

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO BAG DE CAPIM-BUFFEL DA EMBRAPA
SEMIÁRIDO E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA À INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS

Lucas Sampaio Araujo

Orientadora: Dr^ª. Marilza Neves do Nascimento

Co-orientador: Dr. Paulo Ivan Fernandes Junior

Feira de Santana-BA

2018

LUCAS SAMPAIO ARAUJO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO BAG DE CAPIM-BUFFEL DA EMBRAPA
SEMIÁRIDO E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA À INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação
em Recursos Genéticos Vegetais na Universidade
Estadual de Feira de Santana para obtenção do título de
Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Dr^a Marilza Neves do Nascimento

Co-orientador: Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior

Feira de Santana-BA

2018

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

A69c Araujo, Lucas Sampaio
Caracterização molecular do BAG de capim-buffel da Embrapa semiárido e avaliação da resposta à inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal / Lucas Sampaio Araujo . - 2018.
59 f.: il.

Orientadora: Marilza Neves do Nascimento.
Coorientador: Paulo Ivan Fernandes Júnior.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2018.

1. *Cenchrus ciliaris*. 2. Capim-buffel – Melhoramento genético. I. Nascimento, Marilza Neves do, orient. II. Fernandes Júnior, Paulo Ivan, coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 582.542.1

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega

Prof^a. Dr^a. Claudinéia Regina Pelacani Cruz

Dr. Paulo Ivan Fernandes Junior
Co-orientador e Presidente da Banca

Feira de Santana - BA

2018

A minha mãe Socorro Sampaio que sempre batalhou para que eu pudesse chegar onde cheguei.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Grato a Deus pela permissão de desenvolver esse trabalho com sabedoria para superar os obstáculos da pesquisa e pelas bênçãos que me alcançam diariamente.

A minha família que foi e é a base da minha educação, principalmente a minha mãe Socorro Sampaio com seu amor incondicional. Agradeço aos meus primos Bianca Sampaio e Marcos Sampaio pelo apoio na cidade de Feira de Santana e pelos momentos tristes e felizes que partilhamos juntos.

Agradeço imensamente aos meus orientadores Dr.^a Marilza Neves do Nascimento e ao Dr.^o Paulo Ivan Fernandes Júnior, juntamente com a parceria com a Dr.^a Rafaela Priscila Antônio, pelo empenho em produzir esse trabalho e contribuir para ciência desse país. Agradeço pela experiência, conhecimento, maturidade adquiridos com os mesmos e com o apoio mesmo fora do ambiente de trabalho.

Aos amigos que fiz desde o estágio, aprendi muito trabalhando com Deisy Aiane, Tiago Lima, Eliza Maiara, Pedro Mendonça, Roberta Machado, Evelyn Sophia, Vanessa Meyla e a minha orientadora de estágio Dr.^a Maria Aldete que me despertou o interesse e o gostar de trabalhar com plantas forrageiras em prol do nosso semiárido.

Aos meus amigos Bárbara Laís, Eliza Maiara que foram meu refúgio em todos os momentos em Feira de Santana, incluindo o momento da realização da seleção de ingresso. A todos os meus parceiros e parceiras que convivi em Feira de Santana, advindos também de Juazeiro e Petrolina, Robson Souza, Washington Pacheco, Larissa Emanuelle, Evelyn Sophia, Bruna Thaís, Bruno Djvan.

Aos amigos que fiz na oportunidade, Fabrício, Marcelo, Aline, Sammya, Gilmara, Patrícia, aos meus colegas de classe, principalmente Lilian Mascarenhas que fiz uma amizade forte e que sempre me apoiou e me deu forças nesse período.

Aos colegas e amigos que fez no período de desenvolvimento do trabalho na Embrapa Semiárido, sendo de fundamental importância pro desenvolvimento da ciência, pois todos se empenham nesse sentido, Reginaldo Neto, Jéssica Fernanda, Tainá Dourado, Tailane Ribeiro, Jonnathan, Marcos Moura, Samuel Peters, Cláudia, Paula Sayanne, Thaíse Rosa, Beatriz, Gilmar, Rejane, aos técnicos José Barros, Luiz e Hebert e todos os funcionários que contribuíram de alguma forma nesse trabalho.

Agradeço a FAPESB e CAPES pela concessão da bolsa, a Embrapa Semiárido pela disponibilização da infraestrutura para realização dos trabalhos, a Universidade Estadual de Feira de Santana por me proporcionar conhecimento, aprendi muito, a todos os professores do programa de pós graduação em Recursos Genéticos Vegetais, em especial a professora e coordenadora Dr.^a Claudinéia Pelacani pela dedicação para com o curso e para com os alunos, sempre nos ajudando a resolver os problemas enfrentados.

Por fim, grato a todos que contribuíram de alguma forma para que esse trabalho pudesse ser concluído com sucesso.

“O espírito que me motiva não dorme, não morre e também não me abandona”.

Pregador Luo

RESUMO

O capim-buffel (*Cenchrus ciliaris*), apresenta grande importância para a região semiárida por se tratar de uma planta forrageira adaptada às condições edafoclimáticas da região, como altas temperaturas, estresse hídrico e alta salinidade dos solos. O principal mecanismo reprodutivo desta espécie ocorre por apomixia, já que a reprodução sexuada não ocorre frequentemente nesta espécie. Sabendo-se da importância desta espécie para o semiárido, foi criado pela Embrapa semiárido o Banco Ativo de Germoplasma (BAG), que possui 115 acessos registrados. Porém torna-se necessário a realização de estudos que investiguem o mecanismo reprodutivo e a variabilidade genética destes acessos, para selecionar aqueles que possuem mecanismo de reprodução sexuada e que posteriormente possam ser utilizados no processo de melhoramento genético da cultura. A avaliação de diversidade genética permite selecionar acessos distintos para realizar trabalhos de interação com bactérias promotoras de crescimento vegetal analisando a capacidade de simbiose entre planta/hospedeiro. A fixação biológica de nitrogênio em gramíneas pode promover incrementos significativos de produtividade, acúmulo de nitrogênio, entre outras características, proporcionando a redução de uso de fertilizantes químicos para promoção de economia financeira e redução de impactos ambientais. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização molecular e a resposta de cinco acessos de capim-buffel submetidos à inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal. Para a caracterização molecular dos 115 acessos do BAG da Embrapa Semiárido, foram utilizados marcadores específicos para a identificação do modo reprodutivo (SSR e SCAR) e diversidade genética (ISSR). Após a caracterização molecular, foi realizado um experimento em vasos a pleno sol na Embrapa Semiárido, com delineamento experimental em blocos ao acaso com 4 repetições para avaliação de características fisiológicas utilizando 5 acessos geneticamente divergentes (CPATSA 134; CPATSA 432; CPATSA 558; CPATSA 572; Biloela) submetidos a inoculação com 8 bactérias promotoras de crescimento vegetal, além dos tratamentos controle absoluto e com adição de N mineral na forma de ureia. As bactérias utilizadas neste experimento foram *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, B10, B11, B12, B13, B16 isoladas anteriormente do buffel e S14 do sorgo na qual encontram-se armazenados na coleção da Embrapa Semiárido. Foram identificados 2 acessos sexuais (CPATSA 102; CPATSA 134) dentre os 115 presentes no BAG. Esses acessos podem ser incorporados em programas de melhoramento genético da espécie. O genótipo Biloela e o acesso CPATSA 134 responderam significativamente para as características Massa Seca da Parte Aérea (MSPA) e Nitrogênio Total (NTOT) quando inoculados com *Azospirillum brasilense*. O acesso CPASA 134 tem potencial para ser comercializado por ter apresentado resultado similar ao genótipo Biloela (comercial).

Palavras-chave: *Cenchrus ciliaris*, acúmulo de N, fixação biológica de nitrogênio, caracterização molecular.

ABSTRACT

Buffel grass (*Cenchrus ciliaris*) is of great importance for the semiarid region as a forage plant adapted to the region's edaphoclimatic conditions region, such as high temperatures, water stress and high salinity of the soils. The main reproductive mechanism of this species occurs due to apomixis, since sexual reproduction is not available. Considering the importance of the species to the semi-arid region, Embrapa Semiárido created the Active Germplasm Bank (BAG), which has 115 accessions. Therefore, it is necessary to carry out studies that investigate the genetic and reproductive mechanisms of these accesses to determine the mechanism of sexual reproduction that presents itself in a process of genetic improvement of the culture. Genetic diversity evaluation allows for the selection of different accessions to perform diazotrophic interaction works, analyzing the capacity of symbiosis between plant / host. Biological nitrogen fixation in grasses can promote significant increases in productivity, nitrogen accumulation, and among other characteristics, reduce the use of chemical fertilizers to promote financial savings and reduce environmental impacts. The objective of this work was to perform the molecular and the response of five accessions of buffel grass accesses through inoculation with diazotrophic bacteria. For the molecular characterization of the 115 accessions of the Embrapa Semiárido BAG, specific markers were used for the identification of the reproductive mode (SSR and SCAR) and genetic diversity (ISSR). After the molecular characterization, an experiment was carried out in pots without shade at Embrapa Semiárido. The experimente was a randomized block design with 4 replicates to evaluate the physiological characteristics using 5 genetically divergent accessions (CPATSA 134; CPATSA 432; CPATSA 558; CPATSA 572; Biloela) submitted to inoculation with 8 plant growth promoting bacteria. These accessions and bacteria were compared to absolute control treatments and pots treated with mineral N in the form of urea. The bacteria used in this experiment were *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, B10, B11, B12, B13, B16 B16 previously isolatated from buffel, S14 from sorghum. The bacteria strains from the Embrapa Semiárido collection. Two sexual accesses (CPATSA 102; CPATSA 134) were identified among the 115 in the BAG. These accesses can be incorporated into breeding programs of the species. The Biloela genotype and the CPATSA 134 access had significantly higher Shoot Dry Mass (MSPA) and Total Nitrogen (NTOT) characteristics when inoculated with *Azospirillum brasilense*. The CPASA 134 access has the potential to be marketed, because it presented similar results to the Biloela (commercial) genotype.

Keywords: *Cenchrus ciliaris*, plant physiology, biological nitrogen fixation, molecular characterization.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição global do capim-buffel. Ocorrência ausente ou sem informação nas áreas em bege; Nativo em áreas verdes como África, Índia e Indonésia; Exótico em áreas vermelhas como Brasil, México, Austrália; Presente, podendo ser nativo ou exótico nas áreas em amarelo como na República Centro-Africana, Omã e Somália. **17**
- Figura 2.** Formação de nódulos em raiz de soja resultante da simbiose entre a planta hospedeira e *Rhizobium japonicum* **(a)**; Aumento do crescimento radicular em milho inoculado com *Azospirillum brasilense*. Simbiose em gramíneas não apresenta formação de nódulos **(b)**. **25**
- Figura 3.** Vista frontal do Banco Ativo de Germoplasma de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido **(a)**. Folhas jovens dos acessos foram coletadas para a caracterização molecular **(b)**. Vista diagonal do Banco Ativo de Germoplasma de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido **(c)**. Vista panorâmica do Banco Ativo de Germoplasma de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido **(d)**. Atualmente o banco conserva 115 acessos de capim-buffel. **31**
- Figura 4.** Turbidez do meio de cultura Dygs líquido comprovando crescimento da bactéria B10. **37**
- Figura 5.** Medição de comprimento de raiz do acesso CPATSA 432 em tratamento testemunha absoluta realizada com auxílio de uma régua. **38**
- Figura 6.** Gel de eletroforese com marcadores específicos associados à sequência de apomixia da região genômica em acessos de capim-buffel do BAG de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido. **M:** Marcador 100 pares de base; **C:** Reagente controle **39**
- Figura 7.** Gel de eletroforese com marcador específico associado à região sexual reprodutiva (4HS*) revelando a identificação de acessos do BAG de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido com modo de reprodução sexual. **M:** Marcador 100 pares de base; **C:** Reagente controle. **41**
- Figura 8.** Gel de eletroforese revelando polimorfismo entre os genótipos no uso dos marcadores D12 e HB14. **M:** Marcador 100 pares de base; **C:** Reagente controle **42**
- Figura 9.** Dendrograma de dissimilaridade obtido pelo método UPGMA mostrando o agrupamento dos acessos do BAG de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido. Colunas a direita: Registro CPATSA; Espécie/Cultivar; Procedência. **45**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação e informações dos acessos de capim-buffel do BAG da EMBRAPA semiárido.	32
Tabela 2. Marcadores específicos associados à sequência de apomixia da região genômica (ASGR), mostrando as sequências frente e reverso e número de pares de base do amplificado.	34
Tabela 3. Marcador específico associado à região genômica sexual reprodutiva em capim-buffel, mostrando as sequências frente e reverso e número de pares de base do amplificado.	35
Tabela 4. Análise do solo utilizado no experimento de inoculação de bactérias, quanto as suas características químicas.	36
Tabela 5. Primers ISSR com sequência, número de fragmentos amplificados e número de fragmentos polimórficos.	43
Tabela 6. Altura de planta (ALT), comprimento de raiz (CR), massa seca da raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), clorofila A (CFA), clorofila B (CFB), clorofila total (CFTOT), nitrogênio total (NTOT), teor de nitrogênio (NTEOR) de cinco acessos de capim buffel inoculados com <i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Herbaspirillum seropedicae</i> , bactérias nativas do buffel, bactéria nativa do sorgo, testemunha nitrogenada e absoluta	49

LISTA DE SIGLAS

ASRG – Apomixis Sequence Genomic Region

BAG – Banco Ativo de Germoplasma

BPCP – Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas

FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio

ha – Hectares

ISSR – Inter Simple sequence repeats

MM – Milímetros

MS – Matéria Seca

N – Nitrogênio

PB – Pares de Base

PB – Proteína Bruta

PCR – Reação em cadeia de polimerase

PE – Pernambuco

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA

RPM – Rotação por minuto

SCAR – Sequence Characterized Amplified Region

SSR – Simple Sequence Repeats

STS – Sequence Tagged Sites

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	15
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Aspectos gerais do Capim-Buffel (<i>Cenchrus ciliaris</i> L.).....	17
2.2 Reprodução.....	19
2.3 Características agronômicas	20
2.4 Marcadores moleculares	21
2.4.1 Marcadores SSR (Simple sequence repeats)	23
2.4.2 Marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Region).....	24
2.4.3 Marcadores ISSR (Inter Simple sequence repeats)	25
2.5 Fixação biológica de nitrogênio.....	25
3.0 OBJETIVOS	31
4.0 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Material Vegetal	31
4.2 Extração de DNA.....	34
4.3 Marcadores SSR (Simple Sequence Repeats)	34
4.4 Marcador SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)	35
4.5 Marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)	36
4.6 Experimento em vasos.....	37
4.7 Crescimento bacteriano	38
4.8 Avaliação de promoção de crescimento vegetal	39
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 Identificação do Modo Reprodutivo	40
5.2 Diversidade Genética do BAG	43
5.3 Avaliação de promoção de crescimento vegetal	47
6.0 CONCLUSÃO.....	52
7.0 REFERÊNCIAS.....	52

1.0 INTRODUÇÃO

A família Poaceae consiste em numerosas espécies que se adaptam em diferentes condições agroclimáticas e tipos de solos, desde o mais salino ao arenoso com deficiência de nutrientes. Essa família de plantas foi explorada para diferentes fins, como alimentos, forragem e energia, sendo ela conhecida por sua adaptabilidade a vários estresses abióticos como temperaturas extremas, estresse hídrico do solo e alta salinidade. O gênero *Cenchrus*, de origem africana, é bastante resistente e se estabelece em trópicos áridos e semiáridos que são caracterizados por baixos índices pluviométricos e altas temperaturas durante o verão (SYAMALADEVI et al., 2016).

