation showed higher densities. The presence of leguminous trees and seasonality resulted in altered bacterial diversity of both, diazotrophic and total. Increased production of herbage mass of *B. decumbens* Stapf. was observed with the distachment of legumes, having lower production during the dry season and next to the treatments of legumes. Total nitrogen variables and carbon/nitrogen ratio of grasses, there was change only with seasonality. The percentage of

nitrogen and the amount of biologically fixed nitrogen by m² in grasses increased with the distance of legumes. Future studies are needed involving other system components, in order to better understand the influence of the presence of leguminous trees in diazotrophic bacterial community associated with forage grass in silvopastoral systems.

Key words: bacterial density, bacterial diversity, biological nitrogen fixation, forage grass, plant bacteria interaction

INTRODUÇÃO

A disponibilidade de nitrogênio (N) no solo é frequentemente limitante para o crescimento das plantas e à produtividade das culturas. Quando adicionado aos solos na forma de adubo químico, há perdas por volatilização e lixiviação, tornando essa prática bastante onerosa (Santoyo et al., 2016). Com os altos custos da fertilização nitrogenada e a demanda de alimentos crescente, tem-se enfatizado a necessidade de maior exploração de bactérias fixadoras de N atmosférico associadas a gramíneas forrageiras (Silva et al., 2010; Silva et al., 2013; Wemheuer et al., 2016). Isso ocorre devido à importância destas gramíneas para pecuária mundial e, principalmente para a brasileira, uma vez que a produção de carne e leite é baseada quase que exclusivamente nos sistemas de produção a pasto (Rubel et al., 2015).

Em solos agrícolas com cultivo de plantas não leguminosas, a contribuição da fixação biológica de N (FBN) por bactérias de vida livre e associativas não é tão significativa quanto a contribuição dos simbioses (Andreote et al., 2014). Neste sentido, o uso de leguminosas em pastos consorciados visa maior entrada de N (Freitas et al., 2010; Louam et al., 2015), além de proporcionar melhorias no que tange aos fatores nutricionais e de qualidade do pasto (Silveira et al., 2015). Nessa perspectiva enquadra-se o sistema silvipastoril com uso de leguminosas arbóreas, esse sistema é caracterizado pelo cultivo simultâneo de plantas forrageiras herbáceas e árvores, objetivando a produção animal e outros bens e serviços (Bussoni et al., 2015; Apolinário et al., 2016).

As diferentes propriedades do solo, bem como, o tipo de uso e as diferentes espécies vegetais que o ocupam influenciam na quantidade e diversidade das comunidades microbianas diazotróficas e total de vida livre presentes no solo e associadas ao vegetal (Hayden et al., 2010; Rasche et al., 2011; Jincai et al., 2016). Vários genes têm sido utilizados para determinação da diversidade de indivíduos ou comunidades bacterianas presentes no solo, entre eles o gene *nifH*

específico para bactérias fixadoras de N atmosférico, por codificar parte do complexo enzimático da nitrogenase, que reduz o N atmosférico a amônia (Ueda et al., 1995). O gene 16S rDNA utilizado para avaliar a comunidade bacteriana total (Lammel et al., 2016), por está presente em todas bactérias e por ser altamente conservado pode ser utilizado para investigações de variabilidade genética (Heuer et al., 1997). Sendo esperada maior diversidade quando avaliada a comunidade geral de bactérias, em comparação com grupos funcionais (Meyer et al., 2015).

Alterações nas comunidades bacterianas interferem nos processos biológicos e bioquímicos do solo, alterando a produtividade agrícola e a sustentabilidade dos agroecossistemas (Azar et al., 2013). O funcionamento do ecossistema pastagem é regulado por uma série de fatores bióticos e abióticos, e o papel das comunidades microbianas na regulação e manutenção deste ecossistema tem sido objeto de estudo recente. No entanto, ainda existem lacunas de conhecimento sobre os impactos da mudança da vegetação e da sazonalidade climática na fauna microbiana e as implicações destas alterações na densidade, diversidade e funcionalidade da comunidade bacteriana (Lima et al., 2015; Fry et al., 2016).

Neste sentido, objetivou-se avaliar a influência de leguminosas arbóreas *Gliricídia* (*Gliricidia sepium* Jacq.) e *Sabiá* (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.) e da época do ano na densidade e diversidade da comunidade bacteriana diazotrófica presente no nicho rizosfera, bem como, estimar a percentagem de N fixado biologicamente por bactérias diazotróficas associadas a gramínea *Brachiaria decumbens* em sistema silvipastoril.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas de solo rizosférico e de plantas de *B. decumbens* foram realizadas na Estação Experimental de Itambé, pertencente ao Instituto Agronômico de Pernambuco, situada na

microrregião fisiográfica da Zona da Mata Norte do estado a 7°24'37" S e 35°06'46" O a 189 m de altitude e temperatura média 25 °C (CPRH, 2003). O solo da área experimental foi classificado como argissolo vermelho-amarelo Tb distrófico, com horizonte A proeminente de textura médio argilosa e relevo suavemente ondulado (EMBRAPA, 2006).

As amostras foram colhidas durante dois anos consecutivos em diferentes períodos do ano, em junho, terço final da estação chuvosa, e novembro, mês mais seco do ano. A primeira coleta ocorrendo em novembro de 2012 (Ciclo 1) e a última em junho de 2014 (Ciclo 4). O total mensal de precipitação pluvial acumulada durante o período experimental pode ser observado na figura 1 (IPA, 2016).

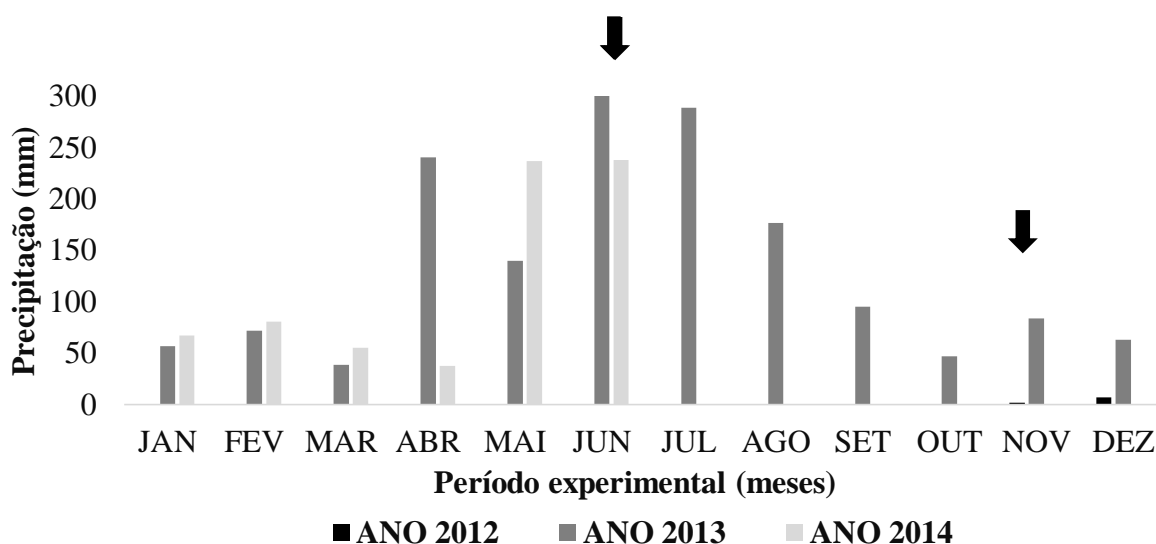


Figura 1. Precipitação pluvial mensal de novembro de 2012 a junho de 2014 na Estação Experimental de Itambé-PE, Instituto Agrônômico de Pernambuco.

