



Universidade Federal
de São João del-Rei

JÚLIA PIMENTA PEREIRA

**DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE ESTIRPES DE *Azospirillum spp.* COINOCULADAS
COM FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NO
DESENVOLVIMENTO DE *Urochloa brizantha* cv. Marandu**

**SETE LAGOAS - MG
2022**

JÚLIA PIMENTA PEREIRA

**DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE ESTIRPES DE *Azospirillum spp.* COINOCULADAS
COM FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NO
DESENVOLVIMENTO DE *Urochloa brizantha* cv. Marandu**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de São João del-Rei, *Campus* Sete Lagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias, na área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel
Coorientador: Dr. Francisco Adriano de Souza

**SETE LAGOAS - MG
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P644d PEREIRA, JÚLIA PIMENTA.
DESINFESTÇÃO DE SEMENTES E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE ESTIRPES DE *Azospirillum* spp.
COINOCULADAS COM FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NO
DESENVOLVIMENTO DE *Urochloa brizantha* cv. Marandu /
JÚLIA PIMENTA PEREIRA ; orientador IVANILDO EVÓDIO
MARRIEL; coorientador FRANCISCO ADRIANO DE SOUZA. -
Sete Lagoas, 2022.
64 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Ciências Agrárias) -- Universidade Federal de São
João del-Rei, 2022.

1. COINOCULAÇÃO DE SEMENTES. 2. PRODUÇÃO VEGETAL.
I. MARRIEL, IVANILDO EVÓDIO , orient. II. DE SOUZA,
FRANCISCO ADRIANO , co-orient. III. Título.

JÚLIA PIMENTA PEREIRA

**DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE ESTIRPES DE *Azospirillum spp.* COINOCULADAS
COM FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NO
DESENVOLVIMENTO DE *Urochloa brizantha* cv. Marandu**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de São João del-Rei, *Campus* Sete Lagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias, na área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel
Coorientador: Dr. Francisco Adriano de Souza

Sete Lagoas, 07 de outubro de 2022.

Banca examinadora:

Dr. Frederick Mendes Aguiar – Embrapa Milho e Sorgo

Prof^a. Dr^a. Nádia Nardely Lacerda Durães Parrella - UFSJ



Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel
Orientador - Embrapa Milho e Sorgo

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente guiando e iluminando meu caminho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel, pela confiança em mim depositada, ao aceitar ser meu orientador, e por todo auxílio, que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu coorientador, Dr. Francisco Adriano de Souza, pela confiança, pelos ensinamentos, pela empatia, pelo apoio em momentos turbulentos e pelo incentivo, ao longo desses anos, na execução do trabalho.

À Prof^a. Ana Paula e à Prof^a. Nádia, pelo tempo dispensados a mim, no qual ajudavam-me com sugestões e com esclarecimento de dúvidas.

Aos membros da banca, pelo aceite do convite e pela valorosa contribuição, na conclusão desta etapa tão importante.

Aos meus amados pais, Fátima e Geraldo, irmãos, Camilla e Ana Clara, sobrinhas, Alice e Laís, companheiro, Vinícius, meus sogros Marli e Kleiber, e amigos, em especial à Laís e à Fernanda, pelo incentivo constante, por acreditarem em mim, quando nem eu mesma acreditava, por toda a compreensão, torcida e por sempre estarem comigo.

Aos amigos do NBA, em especial à Júlia, à Gleyce, à Rayanne e ao Mário, por toda a ajuda na montagem e na coleta dos experimentos, por me socorrerem nos momentos difíceis e por me auxiliarem na condução da pesquisa. Sem vocês eu não teria conseguido!

À Universidade Federal de São João del-Rei, pela oportunidade da realização da pós-graduação, que me trouxe crescimentos acadêmico, profissional e pessoal.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Milho e Sorgo, por me disponibilizar o uso de sua estrutura física e de seus recursos, para o desenvolvimento dessa pesquisa.

A todos que, de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e finalização deste trabalho, e, conseqüentemente, o encerramento dessa etapa tão sonhada: o meu muito obrigada!!

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	5
ARTIGO 1 - Diversidade genética de cepas de <i>Azospirillum</i> : Existe relação de compatibilidade com fungos micorrízicos arbusculares no crescimento de <i>Urochloa brizantha</i> ?	8
Abstract	9
Introdução	9
Material e métodos	11
<i>Material biológico</i>	11
<i>Análise de impressão digital genômica com BOX, ERIC e REP – PCR</i>	12
<i>Identificação de cepas por análise da sequência do gene 16S rRNA</i>	13
<i>Experimento de co-inoculação com Urochloa brizantha</i>	14
Resultados	16
Discussão	26
Referências	27
ARTIGO 2 - Avaliação do potencial germinativo e viabilidade de sementes de <i>Urochloa brizantha</i> cv. Marandu, submetidas aos tratamentos de escarificação e de desinfestação de sementes	36
INTRODUÇÃO	39
MATERIAL E MÉTODOS	41
Fornecedores de sementes <i>U. brizantha</i>	41
Teste de Pureza	41
Escarificação e desinfestação de sementes	42
Determinação da viabilidade pelo teste de tetrazólio	43
Condutividade elétrica	44
Marcha de absorção	44
Teste de germinação	45
RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
CONSIDERAÇÕES FINAIS	57

DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESTIRPES DE *Azospirillum spp.* COINOCULADAS COM FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NO DESENVOLVIMENTO DE *Urochloa brizantha* cv. Marandu