O capim-buffel (*Cenchrus ciliaris*) é uma gramínea forrageira altamente tolerante à seca e utilizada principalmente como forragem em regiões áridas e semiáridas. Seu modo reprodutivo é principalmente apomítico (reprodução clonal) e a obtenção de genótipos sexuais obrigatórios ou apomíticos facultativos, com altos níveis de sexualidade, é necessária para a realização de cruzamentos dentro dos programas de melhoramento genético da espécie (QUIROGA et al., 2013).

Sabendo da importância relevante da espécie, torna-se necessário obter informações sobre o modo reprodutivo e a diversidade genética do capim-buffel. A Embrapa Semiárido tem um banco de germoplasma (BAG) com 115 genótipos obtidos desde a década de 1960 e provenientes de diversas partes do mundo. A realização de avaliações de variabilidade genética e características agronômicas destes materiais são importantes para avançar na seleção de genótipos para aplicações agrícolas e para indicar genótipos para os programas de melhoramento genético.

Os marcadores moleculares complementam as técnicas já existentes possibilitando discriminar os acessos de forma genotípica diretamente no DNA evitando o efeito ambiental e conseqüentemente erros de identificação (SOUZA, 2015; BORBA et al., 2005). Os marcadores Simple Sequence Repeats (SSR), Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) e Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) podem ser úteis na análise do modo reprodutivo e na diversidade genética dos acessos do BAG. A detecção do modo de reprodução é importante, pois, permite utilizar esses acessos no melhoramento genético

vegetal da espécie com a seleção de características de interesse para serem realizados cruzamentos convencionais, a fim de que, essas características possam ser passadas de geração em geração. Além disso, as informações geradas através da caracterização molecular podem ser utilizadas para selecionar acessos geneticamente diferentes para possíveis associações com bactérias diazotróficas que na maioria das vezes é desconhecido ou não acessível para o pequeno produtor.

Com o intuito de contribuir para o agricultor familiar do nordeste brasileiro, buscou-se gerar informações a fim de, proporcionar economia e rentabilidade para estes produtores. A inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio que tem a capacidade de promover o crescimento vegetal, é uma alternativa para o aumento da produção e com redução dos custos e dos impactos ambientais da atividade agrícola.

O nitrogênio (N_2) constitui aproximadamente 78% dos gases atmosféricos, porém, desse modo, não é assimilável pelas plantas. Alguns micro-organismos, através da ação de um complexo enzimático chamado nitrogenase, são capazes de romper a tripla ligação do N_2 e reduzi-lo a amônia, sendo assim, assimilável pelas plantas, esse processo é chamado de fixação biológica de nitrogênio (FBN).

As bactérias responsáveis por realizar esse processo são chamadas de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP) tendo como exemplo a espécie *Azospirillum brasilense* utilizada em larga escala com quatro estirpes comerciais para o milho, trigo, arroz e *Brachiaria* no Brasil. As bactérias diazotróficas associadas com o capim-buffel podem influenciar positivamente nas características fisiológicas da planta, tais como, crescimento, taxa fotossintética, teor de clorofila, área foliar e nitrogênio, podendo ainda promover um aumento significativo na qualidade da forragem. Por fim, devido às dificuldades enfrentadas pelo agricultor do semiárido no nordeste brasileiro, essa associação simbiótica planta/bactéria poderá promover, de forma direta ou indireta, uma melhoria na qualidade de vida desses agricultores, seja pela economia com a redução dos custos na utilização de fertilizantes nitrogenados, pela melhoria na qualidade e na produtividade da forragem e/ou pela remediação ou recuperação de solos degradados, contribuindo também com o meio ambiente.

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais do capim-buffel (*Cenchrus ciliaris* L.)

O capim-buffel é uma planta originária do continente africano, pertencente à família Poaceae, subfamília Panicoideae, gênero *Cenchrus*, espécie *Cenchrus ciliaris* (AYERSA, 1981).

Cenchrus ciliaris possui grande importância em todo o planeta entre as demais forrageiras perenes do mundo, principalmente, devido a sua capacidade de resistir a longos períodos de seca. É cultivada em larga escala na Austrália, África do Sul e Índia (BHAT et al., 2001).

Devido à devastação da vegetação nativa, as alternativas de alimentação animal tornaram-se ainda mais escassas. Contudo, busca-se agregar novas fontes viáveis para alimentação animal. As avaliações de plantas forrageiras são realizadas para a formação de pastagens de boa qualidade, buscando unir características importantes para uma determinada região. Alta produtividade juntamente com tolerância à seca nas épocas de estiagem são características importantes para plantas forrageiras adaptadas ao semiárido brasileiro. Dentre as forrageiras destaca-se o capim-buffel (*Cenchrus ciliaris*) (MOREIRA et al., 2007). Atualmente, o capim-buffel é uma gramínea que vem se destacando quando se trata em pastagens cultivadas comparando às outras forrageiras nas regiões secas como o Semiárido nordestino.

Ultimamente têm-se observado um aumento significativo nas atividades agropecuárias no Semiárido nordestino, estando atrelado ao sistema de implantação do buffel na caatinga. Esta implementação tem sido uma importante estratégia de complemento da vegetação para alimentação animal principalmente nas épocas de estiagem na região (MOREIRA et al., 2007; MOREIRA et al., 2015).

Na Austrália, o capim-buffel foi introduzido acidentalmente na década de 1870 e aos poucos naturalizado em várias áreas no noroeste do país mas, foi introduzido intencionalmente como uma espécie para pastagem em 1920, na qual tornou-se bastante explorado por apresentar resistência a seca e uma vez estabelecido no pasto pode suportar pastejos contínuos (MARSHALL et al., 2012; WHITE 1996).

Na América, a espécie foi introduzida pela primeira vez nos Estados Unidos em 1917 como material experimental de pastagem, contudo, os resultados das primeiras avaliações não foram satisfatórios. Após trinta anos, em 1947, foi cultivada com sucesso no Texas e em 1950, quando o estado estava em seu sétimo ano de seca, o capim tornou-se comerciável, onde, floresceu sob condições de seca. Em 1985, já haviam sido plantados mais de 4 milhões de hectares de buffel em terras agrícolas estadunidenses (MARSHALL et al., 2012).

De acordo com o Global Biodiversity Information Facility, o capim-buffel também está presente nos países da América Central, tais como, El Salvador e Honduras. Na América do Sul está representado pelo Brasil, Bolívia e Venezuela.

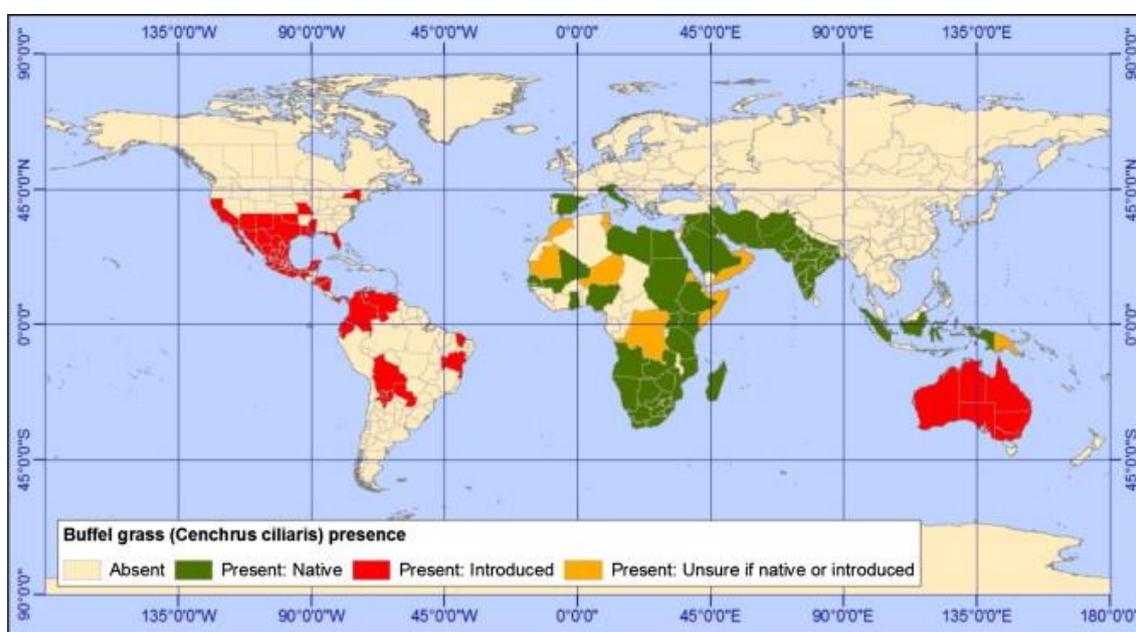


Figura 1. Distribuição global do capim-buffel. Ausente ou sem informação nas áreas em bege; Nativo em áreas verdes como África, Índia e Indonésia; Exótico em áreas vermelhas como Brasil, México, Austrália; Presente, podendo ser nativo ou exótico nas áreas em amarelo como na República Centro-Africana, Omã e Somália. Fonte: Marshall et al. 2012.

A espécie chegou ao Brasil em 1952, no Estado de São Paulo, de onde foi trazida para o Nordeste e após passar por alguns testes, demonstrou possuir várias características relevantes para o Semiárido nordestino, como boa produtividade, tolerância ao déficit hídrico e a baixos índices pluviométricos (<100 mm anuais), permanecendo no campo por um longo período, sem se decompor (OLIVEIRA et al., 1999). Após a realização dos testes e dos resultados obtidos, o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de plantas forrageiras da Embrapa Semiárido localizado em Petrolina-PE adotou o capim-buffel como uma espécie exótica forrageira com potencial para a região, desenvolvendo trabalhos

com intuito de agregar informações sobre a espécie para os pecuaristas da região (OLIVEIRA et al.,1999).

2.2 Reprodução

As plantas em geral possuem basicamente dois modos reprodutivos, sendo eles, reprodução assexuada (reprodução sem fecundação) e reprodução sexuada (havendo a necessidade de fecundação do óvulo). A reprodução assexuada exteriormente se assemelha à sexuada e ocorre regularmente em algumas espécies do gênero *Cenchrus* (AYERSA, 1981). O termo mais usado a este tipo de reprodução assexuada em *Cenchrus* é apomixia, que pode ser de forma obrigatória ou facultativa.

A apomixia proporciona um meio de propagação clonal através das sementes, podendo ser dispersas pelo vento, água ou pelos animais. Em muitas espécies, a reprodução apomítica tem dominância sobre a reprodução sexuada, tendo em vista que, a ocorrência de plantas sexuais obrigatórias na população natural é rara, ocasionando redução na possibilidade de cruzamentos para o melhoramento genético de *Cenchrus ciliaris* por hibridização (KUMAR et al., 2015; YADAV et al., 2012).

Apesar de *Cenchrus ciliaris* ser uma espécie considerada apomítica, foram detectadas algumas plantas capazes de serem cruzadas e a manipulação dessas plantas deu origem a alguns híbridos. Nesses híbridos, características de interesse econômico (BASHAW et al., 1992). Com a identificação de plantas sexuais foi possível obter híbridos sexuais e apomíticos. Indivíduos híbridos demonstram segregação enquanto que os apomíticos mantêm suas características (OLIVEIRA et al.,1999).

O uso desses híbridos é a única alternativa para efetuar cruzamentos convencionais em programas de melhoramento genético (QUIROGA et al., 2013). Portanto, há possibilidade, através dessas hibridizações, serem lançadas novas variedades de capim-buffel com características diferentes das que já são existentes na atualidade. Quiroga et al. (2013) por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando marcadores ligados a apomixia e análise citoembriológicas, constatou que duas das doze plantas avaliadas em seu trabalho, mostraram altos percentuais de sexualidade e que essas plantas

continham traços promissores para características de interesse econômico e que esses genes poderiam ser transferidos para genótipos apomíticos.

2.3 Características agronômicas

O capim-buffel é uma espécie de ciclo de vida perene de crescimento vertical podendo alcançar 150 centímetros de altura a depender do genótipo. Apresenta raízes profundas e desenvolvidas, com a presença de rizomas desenvolvidos que permitem o adiamento da desidratação e a manutenção do turgor devido a sua capacidade em explorar água do solo. Os colmos são finos, com base avolumada, onde ocorre acúmulo de carboidratos, que lhe confere grande capacidade de rebrota após o período da seca. Graças a essa característica e por possuir gemas subterrâneas que dão origem aos perfilhos, o capim-buffel apresenta resistência à seca, ao fogo e ao pastejo intensivo (MONÇÃO et al., 2011; PUPO, 1979).

Mganga et al. (2010), avaliaram e demonstraram que a germinação das sementes da espécie, em condições controladas, com temperatura de 20°C, apresentou 42% de sementes germinadas, enquanto que, em condições ambientes, onde a temperatura era de 30°C, a germinação caiu para 12%, fortalecendo a idéia que altas temperaturas interfere diretamente na germinação das sementes. As sementes devem ser plantadas após, no mínimo, seis meses de colhidas, tempo necessário para quebra da dormência embrionária. Em um teste de germinação realizado na Embrapa Semiárido com sementes de uma variedade comercial, em câmara a 30°C, obteve-se 1% de germinação no dia da colheita, 20% três meses depois e 23% com seis meses após a colheita (OLIVEIRA, 1993).

O capim-buffel é utilizado principalmente para alimentação animal em épocas de estiagem podendo ser produzido e armazenado em forma de feno ou silo, tornando-se uma alternativa para agricultores familiares do semiárido brasileiro. Também é altamente nutritivo, sendo considerado excelente para pastagens em áreas de clima quente e seco. Valorizado pela sua produção de forragem palatável, resiste a períodos intensos de pastoreio durante períodos secos nos trópicos (QURASHI et al., 1993).

Essa forrageira apresenta alta digestibilidade da matéria seca e da proteína bruta, boa aceitação pelos animais e produção superior a seis toneladas

de matéria seca por hectare/ano (há/ano), porém, a produtividade do capim-buffel varia conforme o genótipo, local e condições de cultivo, podendo variar de 8 a 12 toneladas de matéria seca/hectare/ano (MS/ha/ano), teores de proteína bruta (PB) superiores a 10% da MS e valores de digestibilidade in vitro da matéria seca próximos a 60%, ou seja, valores considerados como bons para áreas áridas e semiáridas. (VOLTOLINI et al. 2010; OLIVEIRA et al., 1999.)

O capim-buffel teve grande aceitação por muitos pecuaristas do semiárido, tornando-se uma alternativa para alimentação animal, motivando as avaliações, na qual, abordaram várias características de interesse como cultivo, manejo e utilização. As pesquisas atuais sobre o capim-buffel são desenvolvidas para oferecer aos produtores diversas informações sobre os aspectos de cultivo, clima, solo, produtividade e mecanismo reprodutivo dessa forrageira (OLIVEIRA, 1993; OLIVEIRA, 1981; KUMAR, 2015).

2.4 Marcadores moleculares

Marcadores moleculares surgiram devido à necessidade de detecção de polimorfismo diretamente no DNA podendo ser analisado por dois seguintes métodos de identificação de marcadores: hibridização ou amplificação do DNA (FERREIRA E GRATAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998). Os marcadores moleculares, atualmente, são de extrema importância para análises genéticas pela facilidade, simplicidade e fácil manuseio da técnica, podendo ser usados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta. Alguns marcadores são mais apropriados que outros e utilizados conforme o objetivo proposto (COSTA, 2010).