O experimento consistiu de pastagens em sistema silvipastoril *B. decumbens* e Gliricídia, *B. decumbens* e Sabiá, e *B. decumbens* em cultivo exclusivo. Foi utilizado o delineamento de blocos ao acaso, com três repetições de um hectare cada. As análises foram feitas em esquema de parcela subdividida no tempo. Nas pastagens consorciadas as

leguminosas foram estabelecidas no ano de 2011, arranjadas em filas duplas espaçadas em 15,0 x 1,0 x 0,5 m, totalizando 2500 plantas por piquete. Todas as pastagens sob lotação contínua com ajustes da oferta de forragem de 3,0 kg de matéria seca de *B. decumbens* por kg⁻¹ de peso vivo animal. Os animais presentes nas pastagens eram bovinos machos mestiços das raças Girolando com peso vivo médio inicial de 175 kg.

As amostras de solo rizosférico, raiz e parte aérea de *B. decumbens* foram coletadas em sete diferentes pontos, cada ponto consistindo de um tratamento, um na pastagem exclusiva de *B. decumbens* e três em cada pastagem consorciada em diferentes distâncias das leguminosas, nas plantas de *B. decumbens* mais próximas às linhas das leguminosas, e nas distâncias de 3,75 m e 7,5 m após as linhas das leguminosas. Cada amostra de solo rizosférico, raiz e parte aérea de *B. decumbens* utilizada nas análises foi resultante de dez subamostras por ponto de coleta, por bloco, por ciclo de avaliação. As amostras de solo rizosférico foram coletadas a profundidade de 0-0,2 m, com as características químicas no início do período experimental expressas na tabela 1, seguindo metodologia proposta pela EMBRAPA (1997).

Tabela 1. Caracterização química do solo na camada 0,0-0,2 m no início do período experimental (novembro de 2012), em pastagens de *Brachiaria decumbens* Stapf. com e sem a introdução de leguminosas arbóreas Gliricídia (*Gliricidia sepium* Jacq.) e Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth)

Tratamentos	pH	P	Na	K	Ca
	água-1:2,5	mg dm ⁻³	-----	cmol _c dm ⁻³	-----
B	5,27 ± 0,15*	23,00 ± 2,51	0,06 ± 0,02	0,50 ± 0,20	3,23 ± 0,58
GL	5,57 ± 0,32	43,67 ± 4,30	0,07 ± 0,03	0,28 ± 0,00	3,90 ± 1,48
GLB	5,80 ± 0,44	23,67 ± 4,16	0,06 ± 0,02	0,48 ± 0,20	5,53 ± 0,77
GB	5,77 ± 0,47	13,27 ± 1,08	0,05 ± 0,01	0,45 ± 0,40	4,76 ± 1,97
SL	5,67 ± 0,15	21,93 ± 3,21	0,07 ± 0,00	0,26 ± 0,10	3,90 ± 1,05
SLB	5,87 ± 0,31	27,67 ± 3,51	0,06 ± 0,02	0,52 ± 0,30	3,90 ± 1,73
SB	5,50 ± 0,17	21,00 ± 2,21	0,05 ± 0,01	0,25 ± 0,10	3,46 ± 1,24
	Mg	Al	H+Al	C.O.	M.O.
	-----	cmol _c dm ⁻³	-----	-----	g kg ⁻¹
B	1,47 ± 0,23	0,23 ± 0,05	4,93 ± 0,28	15,30 ± 2,77	26,00 ± 4,53
GL	1,63 ± 0,23	0,33 ± 0,15	3,66 ± 1,02	16,00 ± 1,21	33,00 ± 4,35
GLB	2,20 ± 0,75	0,20 ± 0,10	2,96 ± 0,96	16,67 ± 2,51	27,33 ± 4,34
GB	2,57 ± 0,40	0,20 ± 0,06	4,30 ± 0,84	19,00 ± 2,64	11,67 ± 5,50
SL	1,90 ± 0,10	0,23 ± 0,05	3,33 ± 0,37	19,30 ± 2,68	34,00 ± 3,84
SLB	2,50 ± 0,20	0,10 ± 0,07	3,06 ± 0,97	17,30 ± 1,65	30,33 ± 3,24
SB	1,90 ± 0,26	0,23 ± 0,05	3,93 ± 0,21	16,30 ± 3,05	23,00 ± 4,58

*: Desvio padrão; C.O.: Carbono orgânico total do solo; M.O.: Matéria orgânica total do solo; B: Pastagens de braquiária em cultivo exclusivo; Plantas de braquiária mais próxima a Gliricídia (GL) e Sabiá (SL); Plantas de braquiária a 3,75 m de distância da Gliricídia (GLB) e Sabiá (SLB); Plantas de braquiária a 7,5 m de distância da Gliricídia (GB) e Sabiá (SB).

A densidade populacional de bactérias diazotróficas do nicho rizosfera foi analisada segundo Döbereiner et al. (1995) e Kuklinsky-Sobral et al. (2004). Cinco gramas de solo rizosférico foram mantidas sob agitação (90 rpm) a 28 °C, por 40 min, com 5 g de pérolas de vidro e tampão fosfato salino (PBS). Em seguida, diluídas nas concentrações de 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶ em tampão PBS e posteriormente inoculadas em triplicata em meio NFb semi-sólidos, e

acrescentado 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do fungicida Cercobin 700 (Thiophanate Methyl). A incubação ocorreu por oito dias a 28 °C, sendo consideradas positivas aquelas que apresentaram halo de crescimento no interior do meio de cultivo. O número mais provável de bactérias diazotróficas por grama de solo fresco foi determinado de acordo com a tabela de McCrady (Döbereiner et al., 1995).

Amostras do solo rizosférico tiveram seus DNAs totais extraídos com Power Soil DNA kit (MoBio; EUA). Após a extração, as integridades e qualidades dos DNAs foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1x (40mM de Tris-acetato; 1 MM de EDTA). Para amplificação do gene *nifH* foram utilizados os *primers* 19F (5'GCIWTYTAYGGIAARGGIGG-3') e 407R (5'-AAICCRCCRCAIACIACRTC-3') segundo Ueda et al. (1995), e para o 16s rDNA os *primers* foram PO27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e R1387 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3') seguindo as recomendações de Heuer et al. (1997). Em ambos os casos, o produto da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão 1x TAE e corado com *Blue greenloading*.

Para a análise do polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) os produtos da PCR dos dois genes amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição HindIII, HaeIII e MboI. Para cada gene e enzima foram preparadas misturas contendo 7 μL do produto da PCR, 10 X do tampão específico para cada enzima; 2 U da enzima de restrição e 2,7 μL de água ultrapura. As digestões foram realizadas a 37 °C por 10 horas. Os produtos da digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,5% em tampão 1x TAE e corado com *Blue greenloading*.

Amostras da parte aérea de *B. decumbens* foram coletadas rente ao solo em área de 0,25 m^2 , utilizando moldura quadrada de 0,5 m x 0,5 m. A análise da massa de forragem foi realizada

pelo método direto (Haydock & Shaw, 1975), as amostras foram secas em estufa de circulação de ar forçada a 55° C por 72 h. Posteriormente as amostras vegetais foram moídas e analisadas por espectrometria para determinação de N total, relação C/N, abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ como descrito por Trivelin (1973).

A expressão para o cálculo do percentual de N da planta derivado do ar foi estimado pela equação descrita por Shearer & Kohl (1986):

$$\%N_{\text{da}} = \left[\frac{\delta^{15}\text{N} (\text{planta referência}) - \delta^{15}\text{N} (\text{planta fixadora})}{\delta^{15}\text{N} (\text{planta referência}) - B} \right] \times 100$$

Em que: %N_{da} é o percentual de N da planta fixadora que é derivado do ar, $\delta^{15}\text{N}$ (referência) é a abundância de ^{15}N da planta controle não fixadora, $\delta^{15}\text{N}$ (fixadora) é a abundância de ^{15}N da planta fixadora e B (também chamado valor B) é o valor de $\delta^{15}\text{N}$ para plantas fixadoras cultivadas na ausência de N.

Cabe salientar que as plantas referência utilizadas foram a *Solanum paniculatum* L. e *Cyperus esculentus* L. invasoras presentes na área experimental. Para o valor B da equação, valor de ^{15}N para plantas fixadoras cultivadas na ausência de N considerou-se zero, número comumente utilizado na avaliação em gramíneas (Chalk et al., 2016). A massa de forragem foi utilizada para estimar a quantidade em gramas de N fixado biologicamente por m².