RESUMO - O Brasil é o maior exportador de carne bovina do mundo e tem as pastagens, como a base da alimentação, de praticamente, toda a produção no país. No entanto, o país possui cerca de 70 milhões de hectares de pastagens com algum nível de degradação, sendo necessário que o setor pecuário lance mão de tecnologias que visem a recuperação dessas áreas e o manejo mais eficiente de pastagens. Estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar microrganismos que possuam simbiose com gramíneas e que promovam um melhor desenvolvimento da planta e aumento da produção, ao passo que contribuam para a qualidade do solo e diminuição da degradação. Um dos principais obstáculos para a eficiência da inoculação de sementes de *U. brizantha* é a baixa qualidade das sementes. Normalmente, os lotes de sementes desse gênero apresentam grande quantidade de torrões, pedras, insetos entre outros contaminantes que trazem grande carga microbiana e influenciam negativamente o processo de germinação e a eficiência da inoculação dessas sementes com microrganismos benéficos, o que dificulta o estabelecimento de pastagem em boas condições. Diante disso, esse trabalho objetivou a caracterização molecular de estirpes de *Azospirillum sp.* para avaliação da influência da coinoculação de Fungos Micorrízicos Arbusculares e de *Azospirillum sp.* em sementes desinfestadas de *Urochloa brizantha* cv. Marandu no desenvolvimento inicial da planta. Foram avaliados os parâmetros de qualidade das sementes: viabilidade pelo teste de tetrazólio, germinação, condutividade elétrica e umidade pela marcha de absorção de sementes, tratadas e naturais, protocolos de limpeza e desinfestação de sementes, com diferentes combinações de hipoclorito de sódio (NaClO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Outros agentes higienizadores foram testados a fim de se obter procedimentos que melhor atendam as premissas da purificação de sementes de *U. brizantha*, que viabilizem a inoculação com os microrganismos de interesse e que não comprometam sua estrutura física. Ao todo, 12 estirpes de *Azospirillum* foram submetidas à técnicas moleculares baseadas em análises genotípicas de DNA e PCR BOX, ERIC e REP-PCR, para a identificação e a diferenciação dos microrganismos. Para os testes da influência da inoculação de estirpes de *Azospirillum* e FMAs, no desenvolvimento inicial da *U. brizantha*, foram testadas 12 cepas de *Azospirillum sp.*, 2 cepas de FMA e a sinergia entre elas. O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados (DBC), em esquema fatorial 13x3x4, totalizando 39 tratamentos e 156 unidades amostrais. Os parâmetros avaliados foram: número de perfilhos; peso seco da parte aérea, peso seco de raiz e taxa de colonização de fungos no sistema radicular. Foi possível verificar que sementes escarificadas responderam melhor aos testes de germinação, de viabilidade e de condutividade elétrica em comparação à sementes desinfestadas e à sementes naturais. Foi realizada a identificação de todas as estirpes submetidas às técnicas moleculares, sendo 6 delas identificadas como *A. brasilense*. As técnicas de PCR BOX e de ERIC PCR contribuíram de maneira significativa para a diferenciação intraespecífica das estirpes de *Azospirillum*. No experimento de coinoculação, a bactéria que apresentou maior promoção de crescimento de *U. brizantha* foi a cepa CMS1630.

Palavras-chave GERAL: Brachiaria. Pastagens. *Azospirillum*. Micorrizas. *Brizantha*. Fungo Micorrízico Arbuscular. Sementes. Escarificação.

Comitê orientador: Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel (orientador); Prof. Dr. Francisco Adriano de Souza (coorientador)

**DISINFESTATION OF SEEDS AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF
Azospirillum spp STRAINS COINOCULATED WITH ARBUSCULAR
MYCORRHIZAL FUNGI IN THE DEVELOPMENT OF *Urochloa brizantha* cv.
Marandu**

ABSTRACT - Brazil is the largest beef exporter in the world and pastures are the main source of food for practically all production in the country. However, the country has about 70 million hectares of pastures with some level of degradation and it is necessary for the livestock sector to make use of technologies that aim at the recovery of these areas and the more efficient management of pastures. Studies have been carried out with the objective of identifying microorganisms that have symbiosis with grasses and promote better plant development and increased production while contributing to soil quality and reduced degradation. One of the main obstacles to the efficiency of *U. brizantha* seed inoculation is the low quality of the seeds. Usually, seed lots of this genus have a large amount of clods, stones, insects and other contaminants that bring a large microbial load and negatively influence the germination process and the efficiency of inoculation of these seeds with beneficial microorganisms, which makes it difficult to establish pasture in good condition. Therefore, this work aimed at the molecular characterization of strains of *Azospirillum* sp. to evaluate the influence of co-inoculation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and *Azospirillum* sp on disinfected seeds of *Urochloa brizantha* cv. Marandu in the initial development of the plant. Seed quality parameters were evaluated: viability by the tetrazolium test, germination, electrical conductivity and moisture by the imbibition curve of treated and natural seeds. Aiming at seed cleaning, seed cleaning and disinfestation protocols, with different combinations of sodium hypochlorite (NaClO) and hydrogen peroxide (H₂O₂) and other sanitizing agents, were tested in order to obtain the procedures that best meet the premises of the purification of *U. brizantha* seeds, enable inoculation with the microorganisms of interest and do not compromise their physical structure. Altogether, 12 *Azospirillum* strains were submitted to molecular techniques based on genotypic analysis of DNA and PCR BOX, ERIC and REP-PCR for the identification and differentiation of microorganisms. To test the influence of inoculation of *Azospirillum* strains and AMFs on the initial development of *U. brizantha*, 12 strains of *Azospirillum* sp., 2 strains of AMF and the synergy between them were tested. The experimental design was in completely randomized blocks (DBC), in a 13x3x4 factorial scheme, totaling 39 treatments and 156 sampling units. The parameters evaluated were number of tillers; shoot dry weight, root dry weight and fungal colonization rate in the root system. It was possible to verify that scarified seeds responded better to germination, viability and electrical conductivity tests compared to disinfected seeds and natural seeds. It was possible to identify all strains submitted to molecular techniques, 6 of which were identified as *A. brasilense*. BOX PCR and ERIC PCR techniques contributed significantly to the intraspecific differentiation of *Azospirillum* strains. In the co-inoculation experiment, the bacterium that showed the greatest growth promotion of *U. brizantha* was strain CMS1630.

Keywords: Brachiaria. Pastures. *Azospirillum*. Mycorrhizae. *Brizantha*. Arbuscular Mycorrhizal Fungus. Seeds. Escarification.

INTRODUÇÃO GERAL

A pecuária de corte foi responsável por 27,4% do PIB em 2020, colocando o Brasil como um dos principais produtores e exportadores de carne do mundo (FAO, 2022). A pastagem ainda é considerada a forma mais econômica e viável, de produzir e de oferecer alimentos aos animais e, por isso, é a base, de praticamente toda, a produção de carne bovina no Brasil (DIAS-FILHO, 2014). Segundo a Embrapa Agroecologia (2021), existem aproximadamente, 200 milhões de hectares de pastagens cultivadas, inseridas em sistemas extensivos de criação de animais, no país.

Ao longo dos anos, as espécies de *Urochloa* (sin. *Brachiaria*) se tornaram as forrageiras mais utilizadas em pastagens, na América Tropical. Dentre elas a *Urochloa brizantha* se destaca, estando presente em cerca de 90% das áreas de pastagens, cultivadas no Brasil (CRISPIM e BRANCO, 2002). Essa espécie, se desenvolve bem em variadas condições de solo e clima e, por isso, proporciona boas produções de matéria seca e eficiência na cobertura do solo, mesmo em solos com fertilidade baixa ou mediana, desde que sejam bem manejados (SOARES FILHO, 1994; GHISI, 1991).

Por outro lado, ainda que as espécies de *Urochloa* sejam tolerantes às condições menos favoráveis, o manejo inadequado favorece a degradação das áreas de pastagens cultivadas, que passam a apresentar menor tolerância aos estresses hídrico e climático, impactando diretamente o seu desenvolvimento (SILVA et al., 2011). No Brasil, existem aproximadamente, 130 milhões de hectares de pastagens degradadas, que apresentam baixa produção e má qualidade das forrageiras, em consequência de práticas de manejo inadequado, o que eleva a pressão sobre a abertura de novas áreas (VOGEL et al., 2014).