Os primeiros marcadores moleculares foram os isoenzimáticos e a partir do desenvolvimento da técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR – Polymerase Chain Reaction), foi possível o surgimento de diversas classes como AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), entre outros proporcionando ao melhorista uma vasta quantidade de informações sobre a variabilidade genética da espécie (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998).

A PCR é uma técnica criada por Kary Mullis em meados dos anos 80 que revolucionou a biologia tanto na pesquisa visando o entendimento de processos

biológicos fundamentais como no melhoramento genético de plantas e animais. Essa descoberta levou Kary Mullis a ganhar o prêmio Nobel de medicina no início da década de 90. A PCR é uma tecnologia poderosa para estudos genéticos moleculares que reúne facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade e pode ser realizada em qualquer organismo vivo (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998).

A técnica de RAPD é usada para detecção de Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso, tendo uma vasta utilização, inclusive para caracterização de genótipos das mais diversas espécies de plantas (SOUZA, 2015). O produto da PCR em uma reação RAPD é revelado, geralmente, pela eletroforese em gel de agarose e corado com um agente intercalante de DNA e permitindo a sua visualização sob luz ultravioleta (SEMAGN et al., 2006).

Os marcadores gerados pela análise de Polimorfismos de Comprimento de Fragmento Amplificado (AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism), baseia-se na amplificação de subconjuntos de fragmentos de restrição genômica usando PCR. O DNA é clivado por enzimas de restrição e adaptadores de dupla-hélice são ligados às extremidades dos fragmentos do DNA para gerar o DNA do molde para a amplificação. Essa técnica se assemelha a técnica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism - Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição), uma vez que, à amplificação por PCR em AFLP é usada para detecção de fragmentos de restrição, ausência ou presença e a técnica RFLP indica as diferenças de comprimento dos fragmentos (VOS et al., 1995). Yang et al. (2005) utilizaram marcadores AFLP para diferenciar 14 acessos de umezeiro produtores de flores e utilizados na ornamentação. O trabalho mostrou resultados que possibilitaram detectar a divergência genética dos indivíduos estudados, concluindo eles que essa técnica é efetiva, barata e rápida para a diferenciação de cultivares de umezeiro.

A caracterização molecular permite obter informações para identificar acessos duplicados, identificar os modos de reprodução predominante na espécie, analisar a variabilidade genética entre os acessos, para selecionar acessos com características de interesse para inclusão nos programas de melhoramento genético vegetal (VALLS, 2007).

As características morfológicas baseiam-se em descritores a fim de obter informações que possam distinguir os acessos um do outro em condições de campo e tem importância para detecção de características de interesse nos

programas de melhoramento. Contudo, as características podem ser avaliadas de formas diferentes, caso haja mais de um avaliador, e sofrer influências ambientais. Dessa forma é possível ressaltar a importância dos marcadores moleculares que complementam as técnicas já existentes possibilitando discriminar os acessos de forma genotípica diretamente no DNA evitando o efeito ambiental e conseqüentemente erros de identificação (SOUZA, 2015; BORBA et al., 2005).

2.4.1 Marcadores SSR (Simple Sequence Repeats)

Sequências simples repetidas (SSR) ou microssatélites consistem de pequenas sequências com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem. A detecção de sequências SSR é feita através da PCR, utilizando eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. A visualização das bandas no gel pode ser feita diretamente por coloração com um agente intercalante de DNA, nitrato de prata ou através de autorradiografia ao se utilizar primers marcados com radioisótopos na reação de PCR (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998).

A rapidez da PCR combinada com as informações fornecidas por SSR deve tornar esses marcadores ferramentas valiosas para desenvolvimento de mapas moleculares, identificação de genótipos entre outros (AKKAYA et al., 1992).

Marcadores SSR foram utilizados por Quiroga et al. (2013); Jessup (2002); Jessup (2005) em acessos de *Cenchrus*. A identificação do método reprodutivo pode ser determinada usando esses marcadores moleculares específicos, através de PCR, que foram encontrados ligados a região genômica da apomixia (ASGR - Apomixis Sequence Genomic Region) em capim-buffel. Os autores relatam que as progênies obtidas a partir de cruzamentos controlados de linhas sexuais e cultivares apomíticas podem ser híbridos sexuais ou apomíticos.

Faleiro et al. (2003) avaliando ocorrência ou não da fecundação cruzada entre *Theobroma cacao* e *Theobroma grandiflora* com marcadores microssatélites (SSR) relata que esses marcadores são excelentes ferramentas para verificar o mecanismo reprodutivo de plantas. A análise é qualitativa referente à presença ou ausência de amplificação de bandas. Utilizando um ou dois primers ou uma combinação de primers com pelo menos uma banda

informativa é suficiente para confirmar ou não a ocorrência da fecundação cruzada. O autor conclui que os marcadores microssatélites se mostraram excelentes ferramentas para verificar a ocorrência ou não da fecundação cruzada entre as espécies estudadas. A metodologia pode ser utilizada para a identificação do mecanismo reprodutivo tanto em cruzamentos interespecíficos como em intraespecíficos, sendo uma metodologia rápida e confiável.

2.4.2 Marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)

O SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions – Regiões amplificadas caracterizadas por sequências) é amplificado com primers específicos, desenvolvidos com base em sequências já mapeadas ou caracterizadas, geralmente obtidos através da conversão dos marcadores RAPD. Os SCARs são vantajosos em relação aos marcadores RAPD, pois detectam apenas um único locus e sua amplificação é menos sensível às condições de reação e podem ser potencialmente convertidos em marcadores codominantes (PARAN e MICHELMORE, 1993).

Esses primers SCAR são utilizados para amplificar as regiões específicas do DNA genômico. O polimorfismo pode ser detectado diretamente pela presença ou ausência da banda por meio de amplificação de PCR e eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (ZACCARO et al., 2007; PARAN e MICHELMORE, 1993).

Devido à necessidade de obter marcadores confiáveis para detecção do modo de reprodução em gramíneas como o buffel, Kumar et al. (2016) iniciou uma busca à procura de marcadores simples, robustos e confiáveis, ligados aos modos de reprodução apomítica e sexual em *Cenchrus spp.* As análises de diversidade, baseadas em PCR no gênero estudado, resultaram na identificação de marcadores associados ao modo de reprodução, os quais foram convertidos com sucesso em SCAR (Região Amplificada Caracterizada por Sequência) e validados usando a população de mapeamento F2 de *C. ciliaris*. O autor conclui que estes marcadores são de grande importância para os programas de melhoramento genético, a fim de, obter informações relevantes sobre a espécie, tais como, identificação do modo de reprodução e análises de diversidade genética.

2.4.3 Marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)

As Inter Repetições de Sequência Simples (ISSR) são marcadores de sequência microssatélites com utilização em PCR para amplificação de DNA (SANCHES DE LA HOZ et al., 1996). A reação de PCR com marcadores ISSR é um método basicamente simples, efetivamente rápido e de baixo custo não necessitando de informação previa da sequência de DNA do organismo em estudo. A reação de PCR amplifica as sequências de diferentes tamanhos, variando de 200 a 2000 pares de base de fragmentos amplificados, podendo apresentar alta reprodutibilidade. O ISSR, através da reação em cadeia da polimerase, torna possível a determinação da diversidade genética, o mapeamento de genes e estudos filogenéticos em uma grande maioria de organismos vivos sem a necessidade do conhecimento prévio do DNA. Estes estudos são importantes para o uso de caracterização molecular em BAGs (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

Lima et al. (2011), relatam que tanto a técnica de RAPD quanto ISSR podem fornecer informações consistentes para a análise da diversidade em acessos de capim.

Al-Soqeer (2011), avaliando a diversidade genotípica entre populações selvagens de capim-buffel por marcadores ISSR, concluiu em seu trabalho que os dados obtidos por esses marcadores indicam que o buffel é praticamente invariante, demonstrando uma pobre diversidade genética em todas as populações estudadas. O uso de marcadores ISSR são eficientes para análise de diversidade genotípica no gênero *Cenchrus*.

2.5 Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio (N_2) constitui, aproximadamente, 78% dos gases atmosféricos, porém, nenhum animal ou planta consegue utilizá-lo como nutriente devido à tripla ligação que existe entre os dois átomos do N, que é uma das mais fortes de que se tem conhecimento na natureza.

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é um processo eficiente que fixa nitrogênio e desempenha um papel ambiental importante na remediação de solos. A FBN fornece nitrogênio assimilável para as plantas, tendo em vista que, pode constantemente sofrer variações de disponibilidade, tornando-se um fator

estressantes, pois, a deficiência de nitrogênio influencia fortemente na degradação de pastagens (MATTOS e MONTEIRO, 2003).

A disponibilidade de nutrientes, temperatura da água e do solo, variações de pH, entre outros fatores, influenciam significativamente o crescimento, a sobrevivência e a atividade metabólica de bactérias e plantas e sua capacidade de entrar em interações simbióticas entre si (MOHAMMADI et al. 2012; WERNER e NEWTON, 2005).

No Brasil, onde são cultivados em torno de 30 milhões de hectares com a cultura da soja, obtêm-se alta produtividade da cultura com sem a aplicação de fertilizantes nitrogenados. Ressalta-se que todo o N demandado pela cultura da soja é oriundo do N₂ atmosférico, através da fixação biológica de nitrogênio, o que equivale a 150 milhões de toneladas de nitrogênio, proporcionando uma economia de aproximadamente 3,2 bilhões de dólares para o país (HUNGRIA, 2011).

A fixação simbiótica do nitrogênio em soja, como representante da família leguminosa, ocorre em estruturas especializadas com a formação induzida pelas bactérias diazotróficas. Essas estruturas são chamadas de nódulos e são formadas nas raízes dessas plantas. Contudo, as gramíneas também podem desenvolver associações com bactérias diazotróficas, mas nessa associação os nódulos não são produzidos (figura 2) (TAIZ e ZEIGER, 2017).



Figura 2. Formação de nódulos em raiz de soja resultante da simbiose entre a planta hospedeira e *Rhizobium japonicum* (a); Aumento do crescimento radicular em milho inoculado com *Azospirillum brasilense*. Simbiose em gramíneas não apresenta formação de nódulos (b). Fonte: Taiz e Zeiger, 2017; Hungria, 2011

Com o aumento constante na demanda de produção de alimentos, aumenta também a necessidade de aplicar técnicas adequadas para aumentar a produtividade das culturas. A aplicação de fertilizantes nitrogenados requer alto custo para a atividade agrícola, contudo o uso de bactérias diazotróficas (fixadoras de N) é uma alternativa para redução do uso desses fertilizantes, além desses microrganismos terem a capacidade de promover o crescimento vegetal e gerar incrementos no desenvolvimento e na produtividade das culturas (BALDANI et al., 1997).

Fagan et al. (2007) considera que o processo de fixação de nitrogênio é dispendioso e que depende da interação entre bactéria e hospedeiro, a planta. E é dependente de fatores regulados pela planta e externos como disponibilidade hídrica, teor de oxigênio e adubação nitrogenada. Portanto, mais estudos sobre técnicas de manejo, como a adubação nitrogenada, são importantes para manter o equilíbrio entre a adição de N e a fixação biológica e gerar um impacto positivo na produtividade e a economia, pois ambos estão relacionados.

As bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) fazem parte de um grupo de micro-organismos capazes de se associar e colonizar raízes e tecidos internos das plantas proporcionando uma associação benéfica (DAVISON, 1988; KLOEPPER et al., 1989). E essas bactérias eram descritas por serem agentes patogênicos de baixa virulência, mas vários efeitos benéficos nas plantas hospedeiras foram descobertos, tais como a promoção do crescimento das plantas e uma maior resistência contra patógenos e parasitas (KLOEPPER 1997).

As BPCV influenciam tanto no aumento na resistência contra patógenos como na promoção de crescimento, atuando no crescimento e no aumento da produtividade das plantas (MARIANO e ROMEIRO, 2000).

Segundo Dartora et al. (2013), algumas bactérias são capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) e por isso são consideradas bactérias promotoras de crescimento vegetal. Dentre as bactérias promotoras de crescimento de plantas, destacam-se *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*. Essas espécies são bastante estudadas em associação com gramíneas, principalmente em milho, na qual, mostraram capacidade de promover um aumento na produtividade das culturas. Com isso, as espécies em

estudo podem substituir totalmente ou parcialmente o uso de fertilizantes nitrogenados.

Contudo, bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas do gênero *Azospirillum* são microrganismos de vida livre denominado diazotróficos endofíticos facultativos, podendo colonizar o interior e/ou a superfície das raízes (BALDANI et al., 1997).

De modo geral, o crescimento vegetal é aumentado devido as BPCV. Por atuarem na capacidade de fixar nitrogênio associativamente, solubilizar fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo e aumentar o comprimento das raízes. Como consequência pode ocorrer o aumento do número de pelos radiculares em consequência da produção ou alteração na concentração dos hormônios vegetais, tais como, ácido indol acético, giberelina, citocinina e etileno (CATTELAN, 1999).

Baldotto et al. (2010) avaliando o desempenho do abacaxizeiro “Vitória” propagado por cultura de tecidos em resposta à inoculação bacteriana, relatam que as BPCP causam efeitos benéficos tanto “*in vitro*” quanto “*in vivo*”. Tais bactérias promovem aumento de área foliar, altura da planta, diâmetro do caule, número de folhas, redução do tempo de aclimatização, maior sobrevivência de mudas, controle de doenças e aumento de produtividade.

A principal função da *Azospirillum brasilense* é a FBN devido à alta capacidade que essa bactéria possui em fixar N₂ de modo assimilável pela planta, principalmente em forma de amônia, sendo esse mecanismo muito complexo e não completamente elucidado (VOGEL et al., 2014). Contudo, o surgimento de interesse para com o gênero *Azospirillum* só foi possível após a redescoberta realizada por Döbereiner e Day em 1975, desencadeando trabalhos relativos à associação de bactérias diazotróficas com gramíneas (BALDANI, 1997).

Muitos estudos se voltam para o uso dessa espécie de bactéria como inoculante comercial, porém, esses estudos estão relacionados principalmente com culturas de grande interesse agrícola como o milho, trigo e *Brachiaria*. Informações acumuladas mundialmente indicam que bactérias do gênero *Azospirillum* são capazes de aumentar a produtividade de culturas agronomicamente importantes, em diferentes solos e regiões climáticas (VOGEL et al., 2014; OKON E ITZIGSOHN 1995; HUNGRIA et al., 2010; HUNGRIA et al.

2016). Poucos trabalhos foram realizados visando à agricultura familiar e a alimentação animal com forrageiras (VOGEL et al., 2014). O mesmo autor conclui que o uso de *Azospirillum brasilense* associado à produção de forrageiras apresenta resultados promissores, tanto em características agrônômicas quanto em fisiológicas e que são necessários mais estudos em relação à resposta fisiológica e bromatológica sob o efeito da inoculação dessa bactéria, em especial a área foliar e proteína bruta, respectivamente.

Estudos com estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Azospirillum lipoferum* desenvolvidos pela Embrapa Soja, demonstraram que a inoculação com *A. brasilense* nas culturas de milho e trigo proporcionou um aumento considerável de 24 a 30% na produção de grãos do milho em relação ao tratamento controle sem inoculação. Esses dados resultaram na identificação das primeiras estirpes autorizadas para a produção de inoculantes comerciais no Brasil (HUNGRIA et al., 2010).