As diversidades bacterianas diazotróficas e totais presentes nos solos rizosféricos foram analisadas utilizando dendrograma de similaridade calculado com base no Coeficiente de Jaccard e agrupado através do algoritmo *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*, e pelo índice de similaridade de Shannon-Weaver, ambas as análises utilizando o programa estatístico PAST 1.9 (Hammer et al., 2001).

As variáveis densidade bacteriana diazotrófica após transformação dos valores por log x, os índices de diversidade bacteriana diazotrófica e total, o N total, a relação C/N, o percentual

de N da planta derivado da atmosfera e a quantidade em gramas de N fixado biologicamente por m², foram submetidos à análise de variância pela estimativa F de Fisher-Snedecor. Quando detectadas diferenças significativas, realizou-se o teste de Tukey a 5% para comparação das médias, utilizando o programa estatístico SISVAR 5.6 (Ferreira, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As pastagens de *B. decumbens* Stapf. cultivadas com e sem a presença das leguminosas arbóreas e durante as diferentes épocas do ano apresentaram variações no número mais provável de células bacterianas diazotróficas por grama de solo rizosférico fresco de $4,00 \times 10^4$ a $7,00 \times 10^7$, valores semelhantes aos observados por Magalhães et al. (1979) e relatados por Moreira et al. (2010).

Na avaliação dos logs x das densidades bacterianas não houve interação entre as pastagens com cultivo de braquiária exclusivo e consorciado, independente da distância das leguminosas arbóreas e das épocas do ano. Houve efeito significativo para as épocas do ano (Tabela 2), tendo o período chuvoso de 2013 (Jun/2013) maior destaque, possivelmente devido as maiores precipitações (Figura 1).

Tabela 2. Logs x das densidades populacionais das comunidades bacterianas diazotróficas rizosféricas de plantas de *Brachiaria decumbens* Stapf. em cultivo exclusivo e consorciado com as leguminosas Gliricídia (*Gliricidia sepium* Jacq.) e Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) em diferentes épocas do ano, período seco (coleta no mês de novembro) e chuvoso (coleta no mês de junho)

Tratamentos	Nov/2012	Jun/2013	Nov/2013	Jun/2014	Média	CV (%)
B	5,913	6,217	5,719	5,934	5,946 A	
GL	5,997	6,929	6,055	6,408	6,347 A	
GLB	5,916	6,460	5,997	6,266	6,160 A	
GB	5,722	6,318	5,923	5,742	5,926 A	4,24
SL	6,020	6,762	6,325	5,943	6,262 A	
SLB	6,116	6,230	6,430	6,344	6,280 A	
SB	5,709	6,534	5,751	5,663	5,914 A	
Média	5,913 b	6,493 a	6,029 b	6,043 b		
CV (%)			5,79			

B: Pastagens de braquiária em cultivo exclusivo; Plantas de braquiária mais próxima a Gliricídia (GL) e Sabiá (SL); Plantas de braquiária a 3,75 m de distância da Gliricídia (GLB) e Sabiá (SLB); Plantas de braquiária a 7,5 m de distância da Gliricídia (GB) e Sabiá (SB). Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

As diversidades genéticas das comunidades bacterianas diazotróficas e totais, mostraram-se altas, formando grupos independentes entre os tratamentos e épocas do ano, com análise da variabilidade do gene *nifH* apresentando maior similaridade entre as comunidades bacterianas quando comparado a diversidade do gene 16S rDNA (Figuras 2 e 3). No que se refere aos índices de diversidade de Shannon-Weaver das comunidades bacterianas diazotróficas e totais, houve interação entre os tratamentos e as épocas do ano. Maiores dissimilaridades foram observadas próximo das leguminosas, a qual reduziu com o

distanciamento da mesma. Entre as épocas do ano, é observado maior similaridade dentre as comunidades nos períodos secos, Nov/2012 e Nov/2013 (Tabela 3).

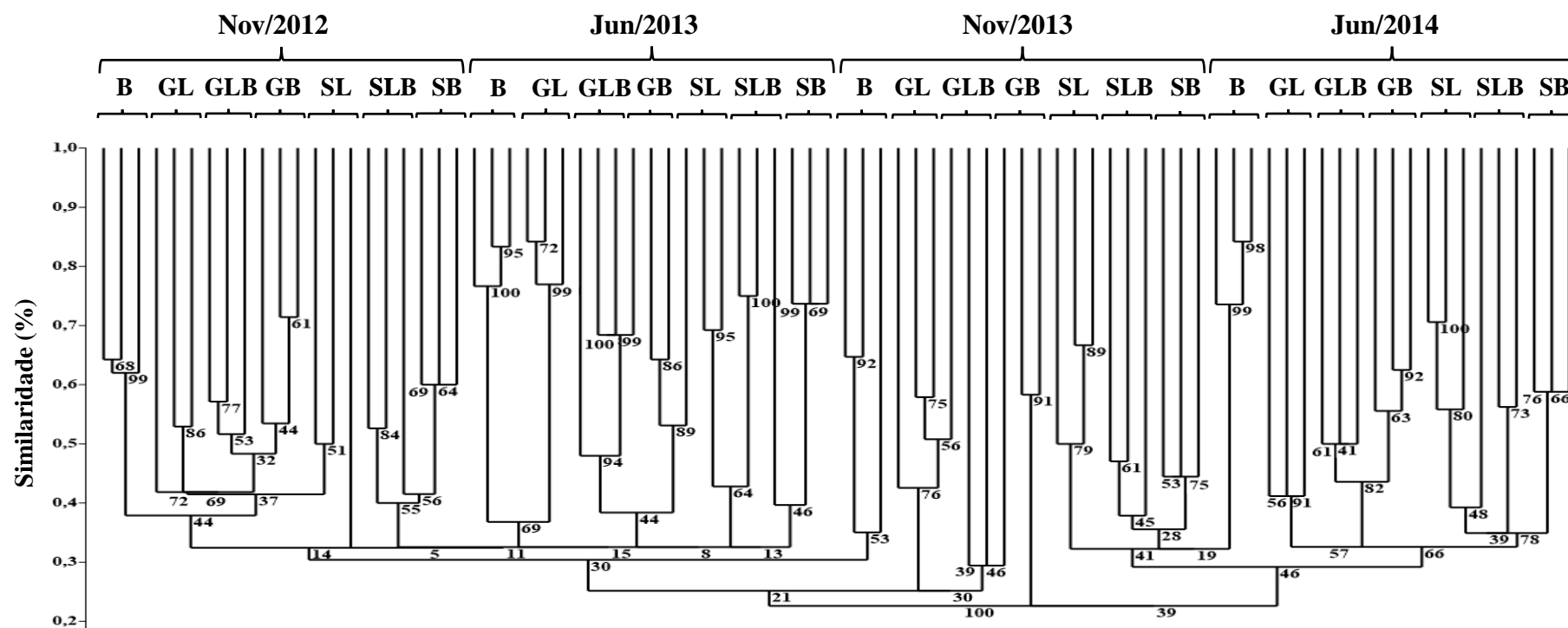


Figura 2. Dendrograma de similaridade com base no Coeficiente de Jaccard e agrupado através do algoritmo *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average* da análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição dos genes *nifH* do DNA de solo rizosférico de plantas de *Brachiaria decumbens* Stapf. sem e com inclusão das leguminosas Gliricídia (*Gliricidia sepium* Jacq.) e Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) em diferentes épocas do ano, período seco (coleta no mês de novembro) e chuvoso (coleta no mês de junho). B: Plantas de braquiária em cultivo exclusivo; Plantas de braquiária mais próxima a Gliricídia (GL) e Sabiá (SL); Plantas de braquiária a 3,75 m de distância da Gliricídia (GLB) e Sabiá (SLB); Plantas de braquiária a 7,5 m de distância da Gliricídia (GB) e Sabiá (SB).