Diante disso, a recuperação de áreas de pastagens, atualmente degradadas, é extremamente importante para a promoção da sustentabilidade dos sistemas pastoris, além de reduzir o uso de áreas de florestas, em detrimento da expansão de áreas de pastagens e de estimular o equilíbrio entre os eixos ambiental, econômico e social (HUNGRIA et al., 2016; CARVALHO, 2017). Dentre as práticas existentes, de manejo empregadas nos processos de recuperação de pastagens, o uso de microrganismos específicos que possuem simbiose com gramíneas pode ser fundamental.

Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), podem desempenhar importantes papéis na recuperação e na sustentabilidade de áreas que estejam

degradadas, uma vez que conseguem incorporar ao solo, o nitrogênio atmosférico (N₂), por meio da fixação biológica, em quantidades significativas e, ainda, produzir e liberar substâncias reguladoras do crescimento vegetal, que proporcionam aumento do sistema radicular, favorecendo a melhoria da nutrição mineral e a utilização da água pelas plantas em geral (BAZZICALUPO e OKON, 2007). As BPCP podem atuar de forma isolada ou em associações, com outras bactérias e fungos, como os fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Os FMA também são microrganismos que podem auxiliar no desenvolvimento de plantas e na qualidade do solo, já que favorecem a aquisição de água e de nutrientes pelo sistema radicular das plantas, e aumentam a resistência destas, contra estresses bióticos e abióticos (SMITH READ, 2008; SOUZA ET AL. 2017). Essa interação ou a combinação, com diferentes microrganismos, naturalmente presentes no solo, são capazes de produzir inúmeros efeitos benéficos nas plantas por sinergia (DARTORA et al., 2016).

O gênero *Azospirillum*, em especial a espécie *Azospirillum brasilense*, dentre as bactérias fixadoras de nitrogênio, presentes na rizosfera das gramíneas, é foco de uma série de estudos, em diversos tipos de cultura, pela sua vasta distribuição nos solos tropicais. Tais estudos demonstram que, dentre as contribuições do uso da *Azospirillum brasilense*, destacam-se o aumento na taxa de acúmulo de matéria seca, o aumento na biomassa e na altura, a aceleração na taxa de germinação e os benefícios no sistema radicular, proporcionando consequente aumento na produtividade final (HUNGRIA, 2010; DALLA SANTA et al., 2004; VOGEL et al., 2013).

De forma objetiva, *Azospirillum sp.* são bactérias, Gram-negativas, que pertencem ao filo de proteobactérias alfa, presentes em uma extensa diversidade de ambientes e de plantas, incluindo não apenas aqueles de importância agrônômica, mas também de outras espécies vegetais como café, frutas, e plantas florais, incluindo orquídeas (PEDRAZA et al., 2020). O sinergismo, presente entre os mecanismos de ação dessas bactérias e a planta hospedeira, resulta em maior desenvolvimento radicular, melhores exploração do solo e absorção de nutrientes (HUNGRIA et al, 2010). Até o momento, cerca de 22 espécies foram descritas, sendo a maioria diazotrófica. No entanto, em termos de fisiologia, genética e aproveitamento agrícola, as espécies mais estudadas são *A. brasilense* e *A. lipoferum*, descritas por Tarrand et al. (1978), associadas a gramíneas forrageiras, milho, trigo, arroz, sorgo, cana-de-açúcar e muitas outras plantas (HARTMANN e BALDANI, 2006; ZAMBRANO et al, 2007).

Os primeiros estudos sobre *Azospirillum brasilense*, já evidenciaram a contribuição dessa espécie para o crescimento das raízes das plantas, a partir da liberação de AIA (ácido indolacético), giberilinas e citocininas (TIEN et al, 1979). O estímulo do crescimento e a densidade radicular, aumentam a superfície de contato das raízes com o solo, aumentando significativamente, o aproveitamento de água e de nutrientes pelas plantas. Além disso, com um sistema radicular mais desenvolvido, as plantas passam a apresentar um maior vigor e uma maior tolerância a estresses, como salinidade e seca.

A diversidade microbiana dos solos, especialmente em regiões tropicais, é muito grande. Por isso, a seleção de microrganismos, para os diversos aspectos desejáveis, do crescimento das culturas, é extremamente necessária para a formulação de inoculantes eficientes, que contribuam significativamente, para o melhor desenvolvimento e estabelecimento de culturas. A inoculação de microrganismos, benéficos no solo e nos substratos, está cada vez mais integrada ao sistema de produção agrícola e tem possibilitado o aumento de produção, a redução do uso de insumos, a recuperação de pastagens degradadas e a promoção de uma agricultura mais sustentável.

O uso de sementes, como veículo de transmissão da tecnologia de inoculação, é considerado uma das técnicas menos onerosas, para a inserção desses microrganismos nos sistemas agrícolas. Sementes inoculadas, com estirpes eficientes de bactérias promotoras de crescimento, auxiliam no incremento da produção, no reequilíbrio da biota do solo, no melhor desenvolvimento e estabelecimento das plantas; além de contribuírem para a diminuição de custos, associados à redução do uso de fertilizantes. No entanto, aspectos inerentes à qualidade: física, fisiológica, genética e sanitária, são de suma importância para a maximização do emprego de tecnologias, como a da inoculação. A qualidade da semente é definida como o conjunto de atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários, que têm influência na capacidade do lote, de originar um cultivo uniforme, formado por plantas saudáveis e representativas do cultivar, livre de plantas invasoras ou indesejáveis (POPINIGIS, 1985).

O crescimento da demanda, por forrageiras, vem impulsionando o desenvolvimento da indústria sementeira no Brasil. O país é considerado o maior produtor, consumidor e exportador, de sementes de forrageiras tropicais, com cerca de 95% da produção, dessas sementes, destinadas ao comércio interno, e o restante exportado para países da América do Sul e Central (MARTINS, 1997; MARCHI et al., 2008). Os padrões mínimos e normas para produção e para comercialização de sementes, de espécies forrageiras tropicais, foram estabelecidas pela Lei nº 10.711, criada em 5 de

agosto de 2003, que institui e dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudas – SNSM e a Instrução Normativa nº 30, de 21 de maio de 2008 (BRASIL, 2009). Ainda, para serem comercializadas, as sementes precisam atender aos Padrões de Qualidade Estaduais ou Federais, estabelecidos para a espécie (BRASIL, 2009; CARVALHO e NAKAGAWA, 2012). É importante destacar que os lotes de sementes que não atingem os percentuais mínimos de germinação ou a pureza exigidos pela legislação têm a sua comercialização proibida como semente (BRASIL, 2009).

Apesar das legislações vigentes, estudos sobre a qualidade das sementes forrageiras, de diferentes espécies comercializadas, apontam a ocorrência de comércio de sementes desse gênero, de baixa qualidade no Brasil, (DIAS; ALVES, 2008; CUSTÓDIO et al., 2012). Segundo Mallmann et al. (2013), sementes de baixa qualidade sanitária são uma das frequentes causas, do fracasso na formação de áreas de pastagens, o que causa impactos negativos na sustentabilidade da atividade pecuária.