A associação entre *Azospirillum* e hospedeiro eleva o nível de desenvolvimento, e esse fato ocorre em consequência ao aumento nas taxas de absorção de água e de minerais devido ao crescimento das raízes, e, em parte pela fixação biológica de N₂ (OKON e ITZIGSOHN, 1995).

Com o alto custo da fertilização nitrogenada no Brasil, com o preço médio dos fertilizantes no mercado nacional a US\$ 1 por kg de N, estima-se que o uso dos inoculantes contendo as estirpes selecionadas de *Azospirillum brasilense*, pode resultar em uma economia estimada de US\$2 bilhões por ano na cultura da soja, incluindo a redução de custos relacionados ao transporte do fertilizante nitrogenado (HUNGRIA, 2011). Outro fator de crucial importância na atualidade é a preservação ambiental. A FBN realizada pela *Azospirillum brasilense* proporciona menor poluição ambiental ao contrário dos resultados proporcionados pela adubação nitrogenada comercial. Desse modo, além da economia para os agricultores, o uso de inoculantes contendo *Azospirillum* contribui para o meio ambiente (Hungria, 2011).

O gênero *Herbaspirillum* é constituído de microrganismos diazotróficos endofíticos capazes de colonizar os tecidos radiculares internos e aéreos da planta, apresentando baixa sobrevivência no solo, e de ocorrência mais restrita do que outras espécies de BPCP (BALDANI et al., 1997; MOREIRA et al., 2010).

Apesar de sua baixa sobrevivência no solo esse gênero pode se tornar promissor colonizando tecidos internos de espécies de interesse comercial.

Os primeiros estudos com bactérias diazotróficas associadas a gramíneas no Brasil, apresentaram uma gama de diversidade desses microrganismos isolados, com maior relevância na cultura do milho, dentre os isolados estavam presentes bactérias do gênero *Herbaspirillum* (DÖBEREINER e BALDANI, 1982).

A colonização de *Herbaspirillum seropedicae* em trigo, milho, arroz e sorgo ocorre através da adesão da bactéria à superfície das raízes, em seguida coloniza os tecidos internos podendo alcançar o xilema e chegar à parte aérea da planta (RONCATO-MACCARI et al., 2003). O autor sugere em seu trabalho que bactérias do gênero *Herbaspirillum*, além de serem utilizadas em culturas de grande interesse econômico, possam também ser utilizadas para colonizar outras gramíneas.

Reis Júnior et al. (2000) encontraram bactérias diazotróficas do gênero *Herbaspirillum* em todas as partes da planta (raiz e parte aérea) na cultura da cana de açúcar, com distribuição homogênea em ambas as partes, sendo que, além do gênero ter sido encontrado em várias espécies da cultura, foram isoladas um grande número de bactérias em todas as variedades em estudo.

Viana (2012), após ter inoculado bactérias diazotróficas em arroz constatou em seu trabalho que a inoculação com *H. seropedicae* apresentou um aumento de 3,5% na altura das plantas. Guimarães et al. (2003) destacam que a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* em arroz promoveu aumentos de até 13,5% no acúmulo de matéria seca, 35% no acúmulo de nitrogênio, aumentou até 25% na produção de grãos e até 15% no acúmulo de N nos grãos em relação a testemunha absoluta. Na cultura de milho, Dotto et al. (2010) verificaram que a inoculação com *H. seropedicae* resultou em incremento de 8,6% na produtividade de grãos.

Esses dados fortalecem a ideia que bactérias diazotróficas são capazes de promover o crescimento vegetal e podem ser utilizadas em espécies de gramíneas forrageiras, no intuito de contribuir para a melhoria de vida do agricultor do semiárido através de uma maior produtividade e qualidade de forragem para alimentação animal.

Assim, a fixação biológica de nitrogênio através da associação das bactérias e raiz de gramíneas forrageiras pode ser importante para melhorar as condições no Semiárido, pois, o fornecimento de N via FBN pode melhorar a produtividade e o valor nutritivo das forrageiras. Pode ainda contribuir para o desenvolvimento socio econômico da região através da melhoria na qualidade de alimentação dos animais juntamente com a diminuição dos custos de produção (ANTUNES, 2016).

Contudo, nota-se a necessidade de aprimorar e expandir estudos sobre a espécie *Cenchrus ciliaris* e a possível combinação da planta com bactérias diazotróficas.

3.0 OBJETIVOS

Geral:

Caracterização molecular e resposta de cinco acessos de capim-buffel submetidos à inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal

Específicos:

- Confirmar o mecanismo reprodutivo e a variabilidade genética de 115 acessos de capim-buffel por meio de técnicas moleculares.
- Avaliar a resposta de acessos selecionados à inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal previamente selecionadas.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

O material genético utilizado no trabalho foi coletado no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *Cenchrus* localizado no campo experimental da Caatinga da Embrapa semiárido.



Figura 3. Vista frontal do Banco Ativo de Germoplasma de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido **(a)**. Folhas jovens dos acessos foram coletadas para a caracterização molecular **(b)**. Vista diagonal do Banco Ativo de Germoplasma de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido **(c)**. Vista panorâmica do Banco Ativo de Germoplasma de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido **(d)**. Atualmente o banco conserva 115 acessos de capim-buffel.

As etapas de coleta, armazenamento e maceração das amostras foram realizadas segundo Ferreira e Gratapaglia (1998). Duas folhas jovens expandidas de 115 acessos de capim-buffel foram coletadas e colocadas em microtubos de 2ml. Em seguida foram colocados imediatamente em uma garrafa térmica contendo nitrogênio líquido a fim de evitar a degradação do DNA e posteriormente levados ao laboratório de Microbiologia do Solo para serem armazenados em ultrafreezer a uma temperatura de -80°C e posteriormente realização das análises moleculares.

Tabela 1. Identificação e procedência dos acessos de capim-buffel do BAG da Embrapa semiárido.

CPATSA	Espécie	Procedência	CPATSA	Espécie	Procedência	CPATSA	Espécie	Procedência
Áridus	S/I*	S/I*	151	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	563	<i>C. ciliaris</i>	EUA
Biloela	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	152	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	568	<i>C. ciliaris</i>	EUA
Gayndah	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	154	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	570	<i>C. ciliaris</i>	EUA
Grey	S/I*	S/I*	155	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	571	<i>C. ciliaris</i>	EUA
Molopo	S/I*	S/I*	156	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	572	<i>C. ciliaris</i>	EUA
Numbank	S/I*	S/I*	158	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	573	<i>C. ciliaris</i>	EUA
3	S/I*	S/I*	164	S/I*	S/I*	574	S/I*	EUA
4	S/I*	S/I*	176	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	575	<i>C. ciliaris</i>	EUA
5	S/I*	S/I*	177	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	576	<i>C. ciliaris</i>	EUA
6	S/I*	S/I*	189	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	577	S/I*	EUA
52	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	192	<i>C. ciliaris</i>	Tanzânia	578	S/I*	EUA
53	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	193	<i>C. ciliaris</i>	Tanzânia	579	S/I*	EUA
57	S/I*	S/I*	194	<i>C. ciliaris</i>	Tanzânia	580	<i>C. ciliaris</i>	EUA
102	<i>C. ciliaris</i> X <i>Birdwood</i>	Brasil	195	<i>C. ciliaris</i>	Tanzânia	581	<i>C. ciliaris</i>	EUA
119	<i>C. ciliaris</i>	Índia	196	<i>C. ciliaris</i>	Tanzânia	582	<i>C. ciliaris</i>	EUA
120	<i>C. ciliaris</i>	Austrália	198	<i>C. ciliaris</i>	Tanzânia	584	<i>C. ciliaris</i>	EUA
121	<i>C. ciliaris</i>	Austrália	199	<i>C. ciliaris</i>	Tanzânia	585	<i>C. ciliaris</i>	EUA
122	<i>C. ciliaris</i>	Austrália	200	<i>C. ciliaris</i>	Tanzânia	588	<i>C. ciliaris</i>	EUA
123	<i>C. ciliaris</i>	Austrália	201	<i>C. ciliaris</i>	Tanzânia	589	S/I*	S/I*
124	<i>C. ciliaris</i>	EUA	237	S/I*	S/I*	590	<i>C. ciliaris</i>	EUA
125	<i>C. ciliaris</i>	EUA	302	<i>C. ciliaris</i>	Irã	591	<i>C. ciliaris</i>	EUA
127	<i>C. ciliaris</i>	EUA	312	S/I*	S/I*	592	<i>C. ciliaris</i>	EUA
128	<i>C. ciliaris</i>	EUA	432	<i>C. ciliaris</i>	Austrália	593	<i>C. ciliaris</i>	EUA
129	<i>C. ciliaris</i>	EUA	433	<i>C. ciliaris</i>	Austrália	595	<i>C. ciliaris</i>	EUA
130	<i>C. ciliaris</i>	EUA	434	<i>C. ciliaris</i>	Austrália	598	<i>C. ciliaris</i>	EUA
131	<i>C. ciliaris</i>	EUA	435	<i>C. ciliaris</i>	Austrália	599	<i>C. ciliaris</i>	EUA
132	<i>C. ciliaris</i>	EUA	436	<i>C. ciliaris</i>	Austrália	601	<i>C. ciliaris</i>	EUA
134	<i>C. ciliaris</i> X <i>C. setigerus</i>	Brasil	437	<i>C. ciliaris</i>	Austrália	602	<i>C. ciliaris</i>	EUA
136	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	438	<i>C. ciliaris</i>	Austrália	603	<i>C. ciliaris</i>	EUA
138	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	439	<i>C. ciliaris</i>	Austrália	608	<i>C. ciliaris</i>	EUA
140	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	616	S/I*	S/I*	609	<i>C. ciliaris</i>	EUA
141	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	126	<i>C. ciliaris</i>	EUA	611	<i>C. ciliaris</i>	EUA
144	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	541	<i>C. ciliaris</i>	Quênia	613	<i>C. ciliaris</i>	EUA
145	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	555	<i>C. ciliaris</i>	EUA	614	<i>C. ciliaris</i>	EUA
146	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	556	<i>C. ciliaris</i>	EUA	615	<i>C. ciliaris</i>	EUA
147	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	557	<i>C. ciliaris</i>	EUA	617	<i>C. ciliaris</i>	EUA
148	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	558	<i>C. ciliaris</i>	EUA	754	S/I*	S/I*
149	<i>C. ciliaris</i>	Brasil	559	<i>C. ciliaris</i>	EUA	7754	<i>C. ciliaris</i>	Brasil
150	<i>C. ciliaris</i>	Brasil						

S/I*: Sem Informação

4.2 Extração de DNA

Para a extração de DNA, as folhas jovens foram maceradas em nitrogênio líquido para romper as membranas celulares. A maceração foi feita com o auxílio de nitrogênio líquido e pistilo, nos respectivos tubos. Fez-se a desinfestação de todos os materiais utilizados por autoclave e/ou desinfestados com álcool 70% e hipoclorito a 1%. Após a maceração, as mesmas retornaram ao ultrafreezer a uma temperatura de -80°C.

Cerca de 40 mg do tecido vegetal macerado foi transferido para tubos de 1,5 ml para extração de DNA utilizando o kit comercial Promega – Wizard® Genomic DNA Purification Kit com as etapas descritas a seguir.

Foi adicionado aos tubos contendo as amostras 200 µl de tampão (Nuclei Lysis Solution) e incubado a 65°C em banho Maria por 15 minutos. Em seguida foi adicionado 1µl de RNase Solution e incubado a 37°C em banho Maria por 15 minutos. Logo após as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente por 5 minutos para prosseguir com a segunda etapa.

A segunda etapa iniciou-se com a adição de 67 µl de Protein Precipitation Solution e agitados com o uso do vortex. Os tubos foram levados a centrífuga a uma velocidade de 13.000 rpm por 3 minutos. Após a retirada dos tubos o sobrenadante foi transferido para novos tubos contendo 200 µl de álcool isopropílico em temperatura ambiente. Os tubos foram invertidos para homogeneizar a solução e levados novamente para a centrífuga a uma velocidade de 13.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e adicionado ao tubo 200µl de álcool 70% em temperatura ambiente. Em seguida foi feita uma nova centrifugação a uma velocidade de 13.000 rpm por 1 minuto. Logo após, o álcool foi descartado cuidadosamente para obtenção do pellet. Por fim, foi adicionado aos tubos contendo o pellet, 34µl de DNA Rehydration Solution, incubado a 65°C em banho Maria por 60 minutos e armazenados no freezer a uma temperatura de aproximadamente -4°C.

4.3 Marcadores SSR (Simple Sequence Repeats)

Para as reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizaram-se marcadores específicos associados à sequência de apomixia da região genômica (ASGR – Apomixis Sequence Genomic Region), (OZIAS-AKINS et al.

1998; JESSUP, 2005), sendo eles Q8H, UGT197 e PCAB10 detalhados na (tabela 2).

Tabela 2. Marcadores específicos associados à sequência de apomixia da região genômica (ASGR), mostrando as sequências frente e reverso e número de pares de base do amplificado.

Primer	Sequência	Amplicom (pb)	Referência
Q8H	F: GAGCTTGNCCAATCGGGAAA R: ATGGTGATGGATCTTTTGGAC	800	
UGT197	F: GGATGAATAAACGGTGTTGGGAG R: GAACAACCGCACAAGTGAGAGAA	850	Ozias-Akins et al. (1998)
PCAB10	F: TTCGAAATCGCATAGGTGAG R: GAGCCTTTCTTTATTTACCCAGTG	200	

A amplificação foi realizada segundo Griffa (2010), com algumas adaptações, com um volume final de 10 µl, contendo 1X buffer, 25 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 5 mM de cada marcador (frente e reverso), 5 U Taq DNA polimerase. As amostras de DNA foram acrescentadas ao mix e levadas ao termociclador Veriti Applied Biosystems com a seguinte programação: 94°C por 3 minutos e 10 ciclos de (94°C por 30 segundos, 64°C por 30 segundos (-1°C/ciclo) e 72°C por 45 segundos), seguido por 36 ciclos de (94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos), e a etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos. As amostras foram coradas com GelRed (proporção de 1:1) e aplicadas 10µl de cada em gel de agarose a 2% em TAE (Tris-Acido Acético -EdTA) em eletroforese com voltagem de 80 Volts durante 3 horas. As imagens foram visualizadas e capturadas sob luz UV em fotodocumentador modelo LPix Image (Loccus Biotecnologia). As imagens foram interpretadas qualitativamente quanto a presença (apomítico) ou ausência (sexual obrigatório) de bandas.

4.4 Marcador SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)

Para a reação de PCR, visando identificar genótipos sexuais, utilizou-se 1X buffer, 2mM de MgCl₂, 200µM dNTP, 0,05µM de cada primer (4HS* frente e reverso) e por fim 2U Taq DNA polimerase com volume final de 10 µl (YADAV et al., 2012) (tabela 3).

Tabela 3. Marcador específico associado à região genômica sexual reprodutiva em capim-buffel, mostrando as sequências frente e reverso e número de pares de base do amplificado.

Primer	Sequência	Amplicom (pb)	Referência
4HS*	F: AAGAGCAGGGGTTAGAGGTAA R: CACATTCAGCCTACGGAGTG	250	Yadav et al. (2012)

O DNA das amostras foi acrescentado ao mix e levado ao Termociclador Veriti Applied Biosystems com a seguinte programação: 94°C por 3 minutos, 34 ciclos (94°C por 1 minuto, 63°C por 1 minuto, 72°C por 1m30 segundos) e 72°C por 10 minutos. As amostras foram coradas com Gel Red (proporção de 1:1) e aplicadas 10 µl de cada em gel de agarose a 1,2% na presença de TBE (Tris/Borato/EDTA) em eletroforese submetidas a 80 Volts durante 3 horas. As imagens foram visualizadas e capturadas sob luz UV em fotodocumentador modelo LPix Image (Loccus Biotecnologia). As imagens foram interpretadas qualitativamente quanto a presença (sexual) ou ausência (apomítico) de bandas.