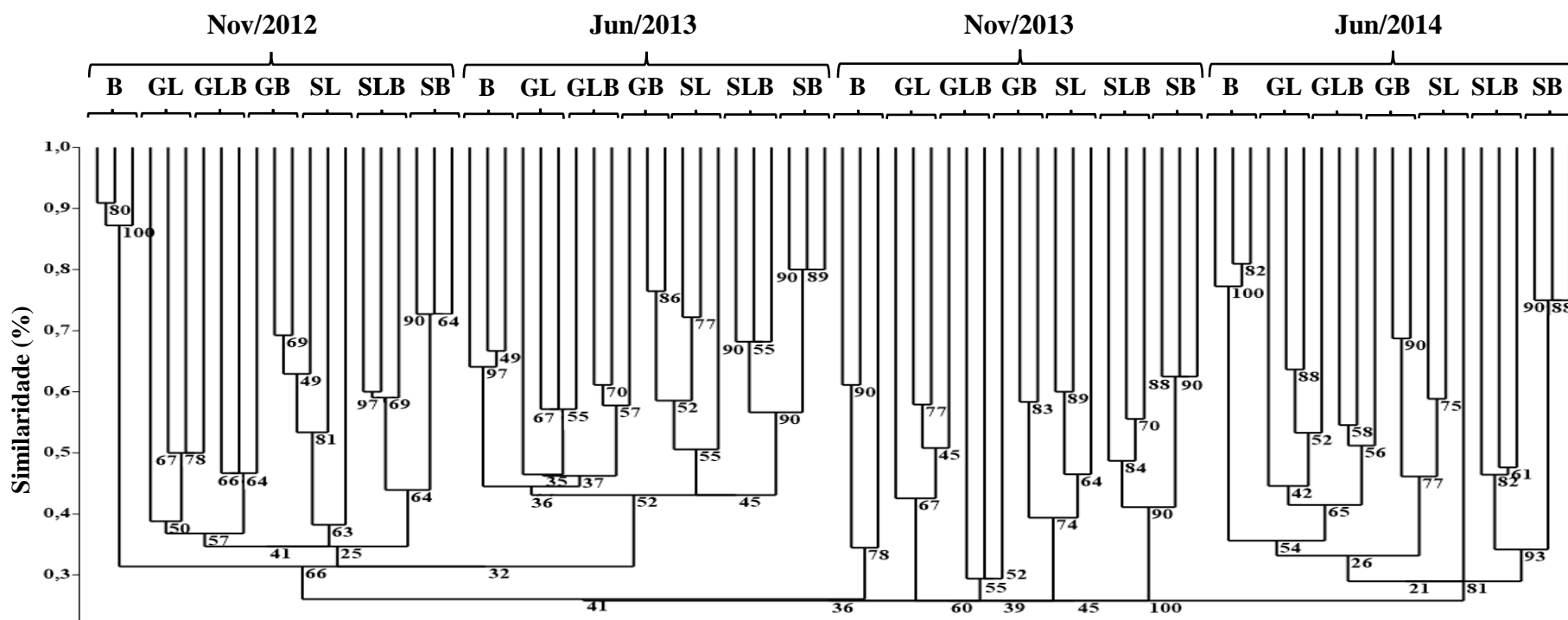


Figura 3. Dendrograma de similaridade com base no Coeficiente de Jaccard e agrupado através do algoritmo *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average* da análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição dos genes 16S do rDNA de solo rizosférico de plantas de *Brachiaria decumbens* Stapf. sem e com inclusão das leguminosas Gliricídia (*Gliricidia sepium* Jacq.) e Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) em diferentes épocas do ano, período seco (coleta no mês de novembro) e chuvoso (coleta no mês de junho). B: Plantas de braquiária em cultivo exclusivo; Plantas de braquiária mais próxima a Gliricídia (GL) e Sabiá (SL); Plantas de braquiária a 3,75 m de distância da Gliricídia (GLB) e Sabiá (SLB); Plantas de braquiária a 7,5 m de distância da Gliricídia (GB) e Sabiá (SB).

Tabela 3. Índice de diversidade de Shannon-Weaver das comunidades bacterianas diazotróficas rizosféricas de plantas de *Brachiaria decumbens* Stapf. em cultivo exclusivo e consorciado com leguminosas Gliricídia (*Gliricidia sepium* Jacq.) e Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) período seco (coleta no mês de novembro) e chuvoso (coleta no mês de junho)

Tratamentos	Gene <i>nifH</i>				CV (%)
	Nov/2012	Jun/2013	Nov/2013	Jun/2014	
B	2,813 Aa	2,440 Ab	2,869 Aa	2,703 Aa	4,20
GL	2,482 BCab	2,626 Aa	2,511 Bab	2,224 Cc	
GLB	2,745 ABa	2,478 Ab	2,683 ABab	2,702 Aab	
GB	2,852 Aa	2,536 Aab	2,610 ABb	2,224 Cc	
SL	2,451 Cab	2,557 Aab	2,685 ABa	2,501 ABb	
SLB	2,614 ABa	2,659 Aa	2,581 Bab	2,538 ABab	
SB	2,790 Aa	2,502 Ab	2,586 Bab	2,607 Aa	
CV (%)	6,49				
Tratamentos	Gene 16S rDNA				CV (%)
	Nov/2012	Jun/2013	Nov/2013	Jun/2014	
B	2,748 BCb	3,074 Aa	2,960 Aa	2,726 Ab	2,71
GL	2,685 Cb	2,366 BCc	2,852 ABa	2,224 Bc	
GLB	2,876 Ba	2,623 Bb	2,953 Aa	2,702 Ab	
GB	2,748 BCa	2,498 Bb	2,679 ABa	2,299 Bc	
SL	2,825 BCa	2,557 Bb	2,659 Cb	2,557 Ab	
SLB	2,920 ABa	2,646 Bb	2,679 BCb	2,581 Ab	
SB	3,089 Aa	2,943 Aa	3,007 Aa	2,612 Ab	
CV (%)	9,30				

B: Plantas de braquiária em cultivo exclusivo; Plantas de braquiária mais próxima a Gliricídia (GL) e Sabiá (SL); Plantas de braquiária a 3,75 m de distância da Gliricídia (GLB) e Sabiá (SLB); Plantas de braquiária a 7,5 m de distância da Gliricídia (GB) e Sabiá (SB). Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Como observado neste trabalho e demonstrado em outros estudos como os de Rodrigues et al. (2013), Ding et al. (2013) e Paula et al. (2014), as plantas exercem efeito significativo sobre a estrutura da comunidade bacteriana que habita a rizosfera. A

rizodeposição, que corresponde à deposição de nutrientes pelas raízes no solo próximo, exerce influência no número e composição genética das comunidades bacterianas no solo próximo ao vegetal (Mougel et al., 2006; Braghirolli et al., 2012; Andreote et al., 2014). Assim, pastagens com composição botânica elevada tendem a apresentar elevada diversidade bacteriana rizosférica, devido a maior variabilidade de exsudados liberados no solo. A diferença na quantidade e conteúdo de exsudados é modificada pela espécie vegetal presente na área, estado nutricional e estágio fenológico em que a planta se encontra (Houlden et al., 2008; Castro et al., 2011; Murphy et al., 2016).

Smith et al. (2015) avaliando o estabelecimento de plantas arbustivas arbóreas em áreas de pastagem, observaram alteração na diversidade da comunidade microbiana. Fato atribuído a presença das plantas arbustivas arbóreas na área de pastagem alterarem o pH do solo, umidade, teor de carbono, e as concentrações de N, como também observado na área de avaliação para as características químicas do solo (Tabela 1). Estas alterações possivelmente ocorrem devido a maior rizodeposição em áreas com elevada diversidade botânica, bem como, o aumento na deposição de serapilheira, formação de microclimas devido ao sombreamento e alteração na disponibilidade de água às gramíneas.