Microrganismos, potencialmente patogênicos, já foram identificados em sementes de pastagens no Brasil. Alguns fungos podem provocar aborto, deformações, redução de tamanho e demais prejuízos nas sementes, os quais têm reflexos na diminuição da viabilidade e da germinação das mesmas, além de prejudicarem o sucesso do uso da tecnologia de inoculação, dessas sementes, por microrganismos benéficos (NEERGAARD, 1979; GUIMARÃES et al., 2006). Por outro lado, é escasso o conhecimento sobre a qualidade sanitária, de sementes forrageiras, produzidas e comercializadas no país, o que contribui para o aumento da incidência de doenças em áreas de pastagens, para a produção de baixa qualidade e para a degradação (VECHIATO e APARECIDO, 2010).

Apesar da necessidade de informações pelos produtores, pelos consumidores e pelos exportadores de sementes, sobre o estabelecimento de padrões de sanidade a campo e nas sementes, bem como a oferta de técnicas e de produtos, eficientes para o tratamento de sementes, pouco foi estudado sobre o assunto até o momento (VECHIATO et al., 2008) e por isso, praticamente não existem recomendações para o controle dos patógenos, incidentes em sementes de forrageiras (VERZIGNASSI e FERNANDES, 2001).

Estudos acerca da avaliação da qualidade de sementes, se fazem necessários devido à crescente demanda de sementes de gramíneas forrageiras no mercado brasileiro, considerando a necessidade das mesmas, na recuperação de pastagens, no uso da integração lavoura-pecuária e nas demais atividades, como o plantio direto, além de ser o

principal e o mais importante veículo de tecnologia das lavouras. Contudo, sementes de forrageiras saudáveis viabilizam o uso de microrganismos, promotores de crescimento de plantas, que podem auxiliar no processo de recuperação de pastagens degradadas, minimizando a necessidade de abertura de novas áreas para atividades agropecuárias e promovendo a sustentabilidade no campo.

REFERÊNCIAS

BAZZICALUPO, M.; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G. et al. (Eds.) **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.409-413.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (Brasil). **Regras para análise de sementes: 2009. Brasília. 399p. (Mapa/ ACS, ISBN 978-85-99851-70-8).**

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 2012. 68p. Tese (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CRISPIM, S.M.A.; BRANCO, O.D. Aspectos gerais das Braquiárias e suas características na sub-região da Nhecolândia, Pantanal, MS. Corumbá, 2002. (EMBRAPA Pantanal. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**).

CUSTÓDIO, C.C; DAMASCENO, R.L.; MACHADO NETO, N.B. Imagens digitalizadas na interpretação do teste de tetrazólio em sementes de *Brachiaria brizantha*. **Revista Brasileira de Sementes**, v.34, n.2, p.334-341, 2012.

DALLA SANTA, O. R.; SOCCOL, C. R.; RONZELLI, P.; HERNÁNDEZ, R. F.; ALVAREZ, G. L. M.; DALLA SANTA, H. S.; PANDEY, A. Effects of inoculation of *Azospirillum* sp. in maize seeds under field conditions. **Food, Agriculture and Environment (JFAE)**, n.2, p.238-242, 2004.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MENEZES, C. R. J.; FREIBERGER, M. B.; CASTOLDI, G.; GONÇALVES, E. D. V. Maize response to inoculation with strains of plant growth-promoting bacteria. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.20, n.7, p.606-611, 2016.

DIAS, M.C.L.L.; ALVES, S.J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich) Stapf pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.3, p.145-151, 2008.

DIAS-FILHO, M. B. **Diagnóstico das pastagens no Brasil**. Belém, 2014. 36p. (EMBRAPA Amazônia Oriental. Documentos, 402). Disponível em:

<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/986147/diagnostico-das-pastagens-no-brasil>

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Effects of stress and injury on meat and by-product quality**. Chapter 2: In: G HEINZ (Ed). Guidelines for Humane Handling, Transport and Slaughter of Livestock. 2001, p. 6–10. Disponível em: https://www.wellbeingintlstudiesrepository.org/acwp_faafp/20/. Acesso em: outubro de 2022.

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

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

MALLMANN, G. et al. Fungos e nematoides associados a sementes de forrageiras tropicais. *Summa Phytopathologica*. v. 39, p. 201-203, 2013.

MARTINS, L.; SILVA, W. R. Efeitos imediatos e latentes de tratamentos térmico e químico em sementes de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu. *Bragantia*. v. 62, n. 1, p. 81-83, 2008.

NEERGAARD, P. Seed pathology. London: The Macmillan, 1979. v.1, 839p.

PEDRAZA, R.O., Filippone, M.P., Fontana, C., Salazar, S.M., Ramírez-Mata, A., Sierra-Cacho, D., Baca, B.E., 2020. *Azospirillum*. In: Amaresan, N., Senthil Kumar, M., Annapurna, K., Kumar, K., Sankaranarayanan, A. (Eds.), *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi*. Elsevier, Academic Press, pp. 73–105. ISBN: 9780128234143.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2.ed. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

SILVA, A. S.; LAURA, V.A.; FERNANDES, V.; JANK, L.; VALLE, C. B. do; GONTIJO NETO, M.M. Biomassa seca da raiz e da parte aérea de cultivares de *Brachiaria brizantha* e de *B. humidicola* alagadas e não alagadas. *Revista Brasileira de Biociências*, v.5, S.2, p.123-125, 2007.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. London: Academic Press, 2008.

SOARES FILHO, C.V. Recomendações de espécies e variedades de *Brachiaria* para diferentes condições. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM 11., 1994, Piracicaba. Anais... Piracicaba: FEALQ, 1994. p.25-48

SOUZA, F. A. de.; BERBARA, R. L. L. **Ontogeny of *Glomus clarum* in Ri T-DNA transformed roots**. *Mycologia*, v. 91, p. 343-350, 1999. DOI: <https://doi.org/10.2307/3761379>.

SOUZA, F. A. de; DECLERCK, S. **Mycelium development and architecture, and spore production of *Scutellospora reticulata* in monoxenic culture with Ri T-DNA transformed carrot roots.** Mycologia, v. 95, p. 1004-1012, 2003.

TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of *Spirillum* lipoferum group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen-nov and two species, *Azospirillum* lipoferum (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum* brasilense sp. nov. Can. **J. Microbiol.**, 24:967- 980, 1978.

TIEN, T. M., GASKINS, M. H., HUBBELL, D. H. Plant Growth Substances Produced by *Azospirillum brasilense* and Their Effect on the Growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, May 1979, p. 1016-1024 Vol. 37, No. 5. 0099-2240/79/05-1016/09\$02.00/0.