4.5 Marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)

A reação de PCR utilizando marcadores ISSR necessitou da utilização de primers capazes de detectar a variabilidade genética intra e interespecífica, sendo eles D12 (GA)₆CG e HB14 (CTC)₃GC.

As reações de amplificação foram realizadas com a utilização dos seguintes reagentes: 1X buffer; 3,0 mM MgCl₂; 0,2 µM de dNTP; 0,5 µM de primer; 0,9U Taq DNA polimerase. Para as reações de variabilidade genética, o DNA foi diluído em 50 ng, com seu volume final ajustado com água para PCR ultrapura e acrescentados ao mix para as amplificações em Termociclador Veriti Applied Biosystems utilizando a seguinte programação: 95°C por 3 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30s, 51°C por 45s, 72°C por 75s; 72°C por 5 minutos.

Para a visualização dos fragmentos amplificados, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2% em uma voltagem constante de 80 Volts por 3 horas. Posteriormente foram coradas com Gel Red para visualização e a captura da imagem ocorreu sob luz UV em fotodocumentador modelo LPix Image (Loccus Biotecnologia). Para todas as reações de PCR realizadas foram utilizados os marcadores de peso molecular de 100pb (Ludwig Biotecnologia) em função de determinar o tamanho dos fragmentos amplificados.

As imagens dos géis foram exportadas para o software Bionumerics v 7.5 (Applied Maths) na qual, foram obtidos dados de polimorfismo e construído o dendrograma de dissimilaridade pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Dice.

4.6 Experimento em vasos

Foram selecionados cinco acessos geneticamente distintos de *Cenchrus* (CPATSA 134; CPATSA 432; CPATSA 558; CPATSA 572; Biloela), pertencentes ao banco de sementes da Embrapa Semiárido para o ensaio em vasos com base nas análises moleculares através de marcadores ISSR.

O solo utilizado para os vasos foi coletado no Campo Experimental de Bebedouro pertencente a Embrapa Semiárido, localizado no município de Petrolina/PE. Uma amostra composta do solo foi analisada quanto as suas características químicas segundo os métodos descritos no Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes da Embrapa (EMBRAPA, 1997), (Tabela 4). O solo foi peneirado para eliminação de materiais indesejáveis e também adubado segundo o manual de Recomendações de adubação para o Estado de Pernambuco (IPA, 1998) com base nos resultados da análise.

Tabela 4. Análise do solo quanto as suas características químicas.

C.E	pH	C	P	K	Na	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	V
mScm ⁻¹	-	g kg ⁻¹	mgdm ⁻³					cmol _c dm ⁻³				%
3,41	4,7	1,0	3,16	0,11	0,44	1,9	2,1	0,15	0,7	4,5	5,3	86,3

C.E: Condutividade elétrica; pH: Potencial hidrogeniônico. C: Carbono; P: fósforo; K: potássio; Na: sódio; Ca: cálcio; Mg: magnésio; Al: alumínio; H+Al: acidez potencial; SB: saturação de bases; CTC: capacidade troca de cátions; V: saturação por bases.

O ensaio foi conduzido á pleno sol no setor de Metabolismo Animal na Embrapa Semiárido em Petrolina-PE utilizando delineamento fatorial para análise de interação planta/bactéria com 10 tratamentos em 5 genótipos de buffel em quatro blocos, sendo, 1-*Azospirillum brasilense*, 2-*Herbaspirillum seropedicae*, 3-B10 (*Agrobacterium* sp.), 4-B11, (*Neorhizobium* sp.), 5-B12 (*Stenotrophomonas* sp.), 6-B13 (*Bacillus* sp.), 7-B16 (*Agrobacterium* sp.), 8-S14 (*Bacillus*), 9-testemunha nitrogenada e 10-testemunha absoluta, totalizando 200 vasos. As bactérias enumeradas de 3 a 7 são nativas e do capim-buffel e a bactéria 8 é nativa do sorgo.

Aplicou-se 200 mg de N\planta na forma de ureia, 10 dias após a inoculação, parcelado em 4 vezes para o tratamento testemunha nitrogenada. Para a testemunha absoluta não foram realizadas adubações ou inoculações

As sementes foram semeadas em vasos de 8 kg e 7 dias após a emergência foi realizado o desbaste permanecendo duas plantas, com altura homogênea, por vaso.

4.7 Crescimento bacteriano

As bactérias utilizadas no experimento foram isoladas previamente (ANTUNES, 2016) e encontram-se junto à Coleção de Microrganismos de interesse Agrícola da Embrapa Semiárido (CMISA). As bactérias foram inoculadas em placas de Petri contendo meio sólido (RODRIGUES NETO et al., 1986) e posteriormente inoculadas em meio Dyg's líquido em erlenmeyers com 100 ml de meio de cultura. As bactérias foram crescidas em mesa agitadora em temperatura ambiente a uma velocidade de 110 rpm durante 48 h. O crescimento bacteriano foi comprovado com a turbidez do meio de cultura (Figura 4).

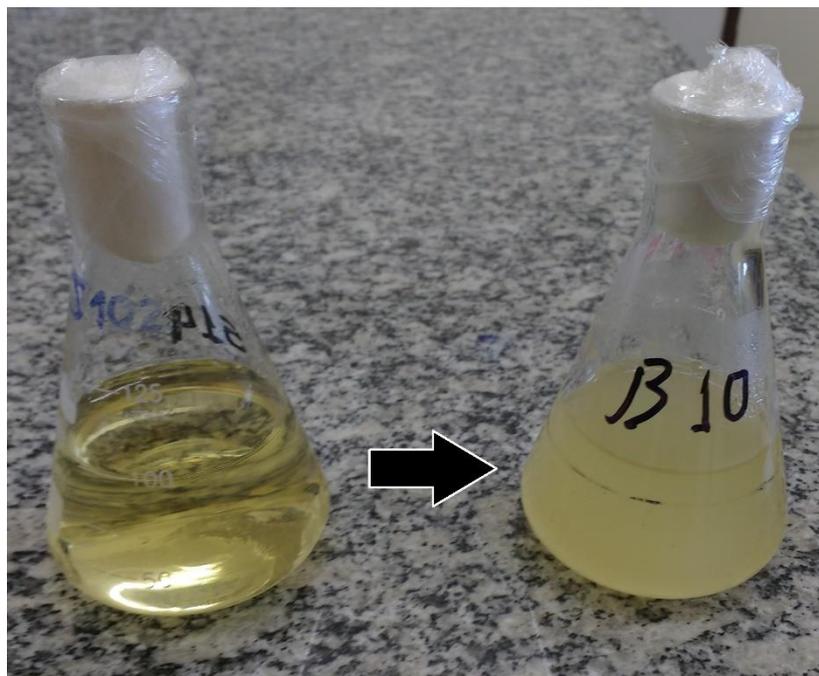


Figura 4. Turbidez do meio de cultura Dygs líquido comprovando crescimento da bactéria B10.

Posteriormente ao crescimento bacteriano foi realizada a inoculação com a aplicação de 1 ml do caldo bacteriano próximo à região radicular após 4 dias da emergência da parte aérea, já estabelecidas.

4.8 Avaliação de promoção de crescimento vegetal

Aos 50 dias após a inoculação avaliou-se: índice de clorofila A (CFA); índice de clorofila B (CFB); clorofila total (CFTOT); altura de planta (ALT); comprimento da raiz (CR); massa seca da parte aérea (MSPA); massa seca da raiz (MSR); nitrogênio total (NTOT); teor de nitrogênio (NTEOR). Os índices de clorofila Falker foi medido com a utilização do clorofilog Falker selecionando folhas as jovens e expandidas.

A medição de altura de planta (ALT) foi realizada com auxílio de uma trena graduada e para comprimento de raiz (CR) utilizou-se uma régua de 50cm (figura 5). Para as avaliações de massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) as plantas foram acondicionadas em sacos de papel e levadas a estufa de ventilação forçada (60°C) onde permaneceram por 72 horas. Após a secagem, o material foi pesado em balança semianalítica.



Figura 5. Medição de comprimento de raiz do acesso CPATSA 432 em tratamento testemunha absoluta realizada com auxílio de uma régua.

Após a secagem e pesagem da parte aérea as amostras foram moídas em moinho tipo ciclone e bola para análise de nitrogênio total (NTOT) e teor de nitrogênio (NTEOR) seguindo o método de combustão seca utilizando o equipamento Leco TruSpec CN.

Para as análises estatísticas os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA). Diferença significativa entre médias foi determinada pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade pelo programa estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2008). As variáveis foram transformadas por $(x+1)^{0,5}$.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação do Mecanismo Reprodutivo

O Banco Ativo de Germoplasma de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido pode conter acessos com mecanismo de reprodução via apomixia, sexual obrigatório e/ou sexual facultativo e os marcadores moleculares foram utilizados para identificar esses mecanismos. Os marcadores específicos associados à sequência de apomixia da região genômica (ASGR – Apomixis Sequence Genomic Region) (JESSUP, 2005) foram eficientes na determinação do modo reprodutivo de 115 acessos de capim-buffel do BAG da Embrapa Semiárido. Em análise qualitativa (presença ou ausência de banda) foi verificada a utilização dos marcadores UGT197, Q8H e PCAB10 em PCR. O resultado obtido após a eletroforese mostrou amplificação do fragmento ligado à apomixia em todos os 115 genótipos em estudo (figura 6).

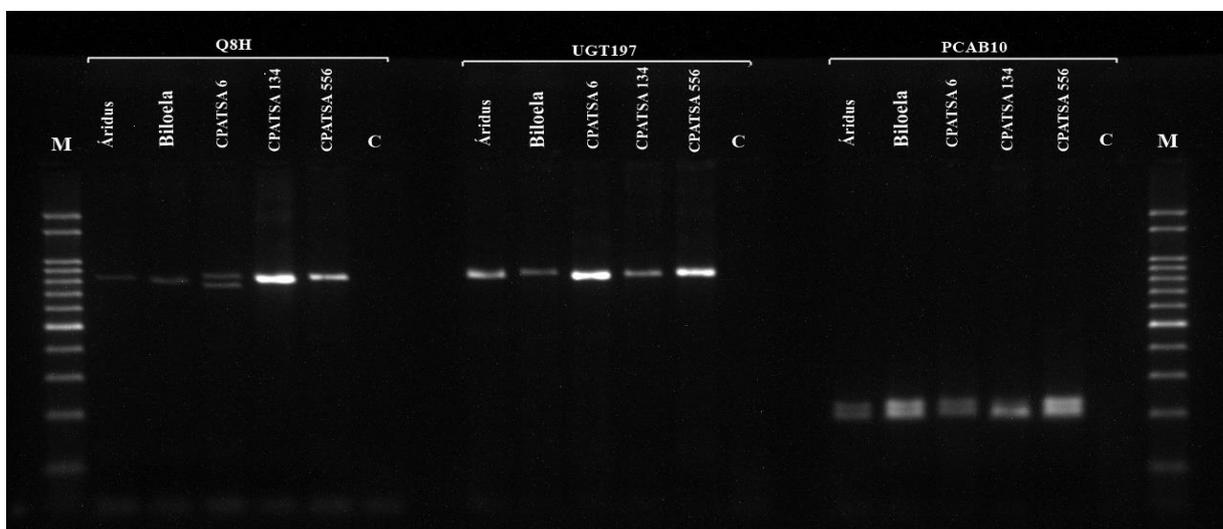


Figura 6. Gel de eletroforese com marcadores específicos associados à sequência de apomixia da região genômica em acessos de capim buffel do BAG de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido. **M:** Marcador 100 pares de base; **C:** Reagente controle

Em quase todas as espécies que apresentam esse modo de reprodução, a apomixia é dominante em relação a sexualidade (DWIVEDI et al., 2007). O mecanismo desse tipo de reprodução é controlado por um ou mais genes nos indivíduos pertencentes a espécie *Cenchrus ciliaris* (JESSUP et al., 2002;

DWIVEDI et al., 2007). O BAG da Embrapa Semiárido possui 100% de plantas apomíticas, sendo impossível haver cruzamentos entre indivíduos como esse mecanismo reprodutivo, conseqüentemente, a variabilidade genética de buffel é bastante limitada.

A presença da banda na utilização de marcadores para apomixia não elimina a possibilidade de o genótipo ser sexual, porém, só poderá ser constatada o modo de reprodução sexual facultativo unicamente, caso haja amplificação para marcadores ligados à região genômica sexual.

A eficiência dos marcadores utilizados para identificação de genótipos apomíticos foi constatada também por Quiroga et al. (2013) quando os mesmos foram testados em indivíduos sexuais em capim-buffel, na qual, não houve amplificação.

A identificação de indivíduos com modo de reprodução sexual, possibilita a inclusão dessas cultivares em programas de melhoramento genético. Indivíduos de uma população de capim-buffel que se reproduzem sexuadamente poderão ser cruzados com outros indivíduos, transferindo características de interesse (como alto teor de proteína, boa palatabilidade, alta produtividade) para indivíduos apomíticos (QUIROGA et al., 2013). Portanto, o uso do marcador molecular do tipo SCAR (ligado a região genômica sexual reprodutiva) é capaz de identificar genótipos sexuais dentro de um BAG.

O marcador 4HS* (SCAR) foi desenvolvido por Yadav et al. (2012), a partir de marcadores AFLP, no qual, mostrou estreita ligação com o modo reprodutivo sexual. Este foi um dos primeiros marcadores desenvolvidos, associado ao modo de reprodução sexual na espécie *Cenchrus ciliaris*.

Todos os 115 acessos foram acometidos a reações de PCR utilizando o marcador SCAR 4HS* resultando na identificação de dois genótipos sexuais dentro do BAG (Figura 7). Nos genótipos em que foram revelados as amplificações através do marcador associado ao modo sexual reprodutivo também amplificaram com o uso de marcadores associados à sequência de apomixia da região genômica. Com isso é possível constatar que esses genótipos provavelmente sejam sexuais facultativos. Kumar et al. (2017) relatam que genótipos sexuais facultativos são supostamente heterozigóticos, indicando que os resultados obtidos nesse trabalho nos mostram que os acessos amplificados com ambos os marcadores sejam sim genótipos sexuais

facultativos heterozigóticos, também, pelo motivo de serem híbridos segundo o banco de dados do BAG de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido.