Como observado na densidade bacteriana rizosférica diazotrófica (Tabela 2) e diversidade bacteriana diazotrófica e total da rizosfera (Figuras 2 e 3, e Tabela 3) as variações na precipitação exercem influência. Estudos avaliando as comunidades microbianas ao longo do tempo, muitas vezes indicaram essa variação devido a alterações nas temperaturas e precipitações (Wardle, 1998; Houlden et al., 2008; Li et al., 2015). Reis Junior et al. (2004) demonstraram a alteração na densidade e diversidade de bactérias rizosféricas associadas a *Brachiaria* spp. ao longo do ano. Fry et al. (2016) evidenciaram que a distribuição de chuvas e umidade do solo foram os principais fatores que regularam a diversidade de micro-organismos no solo.

Cabe salientar outros fatores que podem proporcionar mudanças na variabilidade genética das comunidades bacterianas em sistemas de pastagem que não foram avaliados nesse estudo, são eles, alteração do manejo animal em pastejo (Wemheuer et al., 2016), eliminação de excretas na pastagem, pisoteio e a ação do pastoreio (Liu et al., 2015; Morales et al., 2015).

No que se refere a massa de forragem de *B. decumbens* houve interação entre os tratamentos e épocas do ano. As maiores produções de massa de forragem foram observadas na pastagem de braquiária em cultivo exclusivo e nos tratamentos com distanciamento das leguminosas. Entre os consórcios, as menores produções de massa de forragem foram observadas nos tratamentos com a presença da Sabiá (Tabela 4). Provavelmente a competição por água, luz, nutrientes e espaço favoreceu essa baixa produção de massa da gramínea próximo à leguminosa (Pinã-Rodrigues & Lopes, 2001; Sampaio et al., 2015).

Tabela 4. Produção de massa de forragem (g m²) de plantas de *Brachiaria decumbens* Stapf. em cultivo exclusivo e consorciado com leguminosas Gliricídia (*Gliricidia sepium* Jacq.) e Sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) em diferentes épocas do ano, período seco (coleta no mês de novembro) e chuvoso (coleta no mês de junho)

Tratamentos	Nov/2012	Jun/2013	Nov/2013	Jun/2014	CV (%)
B	103,160 Ac	550,778 Aa	216,000 ABb	494,896 Aa	
GL	72,613 Bb	259,026 Da	189,333 BCa	201,254 Ca	
GLB	114,240 Ac	298,928 DCb	233,600 Ab	467,906 ABa	
GB	107,093 Ac	485,073 ABa	250,666 Ab	403,332 ABa	18,18
SL	39,840 Cc	302,697 DCa	103,146 Cb	233,720 Ca	
SLB	51,146 Cc	264,464 Da	108,040 BCb	204,201 Ca	
SB	49,986 Cc	402,086 BCa	115,075 BCb	376,186 Ba	
CV (%)					14,54

B: Plantas de braquiária em cultivo exclusivo; Plantas de braquiária mais próxima a Gliricídia (GL) e Sabiá (SL); Plantas de braquiária a 3,75 m de distância da Gliricídia (GLB) e Sabiá (SLB); Plantas de braquiária a 7,5 m de distância da Gliricídia (GB) e Sabiá (SB). Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Além da maior concorrência entre as plantas por nutrientes e luz nos tratamentos consorciados, a menor produção de massa de forragem das gramíneas pode ter ocorrido devido ao efeito alelopático da serapilheira na pastagem com a presença da Sabiá. O material formador da serapilheira da Sabiá é constituído principalmente por folhas (Apolinário et al., 2016). Segundo Ferreira et al. (2007), a deposição mensal da serapilheira da Sabiá foi estimada em 669,72 kg ha⁻¹, com máxima e mínima de 1.624,22 e 292,65 kg ha⁻¹, respectivamente, em novembro de 2000 início do período seco e junho de 2001 período chuvoso. A serapilheira depositada da Sabiá produz efeito alelopático que interfere no estabelecimento e

desenvolvimento de indivíduos vegetais próximo a esta leguminosa (Dupuy & Chazdon, 2008; Ferreira et al., 2010).

Entre as épocas do ano, os períodos secos (Nov/2012 e Nov/2013) apresentaram produção de massa de forragem de 32,5% do observado no período das águas (Tabela 4), o que é comum nas regiões tropicais. Valor aproximado foi observado por Silva et al. (2010), avaliando a produção de *B. decumbens*, *B. humidicola* e *Pennisetum purpureum* também no município de Itambé-PE.

Independente das alterações nas produções de massa de forragem da *B. decumbens* nas diferentes distâncias das leguminosas arbóreas, não houve alteração nos valores de N total e relação C/N, estes com variação de 0,507 a 0,832 mg g⁻¹ no período seco, 1,260 a 1,888 mg g⁻¹ no período chuvoso para o N total e, 22,175 a 33,679 no período seco e 47,162 a 60,072 no período chuvoso para relação C/N (Tabela 5). Em ambas as variáveis, os períodos com maior precipitação obtiveram destaque, Jun/2013 e Jun/2014. Provavelmente, a decomposição dos resíduos vegetais contribuiu como fonte alternativa de reservas nitrogenadas, melhorando a fertilidade do solo e a nutrição de plantas especialmente em relação ao N (Pedrosa et al., 2014), com a disponibilidade de água favorecendo uma maior atividade microbiana (Fry et al., 2016), e conseqüentemente uma maior decomposição dos resíduos vegetais.

Tabela 5. Nitrogênio total e relação C/N de plantas de *Brachiaria decumbens* Stapf. em cultivo exclusivo e consorciado com leguminosas Gliricídia (*Gliricidia sepium* Jacq.) e Sabiá (*Mimosa caesalpinhiifolia* Benth.) em diferentes épocas do ano, período seco (coleta no mês de novembro) e chuvoso (coleta no mês de junho)

Tratamentos	Nitrogênio total na parte aérea (mg g ⁻¹)				CV (%)
	Nov/2012	Jun/2013	Nov/2013	Jun/2014	
B	6,380 Ab	12,602 Aa	5,162 Ab	12,573 Aa	21,87
GL	7,221 Ab	18,881 Aa	5,110 Ab	18,262 Aa	
GLB	6,690 Ab	14,503 Aa	5,273 Ab	14,711 Aa	
GB	8,290 Ab	16,382 Aa	4,671 Ab	16,031 Aa	
SL	6,890 Ab	17,400 Aa	5,070 Ab	17,080 Aa	
SLB	6,432 Ab	17,801 Aa	5,100 Ab	17,373 Aa	
SB	8,321 Ab	14,723 Aa	8,592 Ab	14,752 Aa	
CV (%)	27,07				
Tratamentos	Relação Carbono/Nitrogênio na parte aérea				CV (%)
	Nov/2012	Jun/2013	Nov/2013	Jun/2014	
B	33,679 Ab	60,072 Aa	33,374 Ab	60,497 Aa	19,96
GL	22,175 Ab	53,623 Aa	22,721 Ab	50,456 Aa	
GLB	29,298 Ab	57,208 Aa	28,588 Ab	52,609 Aa	
GB	26,369 Ab	46,469 Aa	26,905 Ab	54,612 Aa	
SL	25,041 Ab	50,675 Aa	25,470 Ab	58,549 Aa	
SLB	23,938 Ab	51,882 Aa	24,073 Ab	49,448 Aa	
SB	28,742 Ab	49,347 Aa	28,547 Ab	47,162 Aa	
CV (%)	18,37				

B: Plantas de braquiária em cultivo exclusivo; Plantas de braquiária mais próxima a Gliricídia (GL) e Sabiá (SL); Plantas de braquiária a 3,75 m de distância da Gliricídia (GLB) e Sabiá (SLB); Plantas de braquiária a 7,5 m de distância da Gliricídia (GB) e Sabiá (SB). Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Outro fator que pode ter contribuído para a não alteração das variáveis N total e relação C/N entre os tratamentos foi a FBN tanto da gramínea como da leguminosa. Analisando o percentual de N derivado do ar e a quantidade de N fixado biologicamente por m² houve interação entre os tratamentos e épocas do ano, tendo os maiores valores para ambas as

variáveis ocorrido nos tratamentos *B. decumbens* em cultivo exclusivo e nos sistemas de consórcio com o maior distanciamento das leguminosas (Tabela 6). Provavelmente a maior deposição e conseqüentemente decomposição de serapilheira, e elevação da matéria orgânica do solo próximo das leguminosas (Tabela 1), reduzem a fixação biológica de N.