VECHIATO, M. H.; APARECIDO, C. C.; FERNANDES, C. D. *Frequência de fungos em lotes de sementes comercializadas de Brachiaria e Panicum*. São Paulo, 2010 (Instituto Biológico. Documento técnico, 007). Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/870871>. Acesso em: outubro de 2022.

VECHIATO, M.H; APARECIDO, C.C. Fungos em sementes de gramíneas forrageiras: restrição fitossanitária e métodos de detecção. 2008.

VERZIGNASSI, J.R.; FERNANDES, C.D. Doenças em forrageiras. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 2p. (**Gado de Corte Divulga**, 50).

VOGEL GF, MARTINKOSKI L, RUZICKI M (2014) Efeitos da utilização de *Azospirillum brasilense* em poáceas forrageiras: importâncias e resultados. Agropecuária Científica no Semiárido, 10(1):1-6. doi: <http://dx.doi.org/10.30969/acsa.v10i1.471>.

Júlia Pimenta Pereira

Universidade Federal de São João del-Rei, Sete Lagoas – MG

juliapimentap@gmail.com

ARTIGO 1 - Diversidade genética de cepas de *Azospirillum*: Existe relação de compatibilidade com fungos micorrízicos arbusculares no crescimento de *Urochloa brizantha*?

PEREIRA, J.P.¹; SILVA, M. S. S²; SILVA, A.P.C.M¹; SOUZA, F. A.³; MARRIEL, I. E.^{1,3}

¹Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), *Campus Sete Lagoas*.

²UNIFEEN – Centro Universitário, Graduando em Ciências Biológicas.

³Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais **Title - Genetic diversity of *Azospirillum* strains: Is there a relationship of compatibility with arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of *Urochloa brizantha*?**

Author information

Júlia Pimenta Pereira¹; Mário Sergius de Sousa e Silva²; Ana Paula Coelho Madeira Silva¹; Francisco Adriano de Souza³; Ivanildo Evódio Marriel^{1,3*}

¹Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), *Campus Sete Lagoas*, Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Sete Lagoas (MG).

²UNIFEEN – Centro Universitário, Graduando em Ciências Biológicas.

³Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais State – 35702-098, Brazil.

Corresponding author: (*) Ivanildo Evódio Marriel - ivanildo.marriel@embrapa.br

Authors email:

Ana Paula Coelho Madeira Silva - anapaula@ufs.edu.br

Francisco Adriano de Souza – francisco.adriano@embrapa.br

Ivanildo Evódio Marriel – Ivanildo.marriel@embrapa.br

Júlia Pimenta Pereira – juliapimentap@gmail.com

Mário Sergius de Sousa e Silva - mariourach@gmail.com

ORCID

Ana Paula Coelho Madeira Silva ORCID [0000-0003-4248-1802](https://orcid.org/0000-0003-4248-1802)

Francisco Adriano de Souza ORCID [0000-0001-7083-3444](https://orcid.org/0000-0001-7083-3444)

Ivanildo Evódio Marriel ORCID [0000-0002-1670-0285](https://orcid.org/0000-0002-1670-0285)

Abstract

The development and utilization of biofertilizers is growing towards sustainable and low carbon emission farming systems. The innovation in this sector is strongly related with the process of isolation, and selection of microbes - able to improve plant health, nutrient use efficiency, growth, and yields. Here we characterized the genetic diversity of 13 strains of diazotrophic bacteria using PCR based genotyping techniques (BOX, ERIC and REP-PCR) identification based on 16S rRNA genes sequence using BLAST-N and phylogenetic reconstruction to cluster the bacteria into groups. And test if there is a relationship of compatibility when co-inoculated with two isolates of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) on the pasture grass *Urochloa brizantha* growth. The fingerprint techniques clustered the bacteria in two major clusters. Among the 13 strains, ten were identified as *Azospirillum* showing close relationship with *A. brasilense* and *A. formosense*. The other two were identified as *Pseudomonas* and *Bacillus*. The cluster of REP_PCR and 16S rDNA sequence analyses recovered similar groups. The experiment of co-inoculation of bacteria and AMF showed no significant interaction between each other for the tiller number, shoot and root biomass. However, for the root/shoot ratio the interaction was significant as two bacteria strains decreased the R/S ratio of the control treatments and the presence of AMF inoculum restored the normal growth. The relation between genetic groups of diazotrophic bacteria and plant performance need further studies.

Keywords

Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Genomic Fingerprint. Nitrogen Fixing Bacteria. BOX-PCR. ERIC-PCR. REP-PCR.

Statements and Declarations

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Introdução

O desenvolvimento e a utilização de biofertilizantes cresce em direção a sistemas agrícolas, sustentáveis e de baixa emissão de carbono. A inovação neste setor está fortemente relacionada com o processo de isolamento e de seleção de microrganismos, capazes de melhorar a saúde das plantas, a eficiência no uso de nutrientes, o crescimento e a produtividade. A diversidade microbiana associada ao solo e à planta é enorme, e ainda amplamente desconhecida, especialmente em regiões tropicais. Diferentes grupos de bactérias e de fungos são conhecidos por promover o crescimento de plantas, entre outros micróbios, sendo dois deles bactérias do gênero *Azospirillum* e fungos do Filo Glomeromycota - conhecidos como fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

Azospirillum é um gênero de Alphaproteobacteria gram-negativo, que compreende bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre, promotoras do crescimento de plantas e conhecidas por seu papel na produção agrícola sustentável e na indústria de biofertilizantes [1, 2]. *Azospirillum* é um dos gêneros mais estudados, entre as rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCP). Centenas de estudos realizados em vários países, relataram benefícios na inoculação de *Azospirillum spp* [1, 3]. Relatos de inoculação dessa bactéria, no crescimento de plantas, já foram demonstrados para 113 espécies de plantas, de 35 famílias botânicas, incluindo 14 espécies de cereais, indicando que o gênero abrange cepas para praticamente todas as espécies de plantas, testadas até o momento [3]. Até agora, cerca de 22 espécies foram descritas, a maioria delas diazotróficas. No entanto, em termos de fisiologia, de genética e de uso agrícola, as espécies mais estudadas são *A. brasilense* e *A. lipoferum*, descritas por Tarrand et al. [4], associadas à gramíneas forrageiras, ao milho, ao trigo, ao arroz, ao sorgo, à cana-de-açúcar e à muitas outras plantas [5, 6].

FMA, do filo Glomeromycota [7], representam uma linhagem fúngica basal, de simbioses vegetais, conhecidos por aumentar a capacidade, do sistema radicular, de procurar água e nutrientes [8, 9, 10]. Esses fungos formam relações simbióticas, com cerca de 72% das espécies vegetais, incluindo as principais culturas alimentares, energéticas, madeiras e fibrosas [11]. No caso dos FMA, que são micróbios biotróficos obrigatórios – a indústria de inoculantes é baseada em uma riqueza restrita de espécies [12]. Com base nesses autores, a maioria desses fungos que compõem os inoculantes comerciais são de uma única família Glomeraceae, da ordem Glomerales. E dentro desta família, as espécies do gênero *Rhizoglyphus*, *Glomus* e *Funneliformis* estão entre as espécies mais comuns, que compõem formulações de inoculantes comerciais, de fungos micorrízicos [12].