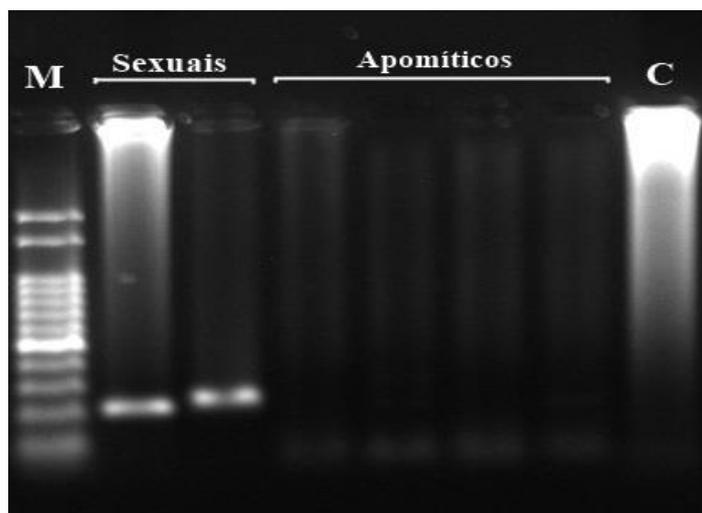


Figura 7. Gel de eletroforese com marcador específico associado à região sexual reprodutiva (4HS*) revelando a identificação de acessos do BAG de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido com modo de reprodução sexual. **M:** Marcador 100 pares de base; **C:** Reagente controle

O marcador 4HS* traz dupla confiabilidade, a primeira por ter amplificado o fragmento ligado a região sexual reprodutiva, confirmando a existência de dois acessos supostamente sexuais no BAG e a segunda por não ter amplificado o restante dos acessos que tem por modo de reprodução unicamente apomítico, demonstrando que esse marcador é eficiente e que pode ser utilizado para identificação do modo reprodutivo de genótipos da espécie em outras populações e em outros Bancos de Germoplasma.

Embora o marcador sexual SCAR não seja capaz de distinguir entre indivíduos sexuais obrigatórios e sexuais facultativos (KUMAR et al., 2017), nesse trabalho o marcador 4HS* foi eficiente em identificar inequivocamente os genótipos sexuais do BAG. Supostamente esses genótipos sejam sexuais facultativos devido terem amplificado também na utilização de marcadores apomíticos. Esse resultado poderá ser confirmado analisando o saco embrionário desses genótipos conforme feito por Dwivedi et al. (2007).

Kumar et al. (2015) em ter identificado e confirmado o modo reprodutivo sexual de indivíduos de capim-buffel, utilizando marcadores SCAR, notaram que genótipos com esse mecanismo de reprodução são raros e incapazes de produzir sementes e autopolinizarem. Indicaram que o protocolo de meio de cultura seria uma alternativa viável para multiplicação e manipulação genética nos programas de melhoramento da espécie.

5.2 Diversidade Genética do BAG

Todos os 115 acessos pertencentes ao BAG da Embrapa Semiárido foram submetidos a análise em PCR utilizando marcadores ISSR afim de identificar duplicatas, bem como, avaliar a diversidade genética intra e interespecífica. Foram utilizados os marcadores microssatélites D12(GA)₆CG e HB14(CTC)₃GC, os mesmos marcadores foram utilizados por Al-Soqeer (2011), no qual, os 'primers' utilizados revelaram polimorfismo nos genótipos em estudo, amplificando 5 e 11 bandas respectivamente. O mesmo autor, através da análise de agrupamento, relata que não houve genótipos totalmente idênticos nas suas avaliações e que o valor máximo de similaridade encontrado foi de 97% entre os indivíduos.

Os dois marcadores ISSR (D12 e HB14) foram utilizados em uma reação de PCR com uma duplicata de quatro acessos, com finalidade de confirmar a capacidade dos primers gerarem bandas polimórficas (Figura 8).

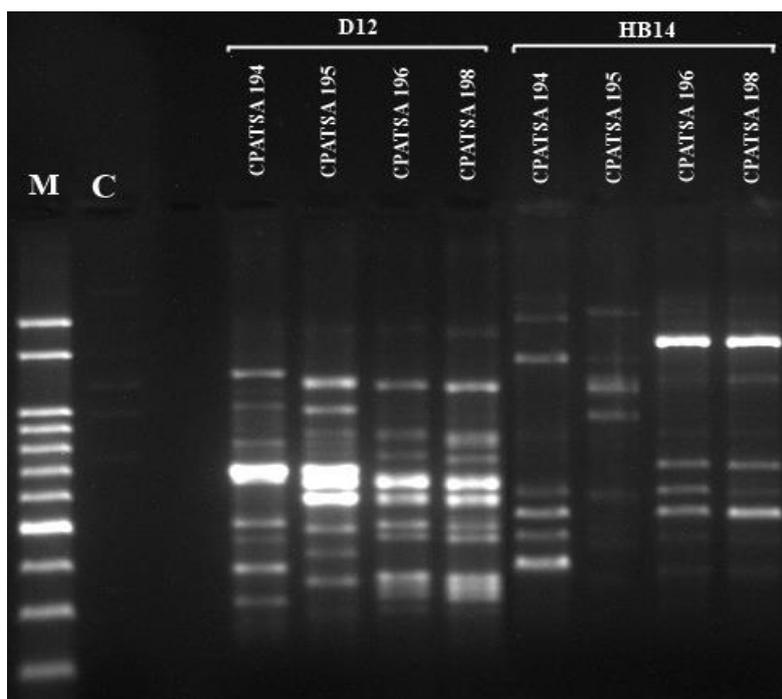


Figura 8. Gel de eletroforese revelando polimorfismo entre os genótipos no uso dos marcadores D12 e HB14. **M:** Marcador 100 pares de base; **C:** Reagente controle

O marcador D12 gerou um total de 1068 bandas amplificadas nos 115 acessos avaliados. A banda 7 foi a mais comum, dectada em 104 genótipos, representando 9,7% do total de bandas amplificadas e com presença em 90% dos genótipos. Opostamente, a banda 18 foi a menos comum, aparecendo em apenas 3 genótipos dentre os 115 analisados, com representatividade de 0,3%

do total de bandas amplificadas com presença em 2,3% dos genótipos analisados

O marcador HB14 gerou um total de 1135 bandas amplificadas nos 115 acessos avaliados. A 13ª banda foi a mais comum, apresentando-se em 102 genótipos, representando 8,9% do total de bandas amplificadas com presença em 88% dos genótipos analisados. Em contrapartida, a 20ª banda foi a menos comum, apresentando-se 12 vezes dentre os 115 genótipos analisados com representatividade de 1,05% do total de bandas amplificadas com presença em 12,4% dos genótipos analisados. De acordo com os resultados obtidos, os marcadores ISSR (D12 e HB14) utilizados mostraram-se eficientes na análise de diversidade genética dos acessos de capim-buffel do BAG da Embrapa Semiárido com 100% de ocorrência de bandas polimórficas (Tabela 5) tendo em média a amplificação de 9,2 e 9,8 bandas por acesso respectivamente.

Tabela 5. Primers ISSR com sequência, número de fragmentos amplificados e número de fragmentos polimórficos.

Primer	Sequencia	Fragmentos amplificados	Fragmentos polimórficos	Referência
D12	(GA)6CG	1068	1068	Al-Soqeer
HB14	(CTC)3GC	1135	1135	(2011)

Al-Soqeer (2011) analisando a diversidade genética entre populações silvestres de capim-buffel utilizando os mesmos primers, também verificou bandas polimórficas, porém, com uma menor porcentagem comparada com a obtida nesse trabalho.

Azevedo et al. (2011) e Lima et al. (2011) também relataram elevada porcentagem de bandas polimórficas caracterizando genótipos de braquiária e capim elefante respectivamente (acima de 75%). A alta quantidade de bandas polimórficas ao utilizar marcadores ISSR pode ser um indicativo de alta variabilidade genética intraespecífica em *Cenchrus ciliaris* (GUTIERREZ-OZUNA et al. 2009).

A análise de agrupamento permitiu verificar a diversidade genética presente no BAG de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido através do dendrograma de dissimilaridade pelo método UPGMA e utilizando o coeficiente de Dice. Foi possível identificar acessos em duplicatas (CPATSA 581; CPATSA 582) ambos provenientes dos Estados Unidos, (CPATSA 176; CPATSA 177) ambos

provenientes do Brasil, (CPATSA 7754; CPATSA 754) proveniente do Brasil e sem informação respectivamente. Quatro acessos geneticamente idênticos também foram identificados (CPATSA 199; CPATSA 200; CPATSA 201; CPATSA 237), sendo que os três primeiros provenientes da Tanzânia e o último sem informação. Acessos duplicados podem ser inseridos nos BAG's por falhas na coleta ou pelo fato dos indivíduos seres geneticamente idênticos mesmo sendo coletados em locais diferentes. A identificação e eliminação de duplicatas em BAG's proporciona economia financeira e de mão de obra para a manutenção e gestão no banco.

Observa-se que os acessos tendem se agrupar por país de origem (Figura 9), formando grandes grupos por genótipos advindos dos Estados Unidos (CPATSA 603; CPATSA 581; CPATSA 582; CPATSA 598; CPATSA 558; CPATSA 557; CPATSA 580; CPATSA 599), Brasil (CPATSA 154; CPATSA 176; CPATSA 177; CPATSA 189) e Tanzânia (CPATSA 199; CPATSA 200; CPATSA 201), por exemplo.

Vale ressaltar que os acessos que amplificaram o fragmento para sistema de reprodução sexual e apomixia, ou seja, genótipos facultativos (CPATSA 102; CPATSA 134) não se agruparam entre si, apesar de ambos serem provenientes do Brasil são de estados geograficamente distantes (Figura 9). Estes acessos podem ser utilizados em intercruzamento para obtenção de variabilidade genética onde o melhorista poderá atuar. O acesso CPATSA 134, facultativo para tipo de reprodução, se agrupou com os acessos CPATSA 151, CPATSA 145 e CPATSA 146 ambos provenientes de Quissamã-SE, Brasil, e que amplificaram apenas o fragmento para apomixia. Essa maior similaridade genética entre os acessos provenientes do mesmo local pode ter ocorrido devido a um ancestral comum entre eles.

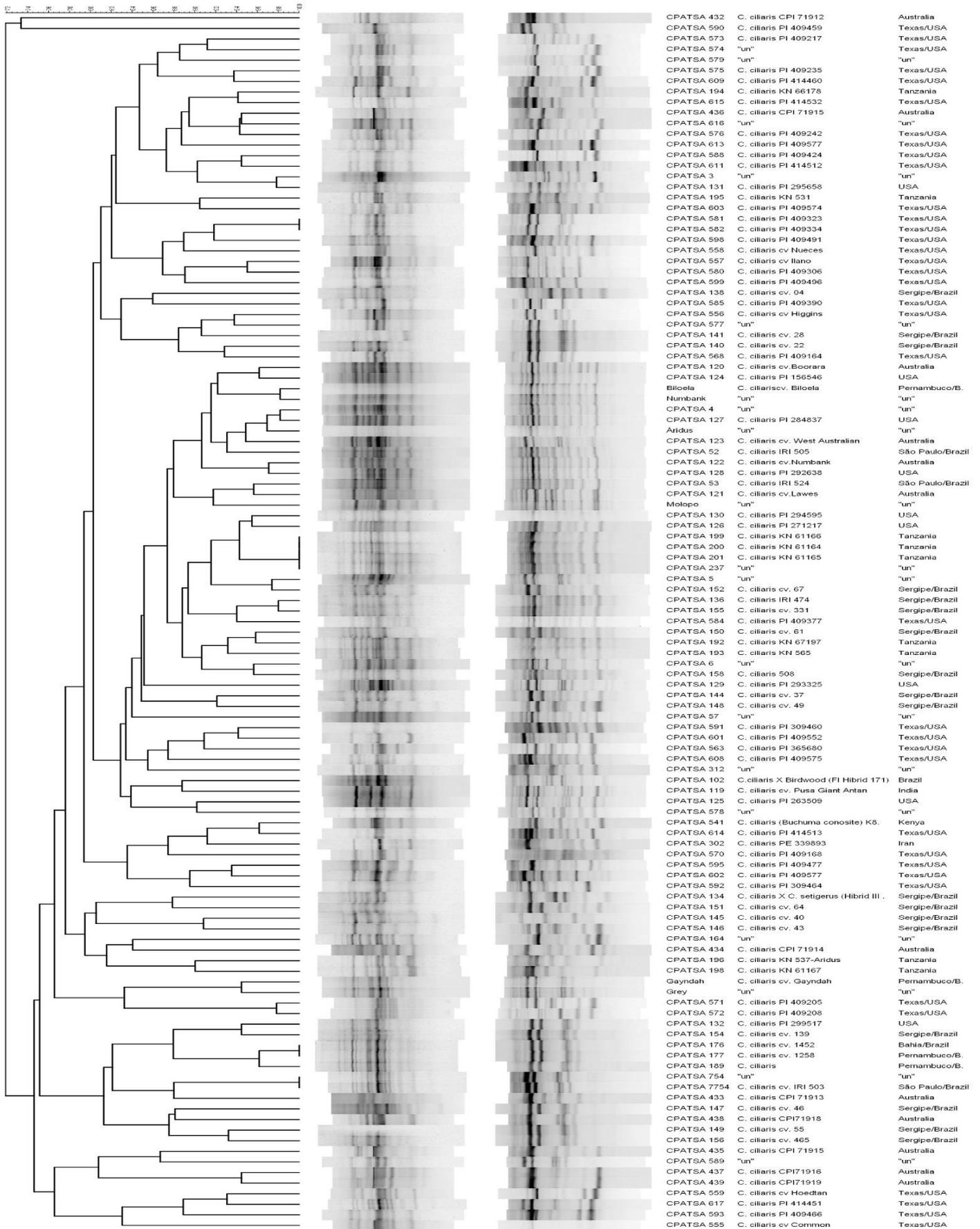


Figura 9. Dendrograma de dissimilaridade obtido pelo método UPGMA mostrando o agrupamento dos acessos do BAG de *Cenchrus* da Embrapa Semiárido. Colunas a direita: Registro CPATSA; Espécie/Cultivar; Procedência.

5.3 Promoção de crescimento vegetal

Para todas as variáveis avaliadas não houve interação significativa ($p>0,05$) entre as inoculações e genótipos. Analisando os tratamentos dentro dos genótipos, podemos observar que não houve diferença significativa nas variáveis altura de planta, comprimento de raiz e teor de nitrogênio (tabela 6).

Para o acesso CPATSA 432 houve diferença significativa para a variável massa seca da raiz (MSR), na qual, a maior média foi encontrada no tratamento com adubação nitrogenada ($p>0,05$). O fornecimento de nutrientes afeta o crescimento das raízes e sua morfologia e a densidade das raízes aumenta rapidamente nos locais de maior concentração do fertilizante (MARSCHNER, 1995). Vale ressaltar que, o Nitrogênio interfere positivamente no crescimento da parte aérea da planta o que não foi observado para esse acesso, pois não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos. Segundo Barassi et al. (2008), a inoculação de *Azospirillum* em gramíneas induz a produção de fitohormônios responsáveis pela promoção de crescimento e densidade de raízes, na qual, também não foi observado nesse acesso.

No acesso CPATSA 558 não foi observado diferença significativa para todas as variáveis, podendo ser um indicativo de que esse acesso não seja tão exigente na adubação nitrogenada, já que não houve diferenças em relação a testemunha absoluta, pois adicionando nitrogênio, ou inoculando as bactérias promotoras de crescimento vegetal não houve incremento nas características avaliadas.

No genótipo Biloela (comercial), o tratamento inoculado com *Azospirillum brasilense* obteve os maiores valores para as variáveis massa seca da parte aérea (MPAS) e nitrogênio total (NTOT), no entanto não diferiu estatisticamente do tratamento com adubação nitrogenada, mas superaram os demais tratamentos. O resultado de NTOT encontrado em Biloela é importante, pois, é um indicativo que há uma maior quantidade de proteínas nesse material, quando submetida a esses tratamentos, sugerindo que a inoculação de *Azospirillum brasilense* pode ser associada, utilizando doses reduzidas de N, ou até mesmo substituir completamente a aplicação de fertilizantes nitrogenados. Dentre as vantagens, redução da utilização desses produtos químicos, promovendo uma diminuição dos custos de produção, além do benefício ao meio ambiente.