Tabela 6. Percentagem de nitrogênio derivado do ar e quantidade de nitrogênio fixado biologicamente (g m^2) em plantas de *Brachiaria decumbens* Stapf. em cultivo exclusivo e consorciado com leguminosas Gliricídia (*Gliricidia sepium* Jacq.) e Sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.) em diferentes épocas do ano, período seco (coleta no mês de novembro) e chuvoso (coleta no mês de junho)

Tratamentos	Percentual de nitrogênio derivado do ar (%)				CV (%)
	Nov/2012	Jun/2013	Nov/2013	Jun/2014	
B	44,341 Aab	51,829 ABa	30,351 ABb	52,751 ABa	22,47
GL	22,516 Ca	27,608 Ca	36,741 ABa	25,568 Ca	
GLB	32,787 ABab	42,396 BCa	22,980 Cb	41,341 BCa	
GB	27,842 ABb	63,582 Aa	27,355 ABb	64,205 Aa	
SL	25,906 ABb	32,027 BCab	45,386 Aa	29,243 Cab	
SLB	23,655 Ca	28,683 Ca	30,331 ABa	25,643 Ca	
SB	40,219 ABa	41,483 BCa	30,199 ABa	39,202 BCa	
CV (%)	23,28				
Nitrogênio fixado biologicamente (g m^2)					
B	1,673 Aa	0,683 ABb	0,769 Ab	1,456 Bab	20,52
GL	0,406 BCb	0,373 Bb	0,377 Ab	0,900 ABa	
GLB	0,750 BCab	0,701 ABab	0,569 Ab	1,437 Ba	
GB	1,178 ABb	1,105 Ab	0,515 Ab	2,449 Aa	
SL	0,561 BCa	0,207 Ba	0,538 Aa	0,460 Ca	
SLB	0,362 Ca	0,246 Ba	0,315 Aa	0,484 ABa	
SB	1,392 ABa	0,304 Bb	0,911 Aab	0,654 ABab	
CV (%)	18,90				

B: Pastagens de braquiária em cultivo exclusivo; Planta de braquiária mais próxima a Gliricídia (GL) e Sabiá (SL); Plantas de braquiária a 3,75 m de distância da Gliricídia (GLB) e Sabiá (SLB); Planta de braquiária a 7,5 m de distância da Gliricídia (GB) e Sabiá (SB). Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Silva et al. (2013) ao avaliarem a deposição de serapilheira de Gliricídia e Sabiá em diferentes distâncias das leguminosas, em sistema silvipastoril com *B. decumbens*, observaram maiores quantidades de material vegetal senescente próximo as leguminosas, tendo redução com o afastamento da planta. A decomposição do material vegetal incorpora ao solo nutrientes essenciais, reduzindo a necessidade de aplicação de fertilizantes químicos (Freire et al., 2010; Apolinário et al., 2016) e a capacidade de FBN das bactérias associadas ao vegetal, devido a maior disponibilidade de nutrientes no solo (Moreira et al., 2010; Andreote et al., 2014).

O percentual de N nas plantas fixado biologicamente e conseqüentemente a quantidade de N fixado biologicamente por m² foi maior no período das águas, Jun/2013 e Jun/2014 (Tabela 6), semelhante ao observado com a densidade, diversidade bacteriana (Tabela 2 e 3), e produção de massa de forragem (Tabela 4). A disponibilidade de água favorece o acesso microbiano aos nutrientes presentes no solo, conseqüentemente elevando a densidade e diversidade (Santos et al., 2013; Fry et al. 2016). Trabalhos avaliando o percentual da contribuição de N via FBN em gramíneas forrageiras obtiveram dados análogos a este estudo, como Silva et al. (2010), avaliando pastagens de *B. humidicola* (Rendle) Schweick., *B. decumbens* Stapf. e Capim-elefante, observaram contribuição do N via FBN de 10 a 42%, e Morais et al. (2009) em Capim-elefante, constataram contribuição média de 51%.

Os diferentes sistemas de cultivo, como por exemplo o silvipastoril, afetam a composição da comunidade microbiana associada ao vegetal (Cubillos et al., 2016). Aspecto que possivelmente está ligado ao aumento da diversidade vegetal da área de cultivo, conseqüentemente, a elevação e diversificação dos exsudados liberados pelas raízes, a formação do microclima pelo consórcio e a maior deposição de serapilheira, que leva ao aumento da concentração de matéria orgânica no solo. Segundo Rasche et al., (2011), a matéria orgânica oriunda do vegetal é uma importante fonte de energia para o crescimento de micro-organismos do solo.

CONCLUSÕES

A presença das leguminosas arbóreas Gliricídia e Sabiá sob sistema silvipastoril em pastagens de *B. decumbens* Stapf. não alteram a densidade bacteriana diazotrófica presente no nicho rizosfera da gramínea, maiores densidades são observadas nos períodos do ano com maiores precipitações.

Os tratamentos mais próximos das leguminosas apresentaram maior diversidade genética das comunidades bacterianas diazotróficas e totais associadas ao nicho rizosfera da gramínea. Menores produções de massa de forragem de *B. decumbens* Stapf. são observadas próximo a leguminosas, fato não observado para as variáveis N total e relação C/N da gramínea, estes sofreram alterações em função da época do ano.

O percentual de N das braquiárias fixado biologicamente e a quantidade de N fixado biologicamente por m² sofreram alteração na presença de leguminosas na pastagem e da época do ano. Trabalhos futuros são necessários, com envolvimento de outros componentes do sistema, de forma a melhor compreender a influência da presença de leguminosas arbóreas na comunidade bacteriana diazotrófica associada a gramínea forrageira em sistema silvipastoril.

REFERÊNCIAS

ANDREOTE, F.A.; GUMIERE, T.; DURRER, A. Exploring interactions of plant microbiomes. **Scientia Agricola**, v.71, p.528-539, 2014.

APOLINÁRIO, V.X.O.; DUBEUX, J.C.B.; LIRA, M.A.; FERREIRA, R.L.C.; MELLO, A.C.L.; COELHO, D.L.; MUIR, J.P.; SAMPAIO, E.V.S.B. Decomposition of arboreal legume fractions in a silvopastoral system. **Crop Science**, v.1, p.1-24, 2016.

AZAR, G.S.; ARAÚJO, A.S.F.; OLIVEIRA, M.E.; AZEVÊDO, D.M.M.R. Biomassa e atividade microbiana do solo sob pastagem em sistemas de monocultura e silvopastoril. **Ciências Agrárias**, v.34, p.2727-2736, 2013.

BRAGHIROLI, F.L.; SGROTT, A.F.; PESCADOR, R.; UHLMANN, A.; STÜRMER, S.L. Fungos micorrízicos arbusculares na recuperação de florestas ciliares e fixação de carbono no solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.36, p.733-743, 2012.

BUSSONI, A.; JUAN, C.; FERNÁNDEZ, E.; BOSCAN, M.; CUBBAGE, F.; BENTANCUR, O. Integrated beef and wood production in Uruguay: potential and limitations. **Agroforest Syst**, v.89, p.1107-1118, 2015.

CASTRO, C.B.; KIDD, P.S.; PRIETO-FERNANDES, A.P.; WEYENS, N.; ACEA, M.J.; VANGRONVELD, J. Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterisation. **Plant Soil**, v.340, p.413-433, 2011.

COMPANHIA PERNAMBUCANA DO MEIO AMBIENTE (CPRH). **Diagnóstico Sócio Ambiental do litoral norte de Pernambuco**. Recife: CPRH, 2003. 214p. Disponível em: <http://www.cprh.pe.gov.br/central_servicos/centro_documentacao_informacao_ambiental/central_downloads/39749;34001;020709;0;0.asp>. Acesso em: 13 de abr. 2016.