A co-inoculação desses dois grupos, de microrganismos, tem grande potencial para melhorar o desempenho das culturas e para aumentar a eficiência do uso de água e de nutrientes [13, 14]. No entanto, a seleção de microrganismos, para co-inoculação, requer o desenvolvimento de estratégias para realizar experimentos simples, rápidos e confiáveis, para lidar com centenas de combinações possíveis, entre diferentes grupos de microrganismos. Uma estratégia é caracterizar a diversidade, dentro de cada grupo de cepas (bactérias e fungos), para identificar agrupamentos com base em semelhanças. Em seguida, selecionar cepas representativas, de cada grupo, para realizar experimentos com outros grupos de microrganismos, para co-inoculação em plantas. Uma maneira de caracterizar a diversidade genética, de cepas bacterianas, é usando técnicas de impressões digitais genômicas, por exemplo, REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR [15]. Essas técnicas podem ser combinadas com a análise de sequenciamento de DNA, em 16S rDNA para uma rápida identificação de cepas bacterianas.

A seleção de cepas microbianas, visando aspectos de promoção do crescimento vegetal e da sua compatibilidade, com outros grupos de micróbios benéficos, é um processo trabalhoso e caro. Nesse sentido, testou-se a compatibilidade de 12 cepas de *Azospirillum*, com dois FMA, no crescimento de *Urochloa brizantha*. Primeiro, caracterizou-se a diversidade genética das cepas de *Azospirillum*, usando técnicas de impressão digital molecular (BOX-PCR, ERIC-PCR e REP-PCR), para agrupá-las com base em suas semelhanças genéticas e a identidade, com base nas sequências do gene 16S rRNA. Em seguida,

afериu-se se esses grupos estão relacionados com o desempenho funcional e a compatibilidade com FMA, quando co-inoculados, em *Urochloa brizantha*. Além disso, avaliou-se inicialmente, a homologia dos primers 27F e 1492R, frente a *Azospirillum*.

Material e métodos

Material biológico

As cepas bacterianas utilizadas (Tabela 1) (1) CMS18, (2) CMS11, (3) BDF25, (4) CMS1630, (5) CMS2131, (6) CMS5, (7) BDF23, (8) CMS 2058, (9) CMS1626, (10) CMS2153, (11) BDF12 e (12) BDF145.1, pertencem ao Banco de Germoplasma Microbiano, da Embrapa Milho e Sorgo. As culturas foram ativadas, a partir de culturas estoque, em meio sólido NFb - Malato (BALDANI et al., 2014a), em incubadora a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 3 dias. Após esse período, as características morfológicas, das colônias bacterianas (forma, cor, altura e margem), foram inspecionadas visualmente, com auxílio de microscópio para verificar sua pureza, após a ativação. As colônias ativadas foram usadas para extração de ácido nucleico, conforme descrito abaixo, em Caracterização das estirpes.

Extração de DNA

Os ácidos nucleicos, das cepas, foram extraídos usando o método de brometo de hexadecil trimetil amônio (CTAB). Colônias únicas foram transferidas para tubos plásticos, de 50 mL, contendo 30 mL de meio líquido Trypic Soy Broth (KASVI), e incubadas, em incubadora refrigerada, modelo TECNAL TE - 421, sob agitação orbital de 146 rpm, a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 72h. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 4.000 rpm, por 5min ou até formar um pellet relevante. Ato contínuo, o sobrenadante foi descartado e os pellets foram suspensos, em 1500 μL de tampão CTAB (2% CTAB, 100 mM TRIS-HCl pH 9,0, 20 mM Na EDTA pH 8,0, 1,5 M NaCl, 2% mercaptoetanol e 0,1 mg de proteinase K), por vortex, por 1min. Logo depois, o material foi dividido em dois microtubos de 2,0 mL de capacidade para facilitar o manuseio dos tubos nas etapas subsequentes.

Dando continuidade, aplicou-se três rodadas de choque térmico, congelando os tubos em N_2 líquido, e descongelando em banho-maria a 65°C , seguido de incubação por 10min, na mesma temperatura. Para a separação das proteínas, adicionou-se 800 μL de clorofórmio octanol (24:1 v:v), e homogeneizou-se os tubos, por 15min, em agitador de inversão. Os tubos foram então centrifugados, a 1400 rpm, por 10min, e o sobrenadante, foi transferido para um novo microtubo de 2,0 mL, devidamente identificado. Na sequência, 1000 μL de isopropanol 70% frio (-20°C) foi adicionado ao microtubo, e o mesmo foi invertido, manualmente, para homogeneizar o material, sendo armazenado em freezer overnight.

Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm, por 10min., e o sobrenadante descartado. Depois, foram adicionados 200 μL de etanol 70% frio, os tubos foram homogeneizados, manualmente, por inversão, por três vezes, centrifugados a 14.000, por 10min, e o sobrenadante, descartado. Esta etapa foi repetida três vezes. Retirou-se o etanol e secou-se o pellet, com auxílio de centrífuga a vácuo. O pellet de DNA foi ressuspendido, em 100 μL de TE pH 8,0 e 0,2 μL de RNase, a 10 mg/ml. Logo após, os tubos foram

incubados, em banho-maria, a 37°C por um período de 5 a 10min. A qualidade e a concentração do DNA foram avaliadas em gel de agarose, a 1%, e em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific™, Wilmington, DE, EUA), seguido de diluição para 30 ng/μL.

Tabela 1

As cepas bacterianas, utilizadas no desenvolvimento do trabalho.

BRM	Código de acesso	Código de pesquisa	Hospedeiro	Substrato
BRM 044320	CMPC 1830	CMS18	-	-
BRM 044319	CMPC 1829	CMS11	-	-
BRM 051289	CMPC 2262	BDF25	-	-
BRM 044312	CMPC 1822	CMS1630	Poaceae » Sorghum » bicolor	-
-	-	CMS2131	-	-
BRM 044317	CMPC 1827	CMS05	-	-
BRM 051287	CMPC 2260	BDF23	-	-
BRM 034862	CMPC 122	CMS2058	-	-
BRM 044311	CMPC 1821	CMS1626	Poaceae » Sorghum » bicolor	-
BRM 044316	CMPC 1826	CMS2153	-	-
BRM 051276	CMPC 2249	BDF12	-	-
BRM 063508	CMPC 2472	BDF145.1	-	-

Caracterização das cepas Bacterianas

Análise de impressão digital genômica com BOX, ERIC e REP – PCR

BOX-PCR

O BOX-A1R é baseado em elementos palindrômicos extragênicos repetitivos, e é uma das técnicas mais utilizadas para genotipar isolados microbianos. O DNA extraído, de cada cepa, foi identificado usando o primer BOXA1R (Tabela 2), seguindo os procedimentos descritos por Versalovic et al., (1994). As reações foram definidas em 20 μL de volume final, contendo 4,0 μL de 5X GoTaq® Flexi Buffer, 0,5 μL de (10 μg. μL⁻¹) Albumina de Soro Bovino (BSA), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mix, 0,4 μM BOXA1R primer, 60 ng de DNA purificado e 1U GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (PROMEGA, EUA). O programa de amplificação por PCR foi: 94°C por 7min, seguido de 34 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 52°C, 8min a 65°C, e uma extensão final, de 10min a 65°C (Versalovic et al., 1994). Posteriormente, 20 μL de produtos de PCR foram separados, em géis de agarose (1,5% p/v), por 3,0h a 90 V, e o gel foi corado com Gel Red™. As imagens foram capturadas, digitalmente, sob luz UV (Gel Logic 200 - KODAK Company).