A inoculação com *Azospirillum* proporcionou um aumento de 279% para MPAS e 396% para NTOT quando comparado com a testemunha absoluta, indicando que o cultivar responde positivamente a inoculação com *Azospirillum* pela capacidade de assimilar o nitrogênio fornecido pela mesma em uma associação. A espécie

Azospirillum brasilense apresenta destaque no processo de FBN devido à alta capacidade que essa bactéria possui em fixar N₂ de modo assimilável pela planta, principalmente em forma de amônia (VOGEL et al., 2014). Hungria et. al (2010) relatam o potencial de fixação de nitrogênio realizado por *Azospirillum* associado à outras gramíneas, como o milho, resultando em aumentos significativos de produtividade.

A inoculação com *Azospirillum* em duas cultivares de *Brachiaria* culminou em um acréscimo na biomassa de 5,4% com N mineral e 22,1% na associação de N mineral com *Azospirillum* em relação a testemunha absoluta (não inoculado e não fertilizado) (HUNGRIA et al., 2016). Os autores inferiram que a inoculação com *Azospirillum*, também pode ser importante para a recuperação de pastagens degradadas e contribuem para uma agropecuária sustentável sem prejudicar o meio ambiente, uma vez que reduz o uso de insumos químicos e, conseqüentemente, reduz a dependência do seu uso em solos pobres e degradados.

No acesso CPATSA 572, houve diferença significativa para as variáveis clorofilas A (CFA), B (CFB) e total (CFTOT). Os tratamentos com *Azospirillum*, B12, B13, S14 e Testemunha nitrogenada proporcionaram as maiores médias para essas variáveis ($p>0,05$). O conteúdo de clorofila está correlacionado com o acúmulo de N na planta porque o é um elemento estrutural e necessário para a síntese de clorofila (REIS et al., 2006). A inoculação com *Azospirillum* influencia positivamente as características de pigmentos fotossintéticos das folhas, incluindo as clorofilas A e B tornando-as mais verdes (BARASSI et al. 2008; BASHAN et al. 2006; HUNGRIA et al. 2011). No entanto, observou-se no presente estudo que esse acesso respondeu positivamente para essa variável, porém, altos índices de clorofila foliar não influenciaram outras características avaliadas, como por exemplo o Nitrogênio total e o teor de nitrogênio.

O acesso CPATSA 134, genótipo híbrido e o genótipo Biloela (comercial), foram similares na produção de massa seca da parte aérea (MSPA) e nitrogênio total (NTOT). Os tratamentos com *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, B10, B12, B13, B16, S14 e testemunha nitrogenada proporcionaram as maiores médias para Massa da Parte Aérea Seca ($p>0,05$). Os tratamentos com *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, B10, B16, S14 e testemunha nitrogenada obtiveram os maiores valores relacionados ao nitrogênio total ($p>0,05$). Avaliando a atividade de bactérias diazotróficas de forrageiras “*in vitro*”, Santos et al. (2013) relatam que todos os isolados apresentaram

atividade enzimática, sendo que 68% em altos níveis, inferindo que os isolados obtidos no trabalho são promissores para FBN.

Antunes (2016) observou que os isolados obtidos do capim-buffel também apresentaram elevada capacidade de realizar FBN tanto avaliados “*in vitro*” quanto inoculados no sorgo. Portanto, as bactérias nativas do capim-buffel são promissoras e podem ser utilizadas como bactérias diazotróficas.

O acesso CPATSA 134 apresentou resultados similares ao genótipo Biloela, que é um cultivar já comercializado. A resposta positiva do CPATSA 134 nos leva a inferir que esse acesso tem potencial para ser comercializado, e por sua vez tratado com inoculações de bactérias diazotróficas proporcionando um aumento de produtividade e proteína, bem como, incluí-lo em programas de melhoramento genético da espécie e transferir características de interesse para genótipos apomíticos por se tratar de um acesso híbrido.

Os incrementos proporcionados, quanto a produção de biomassa, acúmulo de nitrogênio e aumento de pigmentos fotossintéticos, via inoculação com bactérias diazotróficas no presente estudo, também são relatados em diversos trabalhos. Especialmente aqueles que relatam o potencial de bactérias do gênero *Azospirillum* em fixar nitrogênio. Esse mecanismo tem como consequência a solubilização de fosfato, aumento na produção de hormônios vegetais como ácido indol acético, giberelina, citocinina e etileno, entre outros, resultando em plantas mais saudáveis com aumento e crescimento da produtividade (MARIANO e ROMEIRO, 2000; HUNGRIA et al., 2010; HUNGRIA, 2011; HUNGRIA et al. 2016; TAIZ e ZEIGER, 2017).

A caracterização molecular proporcionou a seleção de 5 acessos geneticamente divergentes, que foram testados em experimento em vasos. Pode-se observar diferentes respostas dos acessos com relação aos tratamentos com inoculação. A resposta da inoculação é influenciada de acordo com o genótipo de milho (MATSUMURA et. al., 2015). Os genótipos que capim-buffel demonstraram maior responsividade às inoculações foram Biloela e o acesso CPATSA 134, com aumentos expressivos de nitrogênio total e massa seca da parte aérea. Os altos índices de nitrogênio total encontrados podem ter proporcionado uma maior produção de massa seca da parte aérea para esses genótipos.

Martuscello et al. (2009), também verificou um aumento de massa seca da parte aérea em capim-xaraés e capim-massai devido ao efeito do nitrogênio no processo de crescimento vegetal.

Tabela 6. Médias de Altura de planta (ALT), comprimento de raiz (CR), massa seca da raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), estimativa de clorofila A (CFA), B (CFB) e total (CFTOT), nitrogênio total (NTOT), teor de nitrogênio (NTEOR) de cinco acessos capim buffel inoculados com *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, bactérias nativas do buffel, bactéria nativa do sorgo, testemunha nitrogenada e absoluta

INOC/TRAT	ALT	CR	MRS	MPAS	CFA	CFB	CFTOT	NTOT	NTEOR
	cm planta ⁻¹		g planta ⁻¹		Índice de clorofila Falker			mg N planta ⁻¹	g N Kg planta ⁻¹
CPATSA 432									
<i>Azospirillum brasilense</i>	42,75a	35,95a	9,02b	12,75a	17,62a	4,55a	22,17a	319,17a	24,87a
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	29,50a	31,05a	9,96b	9,40a	23,37a	5,65a	29,02a	226,40a	23,01a
B10	45,66a	35,36a	11,18b	15,31a	20,90a	6,16a	27,06a	414,59a	27,62a
B11	31,00a	34,30a	7,05b	9,72a	21,85a	5,45a	27,30a	256,93a	25,74a
B12	24,75a	30,72a	8,70b	7,80a	21,92a	7,75a	29,67a	177,53a	21,94a
B13	36,50a	34,60a	9,25b	12,00a	23,40a	6,65a	30,05a	343,17a	23,76a
B16	42,00a	35,35a	7,67b	11,16a	28,25a	8,87a	37,12a	287,95a	24,81a
S14	44,00a	38,02a	10,36b	15,40a	22,92a	7,60a	30,52a	403,01a	25,33a
Testemunha nitrogenada	43,66a	35,26a	16,06a	14,68a	28,00a	8,16a	36,16a	386,75a	25,71a
Testemunha absoluta	37,00a	35,12a	8,81b	12,62a	27,25a	8,92a	36,17a	361,57a	28,68a
CPATSA 558									
<i>Azospirillum brasilense</i>	48,00a	41,15a	9,31a	11,21a	27,70a	9,97a	37,67a	269,73a	24,23a
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	52,50a	37,37a	10,00a	12,02a	29,52a	10,37a	39,90a	269,15a	23,30a
B10	54,33a	36,53a	11,66a	14,33a	33,13a	12,09a	46,03a	349,25a	24,46a
B11	50,00a	37,82a	8,66a	11,46a	20,12a	7,17a	27,30a	311,07a	26,86a
B12	46,50a	52,35a	8,07a	8,65a	29,15a	10,00a	39,15a	240,16a	27,94a
B13	39,75a	40,37a	8,12a	7,05a	22,77a	6,20a	28,97a	147,07a	21,59a
B16	40,33a	35,66a	8,71a	7,40a	26,16a	9,10a	35,26a	163,85a	21,27a
S14	50,50a	44,77a	8,46a	10,36a	28,80a	9,92a	38,72a	171,30a	18,31a
Testemunha nitrogenada	54,00a	37,46a	12,53a	15,80a	30,10a	11,86a	41,96a	379,93a	24,18a
Testemunha absoluta	51,33a	35,70a	10,98a	13,33a	26,60a	8,76a	35,36a	362,37a	26,75a
BILOELA									
<i>Azospirillum brasilense</i>	69,00a	56,25a	12,25a	26,32a	31,40a	11,05a	42,4a	588,44a	24,89a
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	43,66a	47,70a	7,68a	9,05b	22,56a	5,96a	28,53a	201,93b	19,48a
B10	45,33a	36,80a	7,56a	8,71b	19,16a	5,63a	24,80a	218,47b	24,26a
B11	47,33a	44,90a	13,40a	9,70b	24,03a	9,36a	33,40a	188,16b	16,94a

B12	56,00a	34,87a	10,76a	10,87b	25,35a	7,25a	32,60a	290,54b	26,06a
B13	51,50a	44,85a	10,37a	13,45b	29,40a	13,05a	42,45a	287,12b	21,20a
B16	56,50a	33,07a	10,18a	11,07b	21,00a	7,22a	28,22a	275,68b	24,93a
S14	58,50a	47,52a	10,82a	11,53b	26,80a	8,82a	35,62a	276,78b	22,96a
Testemunha nitrogenada	67,00a	37,90a	11,18a	17,28a	24,52a	9,92a	34,45a	412,42a	23,31a
Testemunha absoluta	48,25a	48,02a	9,43a	9,35b	26,10a	8,40a	34,50a	148,39b	18,16a
CPATSA 572									
<i>Azospirillum brasilense</i>	34,00a	47,56a	5,26a	5,81a	29,36a	9,90a	39,26a	97,70a	15,83a
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	37,33a	45,36a	9,05a	10,68a	22,06a	5,53b	27,60b	285,21a	27,07a
B10	44,50a	38,95a	7,95a	10,26a	17,35b	5,40b	22,75b	235,97a	23,12a
B11	41,50a	45,05a	8,72a	8,52a	22,80a	5,85b	28,65b	209,38a	24,23a
B12	35,00a	45,86a	7,68a	8,48a	23,40a	8,16a	31,56a	227,03a	26,28a
B13	42,25a	42,92a	8,38a	11,71a	30,57a	9,47a	40,05a	297,30a	25,33a
B16	46,50a	52,62a	8,71a	11,52a	14,22b	4,57b	18,80b	222,05a	20,48a
S14	35,33a	37,00a	7,50a	8,36a	29,86a	8,50a	38,36a	182,53a	21,64a
Testemunha nitrogenada	53,33a	42,23a	8,43a	11,10a	28,86a	7,70a	36,56a	298,85a	26,29a
Testemunha absoluta	45,50a	39,72a	10,51a	11,11a	17,55b	5,05b	22,60b	275,48a	25,47a
CPATSA 134									
<i>Azospirillum brasilense</i>	44,75a	36,17a	10,63a	14,38a	30,75a	9,77a	40,52a	353,82a	25,20a
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	39,00a	42,70a	8,45a	13,88a	27,07a	9,80a	36,87a	320,68a	23,85a
B10	51,66a	34,33a	9,91a	17,15a	24,16a	6,43a	30,60a	399,61a	24,40a
B11	30,00a	37,55a	7,01a	7,31b	27,70a	6,62a	34,32a	173,15b	24,10a
B12	35,33a	38,46a	10,01a	14,80a	24,66a	6,86a	31,53a	245,66b	21,66a
B13	36,00a	32,63a	8,38a	12,23a	26,10a	6,90a	33,00a	218,38b	19,46a
B16	44,50a	33,02a	10,72a	14,08a	23,97a	9,62a	33,60a	352,91a	24,80a
S14	43,50a	33,87a	11,96a	16,40a	19,72a	6,02a	25,75a	398,28a	24,06a
Testemunha nitrogenada	45,66a	35,66a	10,31a	16,95a	24,13a	8,66a	32,80a	365,12a	22,25a
Testemunha absoluta	31,00a	46,60a	7,07a	8,10b	23,65a	8,92a	32,57a	190,16b	23,12a
CV(%)	13,68	12,32	12,54	17,65	15,82	18,09	16,03	23,41	13,62

Médias seguidas da mesma letra, para o mesmo acesso não diferem pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade

6.0 CONCLUSÃO

A análise de identificação do mecanismo reprodutivo dos acessos do BAG, proporcionou a identificação de dois acessos sexuais (CPATSA 102; CPATSA 134). Esses acessos podem ser incorporados a programas de melhoramento para elevar a variabilidade genética da espécie e transferir características de interesse para genótipos apomíticos.

Para as análises de diversidade genética, os marcadores (ISSR) utilizados foram capazes de exaurir as informações de variabilidade genética de 115 acessos e identificar duplicatas de capim-buffel do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. Nota-se que existe alto índice de variabilidade genética intraespecífica no BAG.

O genótipo Biloela e o acesso CPATSA 134 responderam positivamente a inoculação com *Azospirillum* apresentando aumento na produtividade e acúmulo de nitrogênio.

O acesso 134 tem potencial para ser comercializado por ter apresentado resultados similares ao genótipo Biloela (comercial).

As bactérias das forrageiras apresentaram resultados promissores, no entanto, são necessários estudos microbiológicos mais detalhados quanto ao potencial de fixação biológica de nitrogênio.

7.0 REFERÊNCIAS

AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A.; CREGAN, P. B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*, v. 132, n. 4, p. 1131-1139, 1992.

AL-SOQEER, A. Genotypic diversity among wild populations of buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L. Link) in Al-Qassim region. *Asian Journal of Biotechnology*, v. 3, n. 3, p. 262-268, 2011.

ANTUNES, G. R. Diversidade e eficiência na promoção do crescimento vegetal por bactérias isoladas de plantas forrageiras do semiárido. 2016. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco. Petrolina, 22 de fevereiro de 2016.

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, Maryland, v.24, n.1, p.1-15, 1949.

AZEVEDO, A. L. S.; COSTA, P. P.; MACHADO, M. A.; PAULA, C. M. P. DE.; SOBRINHO, F. S. High degree of genetic diversity among genotypes of the forage grass *Brachiaria ruziziensis* (Poaceae) detected with ISSR markers. *Genetics and Molecular Research*, p. 3530-3538, 2011.

AYERSA, R. El buffel grass: utilidad y manejo de una promisorio gramínea. Buenos Aires, 1981. 139p.

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

BALDOTTO, L. E. B., BALDOTTO, M. A., OLIVARES, F. L., VIANA A. P., SMITH, R. B. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. Viçosa. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34, 2010.

BARASSI, C. A.; SUELDO, R. J.; CREUS, C. M.; CARROZZI, L. E.; CASANOVAS, W. M.; PEREYRA, M. A. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizar el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, v. 1, p. 49-59, 2008.

BARTCHECHEN, A.; FIORI, C. C. L.; WATANABE, S. H.; GUARIDO, R. C. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasiliense* NA PRODUTIVIDADE DA CULTURA DO MILHO (*Zea mays* L) *Campo Digital*, v.5, n.1, p.56-59, Campo Mourão, dez., 2010.