CHALK, P.M.; INÁCIO, C.T.; BALIEIRO, F.C.; ROUWS, J.R.C. Do techniques based on ^{15}N enrichment and ^{15}N natural abundance give consistent estimates of the symbiotic dependence of n_2 -fixing plants?. **Plant Soil**, v.399, p.415-426, 2016.

CUBILLOS, A.M.; VALLEJO, V.E.; ARBELI, Z.; TERÁN, W.; RICHARD, P.D.; MOLINA, C.H.; ROLDAN, F. Effect of the conversion of conventional pasture to intensive silvopastoral systems on edaphic bacterial and ammonia oxidizer communities in Colombia. **European Journal of Soil Biology**, v.72, p.42-50, 2016.

DING, G.C.; PICENO, Y.M.; HEUER, H.; WEINERT, N.; DOHMANN, A.B.; CARRILLO, A.; ANDERSEN, G.L.; CASTELLANOS, T.; TEBBE, C.C.; SMALLA, K. Changes of soil bacterial diversity as a consequence of agricultural land use in a semi-arid ecosystem. **PLOS ONE**, v.8, p.1-10, 2013.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa Agrobiologia, 1995. 60p.

DUPUY, J.M.; CHAZDON, R.L. Interacting effects of canopy gap, understory vegetation and leaf litter on tree seedling recruitment and composition in tropical secondary forests. **Forest Ecology and Management**, v.255, p.3716-3725, 2008.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos/Centro Nacional de Pesquisas de Solos, 2006, 285p.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. 2.ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos/Centro Nacional de Pesquisas de Solos, 1997, 212p.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011.

FERREIRA, E.G.B.S.; MATOS, V.P.; SENA, L.H.M.; SALES, A.G.F.A. Efeito alelopático do extrato aquoso da sabiá na germinação de sementes de feijão. **Revista Ciência Agrônômica**, v.41, p.463-467, 2010.

FERREIRA, R.L.C.; LIRA JÚNIOR, M.A.; ROCHA, M.S.; SANTOS, M.V.F.; LIRA, M.A.; BARRETO, L.P. Deposição e acúmulo de matéria seca e nutrientes em serapilheira em um bosque de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.). **Revista Árvore**, v.31, p.7-12, 2007.

FREIRE, J.L.; DUBEUX JR, J.C.B.; LIRA, M.A.; FERREIRA, R.L.C.; SANTOS, M.V.F.; FREITAS, E.V. Deposição e composição química de serapilheira em bosque de sabiá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.1650-1658, 2010.

FREITAS, A.D.S.; SAMPAIO, E.V.S.B.; SANTOS, C.E.R.S.; FERNANDES, A.R. Biological nitrogen fixation in tree legumes of the Brazilian semi-arid Caatinga. **Jornal of Arid Environments**, v.74, p.344-349, 2010.

FRY, E.; MANNING, P.; MACDONALD, C.; HASEGAWA, S.; PALMA, A.; POWER, S.A.; SINGH, B.K. Shifts in microbial communities do not explain the response of grassland ecosystem function to plant functional composition and rainfall change. **Soil Biology and Biochemistry**, v.92, p.199-210, 2016.

HAMMER, O.; DAT, H.; RYAN, P.D. 2001. **PAST: Pacote de Software Paleontológico Estatísticas da Educação e Análise de Dados**. Palaeontologia Electronica, v.4, p.1-9.

HAYDEN, H.L.; DRAKE, J.; IMHOF, M.; OXLEY, A.P.A.; NORNG, S.; MELE, P.M. The abundance of nitrogen cycle genes *amoA* and *nifH* depends on land-uses and soil types in South-Eastern Australia. **Soil Biology & Biochemistry**, v.42, p.1774-1783, 2010.

HAYDOCK, K.P.; SHAW, N.H. The comparative yield method for estimating dry matter yield for pasture. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**, v.15, p.663-670, 1975.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rDNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Appl Environ Microbiol**, v.63, p.3233-3241, 1997.

HOULDEN, A.; TIMMS-WILSON, T.M.; DAY, M.J.; BAILEY, M.J. Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. **FEMS Microbiol**, v.65, p.193-201, 2008.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE PERNAMBUCO (IPA). **Sessão de índices pluviométricos**. Recife: IPA, 2016. Disponível em: <http://www.ipa.br/indice_pluv.php#calendario_indices>. Acesso em: 9 de abr. 2016.

JINCAI, M.; ILBEKWE, A.M.; YANG, C.H.; CROWLWY, D.E. Bacterial diversity and composition in major fresh produce growing soils affected by physichmical properties and geographic locations. **Science of The Total Environment**, v.563, p.199-209, 2016.

KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v.6, p.1244-1251, 2004.

LAMMEL, D.R.; FREIGL, B.J.; CERRI, C.C.; NÜSSLEIN, K. Specific microbial gene abundance and soil parameters contribute to C, N and greenhouse gas process rates after land use achange is Southern Amazonian Soil. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.1057-1068, 2015

LI, Y.; LIN, Q.; WANG, S.; LI, X.; LIU, W.; LUO, W.; ZHANG, Z.; ZHU, X.; JIANG, L.; LI, X. Soil bacterial community response to warming and grazing in a Tibetan alpine meadow. **FEMS Microbiology Ecology Advance**, v.152, p.1-15, 2015.

LIMA, A.B.; CANNAVAN, F.S.; GERMANO, M.G.; DINI-ANDREOTE, F.; PAULA, A.M.; FRANCHINI, J.C.; TEIXEIRA, W.G.; TSAI, S.M. Effects of vegetation and seasonality na bacterial communities in Amazonian dark Earth and adjacente soil. **African Journal of Microbiology Research**, v.9, p.2119-2134, 2015.

LIU, N.; KAN, H.M.; YANG, G.W.; ZHANG, Y.J. Changes in plant, soil, and microbes in a typical steppe from simulated grazing: explaining potencial change in soil C. **Ecological**, v.85, p.269-286, 2015.

LOUAM, G.; LOPES, E.P.; FRUSTEC, J.; MARY, D.B.; VOISIN, A.S.; CARVALHO, P.C.F.; GASTAL, F. The amounts and dynamics of nitrogen tranfer to grasses differ in alfalfa and White clover-based grass-legume mixtures as a resulto of rooting strategies and rhizodeposit quality. **Plant and Soil**, v.389, p.289-305, 2015.

MEYER, S.E.; BEUF, K.; VEKEMAN, B.; WILLEMS, A. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in lagume root nodules in Flanders (Belgin). **Soil Biology and Biochemistry**, v.83, p.1-11, 2015.

MORAIS, R.F.; SOUZA, B.J.; LEITE, J.M.; SOARES, L.H.B.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. Elephant grass genotypes for bioenergy production by direct biomass combustion. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.133-140, 2009.

MORALES, S.E.; JHA, N.; SAGGAR, S. Impacto f urine and the application of the nitrification inhibitor DCD on microbial communities in dairy-grazed pastures soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.88, p.344-353, 2015.

MOUGEL, C.; OFFRE, P.; RANJARD, L.; CORBERAND, T.; GAMALERO, E.; ROBIN, C.; LEMANCEAU, P. Dynamic of the genetic struture of bacterial and fungal communities at diferente developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jamalong line J5. **New Phytol**, v.170, p.165-175, 2006.

MURPHY, C.A.; FOSTER, B.L.; GAO, C. Temporal dynamics in rhizosphere bacterial communities os three perennial grassland species. **Agronomy**, v.6, p.1-17, 2016.

PAULA, F.S.; RODRIGUES, J.L.M.; ZHOU, J.; WU, L.; MULLER, R.C.; MIRZA, B.S.; BOHANNAN, B.J.M.; NUSSLEIN, K.; DENG, Y.; TIEDJE, J.M.; PELLIZANI, V. Land use change alters functional gene diversity, composition ans abundance in Amazon forest soil microbial communities. **Molecular Ecology**, v.23, p.2988-2999, 2014.