ERIC-PCR

Para a aplicação da técnica ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - PCR) foram utilizados os primers ERIC 1R e ERIC 2F (Tabela 2), com a mesma mistura de PCR descrita acima, e o programa do ciclador térmico: desnaturação inicial a 95°C por 2min, seguido de 35 ciclos, de 30s a 95°C, 30min a 54°C, 1min a 72°C e uma extensão final, de 10min a 72°C.

REP-PCR

Para a aplicação da técnica ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - PCR) foram utilizados os primers ERIC 1R e ERIC 2F (Tabela 2), com a mesma mistura de PCR descrita acima, e o programa do ciclador térmico: desnaturação inicial a 95°C por 2min, seguido de 35 ciclos de 30s a 95°C, 30min a 54°C, 1min a 72 °C e uma extensão final, de 10min a 72°C.

Os perfis de bandas, gerados a partir do BOX, ERIC e REP-PCR, foram utilizados para construir matrizes binárias ('0' = ausência de bandas e '1' = presença de bandas) e convertidas em matrizes de dissimilaridade. Uma banda foi considerada polimórfica se ocupasse uma posição diferente, ao longo das pistas no gel de agarose, como amplicons de DNA de tamanhos diferentes, que se movem em taxas diferentes e que, portanto, ocuparão posições diferentes no gel. Essa característica implica que a reprodutibilidade da técnica, depende da padronização do gel e das configurações eletroforéticas (concentração de agarose, voltagem e tempo, tampão). Para testar a reprodutibilidade dos métodos, de impressão digital, testou-se diferentes amostras e amplificou-se um conjunto de cepas, como medida de controle de qualidade.

Os dendrogramas, para cada método (BOX, ERIC e REP-PCR), foram construídos com base no coeficiente de Jaccard, usando o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) e pacotes "vegan" e "poppr", no software R (R Development Equipe Central, 2016). As correlações entre as matrizes de distância, geradas pelos marcadores BOX + ERIC, BOX + REP e ERIC x REP, foram realizadas por meio do teste de Mantel, no pacote "ade4", do software R (R Development Core Team, v.4.2.1, 2022).

Identificação de cepas por análise da sequência do gene 16S rRNA

A amplificação do 16S rDNA, por PCR, foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 2,5 µL de 10 x Dream Taq Buffer com 20 mM MgCl₂, 60 ng de DNA molde, 0,2 mM de mix dNTPs, 0,5 µL de BSA (10 µg. µL⁻¹), 0,73 U de Dream Taq DNA polimerase (Fermentas Life Science, EUA) e 0,4 µM de cada primer. Modificou-se a sequência original do iniciador 1492R, proposto por Turner et al., (1999), para aumentar sua especificidade em relação às sequências de *Azospirillum* 16S rDNA (Tabela 2 e Informações complementares). O programa utilizado no termociclador incluiu: desnaturação inicial a 95°C por 3min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 54°C por 30s, extensão a 72°C por 1min, e extensão final, por 10min a 72°C. Nove, das 12 cepas, foram sequenciadas (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12).

Tabela 2

Primers utilizados para amplificação do gene 16S rRNA e genotipagem por BOX-PCR, ERIC-PCR e REP-PCR.

Primer	Sequence 5' to 3'	Referencias
BOXAIR	CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G	Versalovic et al., 1994.
ERIC 2F	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G	Wilson and Sharp, 2006.
ERIC 1R	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C	Wilson and Sharp, 2006.
REP F	NNN NCG NCG NAC TCC NGG C	De Bruijin (1992).
REP R	NCG NCT TAT CNG GCC TAC TAC	De Bruijin (1992).
27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Lane, 1991; Furushita et al. 2003
1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	Turner et al., 1999
1492Rm	TAC GGY* TAC CTT GTT ACG ACT T	this study

* Símbolos de posições degeneradas - M = A + C; Y = C + T; Letras em negrito indicam as posições alteradas em relação à sequência original do primer.

Os amplicons de PCR, purificados, foram sequenciados usando a tecnologia Sanger com o BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit em um ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems™), de acordo com o procedimento do fabricante. Os primers usados para sequenciamento estão na Tabela 2.

Os dados das sequências foram reunidos e analisados, usando o pacote de software de análise de sequência Lasergene (DNA Star, Inc., Madison, WI, EUA). Pesquisas de similaridade de sequência, usando a Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico (BLAST), foram realizadas comparando as sequências obtidas com outras sequências microbianas, no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/EXPLOSAO/>). As sequências de nucleotídeos foram alinhadas usando MUSCLE (Edgar 2004), implementado no SeaView versão 5.0.5 (Gouy et al., 2010). As posições com lacunas foram eliminadas, do alinhamento final, usando GBlocks (Castrasama 2000). Árvores filogenéticas de máxima verossimilhança, foram construídas, usando o IQ-Tree, usando servidor web - <http://www.iqtree.org/> - versão 1.6.12 (Trifinopoulos et al., 2016), com 100 replicações bootstrap padrão. O modelo de substituição foi selecionado, automaticamente, pelo software, usando a opção de heterogeneidade de taxa livre.

Experimento de co-ioculação com *Urochloa brizantha*

Fungo Micorrízico Arbuscular

Foram testadas duas linhagens, de fungos micorrízicos arbusculares - *Rhizoglossus* sp2 CNPMS11 e *Glomus heterosporum* CNPMS06. As cepas pertencem à Coleção de Microorganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos, da Embrapa Milho e Sorgo, e foram isoladas, respectivamente, dos biomas Amazônia e Mata Atlântica, registradas no SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado), sob o n°. AEDFA70 (SOUZA et al, 2021). As cepas fúngicas foram identificadas, com base na morfologia dos esporos e geneticamente (dados de Souza não publicados). O inóculo, de ambas as cepas, foi produzido em sistemas monoxênicos assépticos, estabelecidos por propágulos fúngicos e por raízes de cenoura, transformadas com Ri T-DNA, conforme descrito em (de Souza e Berbara 1991; de SOUZA et al, 2021).