BASHAW, E. C., M. A. HUSSEY, K. W. HIGNIGHT. 1992. Hybridization (n+n and 2n+n) of facultative apomictic species in the Pennisetum agamic complex. *Int. J. Plant Sci.* 153:446-470.

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

BELTRÁN-LÓPEZ, S.; HERNÁNDEZ-GARAY, A.; GARCÍA-MOYA, E.; PÉREZ PÉREZ, J.; KOHASHI-SHIBATA, J.; HERRERA-HARO, J.G.; QUERO-CARRILLO, A.R.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, S.S. Efecto de la altura y frecuencia de corte en El crecimiento y rendimiento del pasto buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) en un invernadero. *Agrociencia*, v.39, p.137-147, 2005.

BORBA, R. DA S.; GARCIA, M. S.; KOVALLESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; BRANCO, J. S. C.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. *Neotropical Entomology* v. 34, n. 4, p. 565-569, 2005.

Bhat V, Dalton SJ, Kumar S, Bhat BV, Gupta MG and Morris P. Particle-inflow gun-mediated genetic transformation of buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.): optimizing biological and physical parameters. *Journal of Applied Genetics* 42: 405-412, 2010.

BRANDÃO, L. P. Caracterização molecular e citogenética de acessos de capim buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) /Livia Pinto Brandão. Cruz das Almas, 2015, 67 p., il.

BRASIL, M. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Occurrence and diversity of diazotrophic bacteria associated to forages grasses of the Pantanal in the state of Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.29, p.179-190, 2005.

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

Cenchrus ciliaris. Disponível em:

http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Cenchrus_ciliaris.htm

Acesso em: Março de 2016.

COSTA, J. C. Utilização de Marcadores ISSR na Caracterização de Cultivares. Recife: UFRPE (Dissertação mestrado), 2010.

DARTORA, J.; Guimarães, V. F.; Marini, D.; Sander, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi*, v. 17, n. 10, 2013.

DAVISON, J. Plant beneficial bacteria. *Nature Biotechnology*, v. 6, n. 3, p. 282, 1988.

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

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil Biologic Biochemic*. v.29, n.36, p.771-774, 1997.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, I. J. Bases científicas para uma agricultura biológica. *Ciência e Cultura*, v.34, p.869-881, 1982.

DOTTO, A. P.; LANA, M. C.; STEINER, F.; FRANDOLOSO, J. F. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v. 5, n. 3, 2010, p. 376-382 Universidade Federal Rural de Pernambuco Pernambuco, Brasil.

Dwivedi, K. K.; Bhat, S. R.; Bhat, V.; Bhat, B. V.; Gupta, M. G. Identification of a SCAR marker linked to apomixis in buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.). *Plant Science*, v. 172, n. 4, p. 788–795, 2007.

EMBRAPA. CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOLOS. Manual de métodos de análise de solo. Embrapa, 1997.

FAGAN, E. B.; Medeiros, S. L.; Manfron, P. A.; Casaroli, D.; Simon, J.; Neto, D. D.; Müller, L. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja-Revisão. *Revista da FZVA*, v. 14, n. 1, 2007.

FALEIRO, F. G.; PIRES, J. L.; LOPES, U. V. Uso de marcadores moleculares RAPD e microssatélites visando a confirmação da fecundação cruzada entre *Theobroma cacao* e *Theobroma grandiflorum*. *Agrotropica*, v. 15, p. 41-46, 2003.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. Revista Symposium. Lavras, v. 6, n. 6, p. 36-41, 2008.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 1998. 3ª Ed., 220 p.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. Agronomia, v. 37, n 2, p. 25-30, 2003.

GUTIERREZ-OZUNA, R.; EGUIARTE, L. E.; MOLINA-FREANER, F. Genotypic diversity among pasture and roadside populations of the invasive buffelgrass (*Pennisetum ciliare* L. Link) in north-western Mexico. Journal of Arid Environments, p. 26–32, 2009.

GRIFFA, S. Caracterización bioquímica y molecular de germoplasma, evaluación de la tolerancia a la salinidad y obtención de híbridos en buffel grass. Tesis Doctoral Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina (137 pp.), 2010.

HOZ, M. S. D. L., DAVILA, J. A., LOARCE, Y., & FERRER, E. Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplifications to study genetic diversity in barley. Genome, 39(1), 112-117, 1996.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo / Mariangela Hungria. – Londrina: Embrapa Soja. 36p. – (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n.325), 2011.

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

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 & Environment, 221, 125-131, 2016.

IPA—Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária. 1998. Recomendações de adubação para o estado de Pernambuco: 2a aproximação. 2a. ed. Ver. Recife: IPA. 198p.

JESSUP, R. W. et al. Disomic inheritance, suppressed recombination, and allelic interactions govern apospory in buffelgrass as revealed by genome mapping. Crop Science, v. 42, n. 5, p. 1688–1694, 2002.

JESSUP, R. W. Molecular tools for marker-assisted breeding of Buffelgrass. Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy. Graduate Studies of Texas A&M University, USA (65 p.), 2005.

KUMAR, S.; SAHU, N.; SINGH, A. *In vitro* plant regeneration via callus induction in a rare sexual plant of Buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.). In Vitro Cellular & Developmental Biology–Plant 51: 28-34, 2015.

KUMAR, S.; SAXENA, S.; GUPTA, M. G. Marker-assisted screening of breeding populations of an apomictic grass *Cenchrus ciliaris* L. segregating for the mode of reproduction. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 17, n. 1, p. 10-17, 2017.

KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in biotechnology*, v. 7, n. 2, p. 39-44, 1989.

LIMA, R. S. N DE.; DAHER, R. F.; GONÇALVES, L. S. A.; ROSSI, D. A.; DO AMARAL JÚNIOR, A. T.; PEREIRA, M. G.; & LÉDO, F. J. S. RAPD and ISSR markers in the evaluation of genetic divergence among accessions of elephant grass. *Genetics and Molecular Research*, 10(3), 1304-1313, 2011.

MARIANO, R. L. R.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência sistêmica mediada por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. Melo, IS; Azevedo, JL Controle Biológico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 2, p. 305-324, 2000.

MARSHALL, V. M.; LEWIS, M. M.; OSTENDORF, B. Buffel grass (*Cenchrus ciliaris*) as an invader and threat to biodiversity in arid environments: A review / *Journal of Arid Environments* 78 1-12, 2012.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. London: Academic, 889 p., 1995.

MARTUSCELLO, J. A.; FARIA, D. J. G.; CUNHA, D. N. F. V.; FONSECA, D. M. Adubação nitrogenada e participação de massa em plantas de *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés e *Panicum maximim* x *Panicum infestum* cv. Massai. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 33, n. 3, p. 663-667, 2009.

MATSUMURA EE, SECCO VA, MOREIRA RS, SANTOS OJP, HUNGRIA M, OLIVEIRA ALM. Composition and activity of endophytic bacterial communities in field-grown maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Ann of Micro*. 2015; 1:1-14. doi:10.1007/s13213-015-1059-4.

MATTOS, W. T.; MONTEIRO, F. A. Produção e nutrição de capim braquiária em função de doses de nitrogênio e enxofre. *Boletim de Indústria Animal*, Nova Odessa, v. 60, n. 1, p. 1-10, 2003.

MILACH, SCK. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina: Embrapa Semiárido, 1999.

MOHAMMADI, K., SOHRABI, Y., HEIDARI, G., KHALESRO, S., & MAJIDI, M. (2012). Effective factors on biological nitrogen fixation. *African Journal of Agricultural Research*, 7(12), 1782-1788.

MONÇÃO, F. P.; OLIVEIRA, E. R.; TONISSI, R. H. e GOES, B. O capim buffel. *Revista Agrarian*, v.4, n.11, p.258-264, 2011.

MOREIRA, J. A. S.; LARA F. J.; MISTURA, C.; LIMA, L. N.; NILTON, M. J.; ACOSTA, B. A.; MOREIRA, L. A. Características morfológicas, estruturais e produtivas de acessos de capim-buffel. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 36, n. 1, 2015.

MOREIRA, J. N. LIRA, M. A.; SANTOS, M. V. F.; ARAÚJO, G. G. L.; SILVA, G. C. Potencial de produção de capim-buffel na época seca no Semiárido Pernambucano. *Revista Caatinga, Mossoró*, v. 20, n. 3, p. 22-29, 2007.

MOREIRA, F. M. DE S.; SILVA, K. DA; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. DE. Bactérias diazotróficas associativas: Diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, v.1, p.74-99, 2010.

MGANGA, K. Z.; MUSIMBA, N. K.; NYARIKI, D. M.; NYANGITO, M. M.; WANG'OMBE, A. W.; EKAYA, W. N.; VERHAGEN, J. Dry matter yields and hydrological properties of three perennial grasses of a semi-arid environment in east Africa. *African Journal of Plant of Science* V. 4, n. 5, p. 138-144, 2010.

NOVAKOWISKI, J. H.; SANDINI I. E.; FALBO, M. K.; DE MORAES, A.; NOVAKOWISKI, J. H.; CHENG, N. C. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 32, suplemento 1, p. 1687-1698, 2011.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. Agronomic application of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field incubation. *Soil Biology and Biochemistry*, v.26, p.1591- 1601, 1994.

OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. The development of *azospirillum* as a commercial Inoculant for improving crop yields. *Biotechnology advances*, v. 13, n. 3, p. 415-424, 1995.

OLIVEIRA, A. L. M; URQUIAGA S.; BALDANI, J. I. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. *Seropédica: Embrapa Agrobiologia*, ago. 2003. 40p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161).

OLIVEIRA, M. C. de: O capim buffel nas regiões secas do Nordeste. Petrolina, PE: EMBRAPA-CPATSA, 1981. 91p. (EMBRAPA-CPATSA. Circular Técnica, 5).

OLIVEIRA, M. C. de; SILVA, C. M. M. de S.; SOUZA, F.B. de. Capim buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) preservação ex-situ e avaliação aprofundada. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina: Embrapa Semi Árido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.

OLIVEIRA, M. C. Capim Buffel: Produção e manejo nas regiões secas do Nordeste. Petrolina, PE: EMBRAPA - CPATSA, 1993 18p. (EMBRAPA - CPATSA. Circular Técnica, 27).

OLIVEIRA, M. C.; SILVA, C. M. M. de S.; SOUZA, F. B. Capim buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) preservação ex-situ e avaliação aprofundada. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R., ed. Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina, PE: Embrapa Semiárido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.

OZIAS-AKINS, P.; ROCHE, D.; HANNA, W. W. Tight clustering and hemizyosity of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by a divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 9, p. 5127-5132, 1998.

PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR of the manuscript based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, v.85, n.8, p.985–93, 1993.

PUPPO, N. I. H. Manual de pastagens e forrageiras: formação, conservação, utilização – Campinas, SP: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 343p., 1979,

QUIROGA, M.; GRUNBERG, K.; RIBOTTA, A.; LÓPEZ, C. E.; CARLONI, E.; TOMMASINO, E.; LUNA, C.; GRIFFA, S. Obtaining sexual genotypes for breeding in buffel Grass. *South African Journal of Botany* 88, 118–123, (2013).

QURAIISHI, M. A. A.; KHAN, K.G.; YAQOOB, M. S. Range Management in Pakistan. Qazi. Publications, Lahore, 1993.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. *Critical Reviews in Plant Science*, v. 19, n. 3, p. 227-247, 2000.

REIS JÚNIOR, F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, n. 5, p. 985-994, 2000.

RODRIGUES, T. J. D.; RODRIGUES, L. R. A.; REIS, R. A. Adaptação de plantas forrageiras às condições adversas. In: FAVORETTO, V.; RODRIGUES, L. R. A.; REIS, R. A. (Eds.). *Simpósio sobre ecossistemas de pastagens*. Jaboticabal: FUNEP, 1993. p17-61.

RODRIGUES NETO, J. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. *Summa Phytopathol*, v. 12, p. 16, 1986.

RONCATO-MACCARI, L. D., RAMOS, H. J., PEDROSA, F. O., ALQUINI, Y., CHUBATSU, L. S., YATES, M. G., SOUZA, E. M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 45, n. 1, p. 39-47, 2003.

SANTOS, M. C. M., Bakke, O. A., & Bakke, I. A. (2013). Ocorrência e atividade de bactérias diazotróficas em forrageiras cultivadas na Região semiárida no Brasil. *Revista Caatinga*, 26(1), 27-34.

SEMAGN et al. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology* V. 5 n. 25 p. 2540-2568 29 December, 2006.

SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 17, n. 3, p. 495-503, 2015.

SYAMALADEVI, D. P.; MEENA, S. S.; & NAGAR, R. P. Molecular understandings on 'the never thirsty' and apomictic *Cenchrus* grass. *Biotechnology letters*, v. 38, n. 3, p. 369-376, 2016.

TAIZ, L., ZEIGER, E., MØLLER, I. M., & MURPHY, A. (2017). *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. Artmed Editora.

VALLS, J. F. M. Caracterização de recursos genéticos vegetais. *Recursos genéticos vegetais*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, v. 1, p. 281-305, 2007.

VIANA, T. O. Isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas em arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado em Vitória da Conquista-BA. Vitória da Conquista: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2012.

VIEIRA, M. E. Q.; SANTANA, D. F. Y.; OLIVEIRA, R. N., Morfogênese do Capim-Búfel (*Cenchrus ciliaris*) cultivado em solução nutritiva. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, PIRACICABA. Anais... Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001. p.368-369.

VOGEL, G.; MARTINKOSKI, L.; RUZICKI, M. Efeitos da utilização de *Azospirillum* brasileiro em poáceas forrageiras: Importâncias e resultados. *AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMIÁRIDO*, v. 10, n. 1, p. 01-06, 2014.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. V. D.; HORNES, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, v. 23 n. 21, p. 4407-4414, 1995.

VOLTOLINI, T. V., SANTOS, F. A. P., MARTINEZ, J. C., CLARINDO, R. L., PENATI, M. A., & IMAIZUMI, H. Características produtivas e qualitativas do capim-elefante pastejado em intervalo fixo ou variável de acordo com a interceptação da radiação fotossinteticamente ativa. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39 n. 5, p. 1002-1010, 2010.

WERNER D.; NEWTON W. E. Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment. Springer Publication, 2005.

WILLIAMS, R. J.; BURT, R. L.; STRICKLAND, R. W. Plant Introduction. In: SHAW, N. H.; BRYAN, W. W., ed. *Tropical pasture research; principles and methods*. Hurley Berkshire, England. Commonwealth Agricultural Bureaux, 1976. Cap. 5, p. 77-100. (Bulletin, 51).

WHITE, A. Establishing Buffel Grass in Central Australia. NT Department of Primary Industry and Fisheries, Northern Territory. n.400, ed.16, 1996.

YADAV, C. B., KUMAR, S., GUPTA, M. G., & BHAT, V. Genetic linkage maps of the chromosomal regions associated with apomictic and sexual modes of reproduction in *Cenchrus ciliaris*. *Molecular breeding*, v. 30, n 1, p. 239-250, 2012.

YANG, C.; ZHANG, J.; XU, Q.; XIONG, C.; BAO, M. Establishment of AFLP technique and assessment of primer combinations for mei flower. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.23, p.79a.-791, 2005.

ZACCARO, R. P., CARARETO-ALVES, L. M., TRAVENSOLO, R. F., WICKERT, E., & LEMOS, E. G. M. (2007). Utilização de marcador molecular SCAR na identificação de *Fusarium subglutinans*, agente causal da malformação da mangueira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 563-570.