PEDROSA, A.W.; FAVARIN, J.L.; VASCONCELOS, A.L.S.; CARVALHO, B.V.; OLIVEIRA, F.B.; NEVES, G.B. Resíduo de *Brachiaria* fertilizada com nitrogênio na adubação do café. **Coffee Science**, v.3, p.366-373, 2014.

PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; LOPES, B. M. Potencial alelopático de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (Cham.) Sandw. **Floresta e Ambiente**, v.8, p.130-136, 2001.

RASCHE, F.; KNAPP, D.; KAISER, C.; KORANDA, M.; KITZLER, B.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; RICHTER, A.; SESSITSCH, A. Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal communities in soils of a temperate beech forest. **Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology**, v.5, p.389-402, 2011.

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

RODRIGUES, J.L.M.; PELLIZARI, V.H.; MUELLER, R.; BAEK, K.; JESUS, E.C.; PAILA, F.S.; MIRZA, B.; HAMAOU, G.S.; TSAI, S.M.; FEIGL, B.; TIEDJE, J.M.; BOHANNAN, B.J.M.; NUSSLEIN, K. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **PNAS Simplified Online Submission**, v.110, p.988-993, 2013.

RUBEL, T.K.; PAUL, B.; WHITE, D.; RAO, I.M.; HOEK, R.V.D.; CASTRO, A.; BOVAL, M.; LERNER, A.; SCHNEIDER, L.; PETERS, M. LivestockPlus: forages, sustainable intensification, and food security in the tropics. **Royal Swedish Academy of Sciences**, v.44, p.685-693, 2015.

SAMPAIO, H.N.; SILVA, P.S.L.; MONTEIRO, A.L.; TAVELLA, L.B.; OLIVEIRA, V.R. Weed management in maize using hoeing and intercropping with *Mimosa caesalpiniaefolia*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.19, p.541-547, 2015.

SANTOS, M.C.M.; SANOTS, D.R.; BAKKE, O.A.; BAKKE, I.A. Ocorrência e atividade de bactérias diazotróficas em forrageiras cultivadas na região semiárida no Brasil. **Revista Caatinga**, v.26, p.27-34, 2013.

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; OROZCO-MOSQUEDA, M.C.; GLICK, B. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v.183, p.92-99, 2016.

SHEARER, G.; KOHL, D.H. N₂-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. **Australian Journal Plant Physiol**, v.3, p.699-756, 1986.

SILVA A.B.; LIRA JÚNIOR, M.A.L.; DUBEUX JÚNIOR, J.C.B.; FIGUEIREDO, M.V.B.; VICENTIN, R.P. Estoque de serapilheira e fertilidade do solo em pastagem degradada de *Brachiaria decumbens* após implantação de leguminosas arbustivas e arbóreas forrageiras. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.37, p.502-511, 2013.

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. **Archivos de Zootecnia**, v.59, p.21-30, 2010.

SILVA, M.C.P.; FIGUEIREDO, A.F.; ANDREOTE, F.D.; CARDOSO, E.J.B.N. Plant growth promoting bacteria in *Brachiaria brizantha*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.29, p.163-171, 2013.

SILVEIRA, M.F.; DIAS, A.M.O.; MENEZES, L.F.G.; MARTINELLO, C.; VONZ, D.; CAREGNATTO, N.E. Produção e qualidade de forragem de cornichão sobressemeado em diferentes densidades de semeadura em pastagem de estrela africana e azevém. **Bioscience Journal**, v.31, p.1801-1808, 2015.

SMITH, A.P.; MARÍN-SPIOTTA, E.; BALSER, T. Successional and seasonal variations in soil and litter microbial community structure and function during tropical postagricultural forest regeneration: a multiyear. **Change Biology Global**, v.21, p.3532-3547, 2015.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. **Journal Bacteriol**, v.177, p.1414-1417, 1995.

TRIVELIN, P.C.O.; SALATI, E.; MATSUI, E. **Preparo das amostras para análise de 15N por espectrometria de massa**. 2.ed. Piracicaba, CENA, 1973. 41p.

WARDLE, D.A. Controls of temporal variability of the soil microbial biomass: a global-scale synthesis. **Soil Biology Biochem**, v.30, p.1627-1637, 1998.

WEMHEUER, F.; WEMHEUER, B.; KRETZSCHMAR, D.; PFEIFFER, B.; HERZOG, S.; DANIEL, R.; VIDAL, S. Impact of grassland management regimes on bacterial endophyte diversity differs with grass species. **Letters in Applied Microbiology**, v.62, p.323-329, 2016.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As inoculações e co-inoculações de bactérias diazotróficas e com outras características de promoção de crescimento de planta em sementes de *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk proporcionaram incremento na germinação, crescimento inicial de plântulas com até 21 dias, e nas características morfológicas e fisiológicas, além da produtividade vegetal sob estresse de corte com intervalos de 35 dias, assemelhando-se ou igualando-se à adubação química. Tendo as bactérias homologas a *B. decumbens* e com alta produção de ácido indol acético proporcionado os maiores crescimentos no vegetal.

A presença das leguminosas arbóreas Gliricídia e Sabiá em pastagens de *B. decumbens* sob sistema silvipastoril e a sazonalidade climática influenciaram a densidade e a variabilidade genética das comunidades bacterianas diazotróficas e totais associadas ao nicho rizosfera da gramínea. Bem como, promoveram alteração na produção da massa de forragem, N total e relação C/N, além do percentual de N nas plantas fixado biologicamente e conseqüentemente a de N fixado biologicamente por m².

ANEXOS

Sequenciamento parcial do isolados bacterianos inoculados e co-inoculados no Capítulo 2

Código do isolado	Identificação bacteriana por sequenciamento parcial	Identificação	N access
UAGB1	<i>Pantoea vagans</i> C9-1 strain C9-1 16S ribosomal RNA, complete sequence	92%	NR_102966.1
UAGB10	<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames strain Ames 16S ribosomal RNA, complete sequence	98%	NR_074453.1
UAGB60	<i>Klebsiella variicola</i> At-22 strain At-22 16S ribosomal RNA, complete sequence	96%	NR_074729.1
UAGB69	<i>Enterobacter kobei</i> strain CIP 105566 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	NR_028993.1
UAGB70	<i>Microbacterium saccharophilum</i> strain K-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	NR_114342.1
UAGB71	<i>Sinomonas atrocyanea</i> strain DSM 20127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	NR_026196.1
UAGB80	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> strain DSM 30198 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	NR_104893.1
UAGB93	<i>Burkholderia lata</i> strain 383 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	98%	NR_102890.1
UAGB94	<i>Burkholderia territorii</i> strain LMG 28158 16S ribosomal RNA, partial sequence	97%	NR_136496.1
UAGB105	<i>Burkholderia territorii</i> strain LMG 28158 16S ribosomal RNA, partial sequence	98%	NR_136496.1
UAGB106	<i>Burkholderia lata</i> strain 383 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	97%	NR_102890.1
UAGB110	<i>Enterobacter kobei</i> strain CIP 105566 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	NR_028993.1
UAGB119	<i>Enterobacter kobei</i> strain CIP 105566 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	NR_028993.1
UAGB128	<i>Ralstonia pickettii</i> 12J strain 12J 16S ribosomal RNA, complete sequence	97%	NR_102967.1
UAGB139	<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054 strain AU 1054 16S ribosomal RNA, complete sequence	98%	NR_074686.1
UAGB147	<i>Rhizobium cauense</i> strain CCBAU 101002 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	NR_133049.1
UAGB150	<i>Rhizobium cauense</i> strain CCBAU 101002 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	NR_133049.1
UAGB154	<i>Klebsiella variicola</i> strain F2R9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	NR_025635.1
UAGB156	<i>Klebsiella variicola</i> At-22 strain At-22 16S ribosomal RNA, complete sequence	96%	NR_074729.1
UAGB167	<i>Rhizobium hainanense</i> strain I66 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	NR_029195.1