Experimento de co-inoculação

O experimento foi realizado, em condições de casa de vegetação, em delineamento fatorial (fúngico (3), bacteriano (13) - 39 tratamentos no total), arranjado em um delineamento de blocos casualizados completos (RCBD). As cepas bacterianas foram cultivadas, em meio TSB a 30°C, sob 100 rpm por 3-4 dias. Após o período de incubação, a densidade celular foi medida em um espectrofotômetro, usando 1 ml do inóculo (cubeta de 2 ml), em um comprimento de onda de 540 nm. Ao atingir a densidade desejada (DO 1,0), as culturas foram centrifugadas, por 10min a 6000 rpm, e o precipitado foi ressuspensão, em solução salina 0,85%. A concentração, do inóculo, foi feita para uma concentração óptica (OD 1,0).

O experimento foi conduzido em vasos, de mudas de árvores (cones), com capacidade para 290 mL. Os cones foram preenchidos com 200 mL de solo, coletado da camada superior de um Latossolo Vermelho. O solo foi previamente peneirado, em peneira de abertura 4mm. Todos os recipientes receberam 2 mL de inóculo de FMA, produzido assepticamente, em Cultura de Órgãos de Raiz (de Souza et al 2021). O inóculo foi colocado em um sulco, no centro de cada recipiente cônico, seguido da semeadura de 200 sementes, por recipiente, e adicionado 1 mL, da cultura bacteriana. Após a semeadura, foi colocada uma camada de 30 mL de solo, para cobrir as sementes. Uma semana depois, as sementes germinaram e as mudas foram podadas, para 5 por vaso. Nenhum tratamento fitossanitário foi necessário, durante todo o período do ensaio. Todos os vasos receberam uma única dose de P (30 ppm - KH_2PO_4), após a adição do solo, em cada vaso. A solução nutritiva de Magnavaca foi usada, para fertilização (Magnavaca et al., 1987), contendo 3,52 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,57 mM KNO_3 , 0,56 mM KCl , 1,17 mM K_2SO_4 , 0,86 mM $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,60 mM NH_4NO_3 , 76,99 μM NaFeEDTA , 24,97 μM H_3BO_3 , 11,84 145 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,63 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,83 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,29 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,20 μM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e μM KI .78 A solução foi aplicada a cada 15 dias. Este estudo foi conduzido, em casa de vegetação, na Embrapa Milho e Sorgo (19°28' S, 44°15'08''W, 732 m de altitude), sob condições semicontroladas, com temperatura média do ar de 28°C.

Noventa dias, após a germinação, o experimento foi colhido. Inicialmente, a raiz e a parte aérea foram separadas, na região do colo da planta. Logo após, contou-se o número de perfilhos (PT) e mediu-se a área foliar (LA), seguido da separação do sistema radicular do solo, manualmente, e também com auxílio de peneira, de abertura de 1 mm. Na sequência, o sistema radicular, de cada vaso, foi cuidadosamente lavado,

com água corrente, seguida de uma lavagem final, em água desmineralizada, seco com papel de seda e armazenado em álcool 70%, para posterior avaliação. No dia seguinte, as raízes foram colocadas em sacos de papel, deixadas para secar em estufa de circulação de ar a 70°C por 72h e, posteriormente foi determinada a matéria seca das raízes (MSR), em balança digital. Em seguida, 0,2 g de raízes finas foram amostradas, aleatoriamente, e utilizadas para quantificação da colonização radicular. A parte aérea das plantas foi lavada com água desmineralizada, acondicionada em sacos de papel, levada à estufa de circulação de ar, a 70°C até peso constante, para determinação da matéria seca da parte aérea (MSD).

As raízes secas foram reidratadas, e clarificadas com KOH (10%), à temperatura ambiente, por 24h e coradas com azul de Trypan (0,05%). A porcentagem, de colonização micorrízica (MC), foi estimada usando o método de interseção de linhas de grade, conforme descrito em Giovanetti & Mosse (1980).

Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas, usando o software R (R versão 4.2.0, "Vigorous Calisthenics", 2022). Para a análise dos parâmetros experimentais, os conjuntos de dados foram autorizados a testar para atender os orçamentos estatísticos, à análise de variância e teste de Tukey, para comparação de médias, considerando o nível de significância a 5%.

Números de acesso da sequência de nucleotídeos

As sequências 16S rRNA, das cepas, foram depositadas no NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Resultados

Todas as três técnicas, de impressão digital testadas, geraram bandas polimórficas, para a maioria das cepas de *Azospirillum* (Figura 1). Os perfis foram altamente reprodutíveis, em amostras independentes, para as mesmas cepas (Figura 1 - informações complementares).

Para BOX-PCR, ERIC-PCR e REP-PCR, o número de bandas polimórficas variou, respectivamente, de 1 a 13; 0 a 9; e 0 a 9 (Tabela 3). No total, foram consideradas 159 bandas polimórficas, com média de 4,4 bandas, por linhagem, nos três métodos (Tabela 3). Apenas a cepa CMS11, não apresentou bandas para ERIC-PCR e REP-PCR (Figura 1, Tabela 3). Portanto, o BOX-PCR foi o único método que produziu bandas, para todas as cepas testadas.

A análise dos dendrogramas, construídos com a matriz de dissimilaridade, indica que as cepas bacterianas eram geneticamente distintas entre si. Apenas as linhagens 1 e 2 apresentaram perfis de impressão digital semelhantes por BOX-PCR (Figura 1). Entretanto, essas duas bactérias compartilhavam apenas uma banda em comum, o que é um argumento fraco para sugerir que são geneticamente semelhantes. A dissimilaridade entre essas duas cepas foi confirmada por ERIC e REP-PCR (Figura 1).

Em geral, os diferentes dendrogramas agruparam as cepas em dois grandes grupos, juntamente com algumas cepas divergentes - exemplo das cepas divergentes 1 a 3 no ERIC-PCR. Contudo, os agrupamentos formados nos diferentes dendrogramas, para cada técnica, não foram compostos pelas mesmas cepas, nem pelas duas cepas mais semelhantes, quando analisadas de baixo para cima (Figura 1). Todavia, as linhagens 4, 5, 6 e 7 estiveram sempre no mesmo grande cluster, assim como as linhagens 8 e 11, sugerindo que elas estão mais relacionadas entre si.

A modificação na sequência original, do primer 16S rDNA 1492R (Tabela 2), diminui sua autocomplementaridade de 5 para 3 ou 5, dependendo da base degenerada (C ou T), aumenta sua homologia com sequências de *Azospirillum*, e sua temperatura de anelamento, de 52,20 a 59,18 e GC% (material suplementar), permitindo uma melhor amplificação durante PCR e sequenciamento de DNA (dados não mostrados), embora a diferença de TM tenha aumentado em relação ao forward primer (27F).

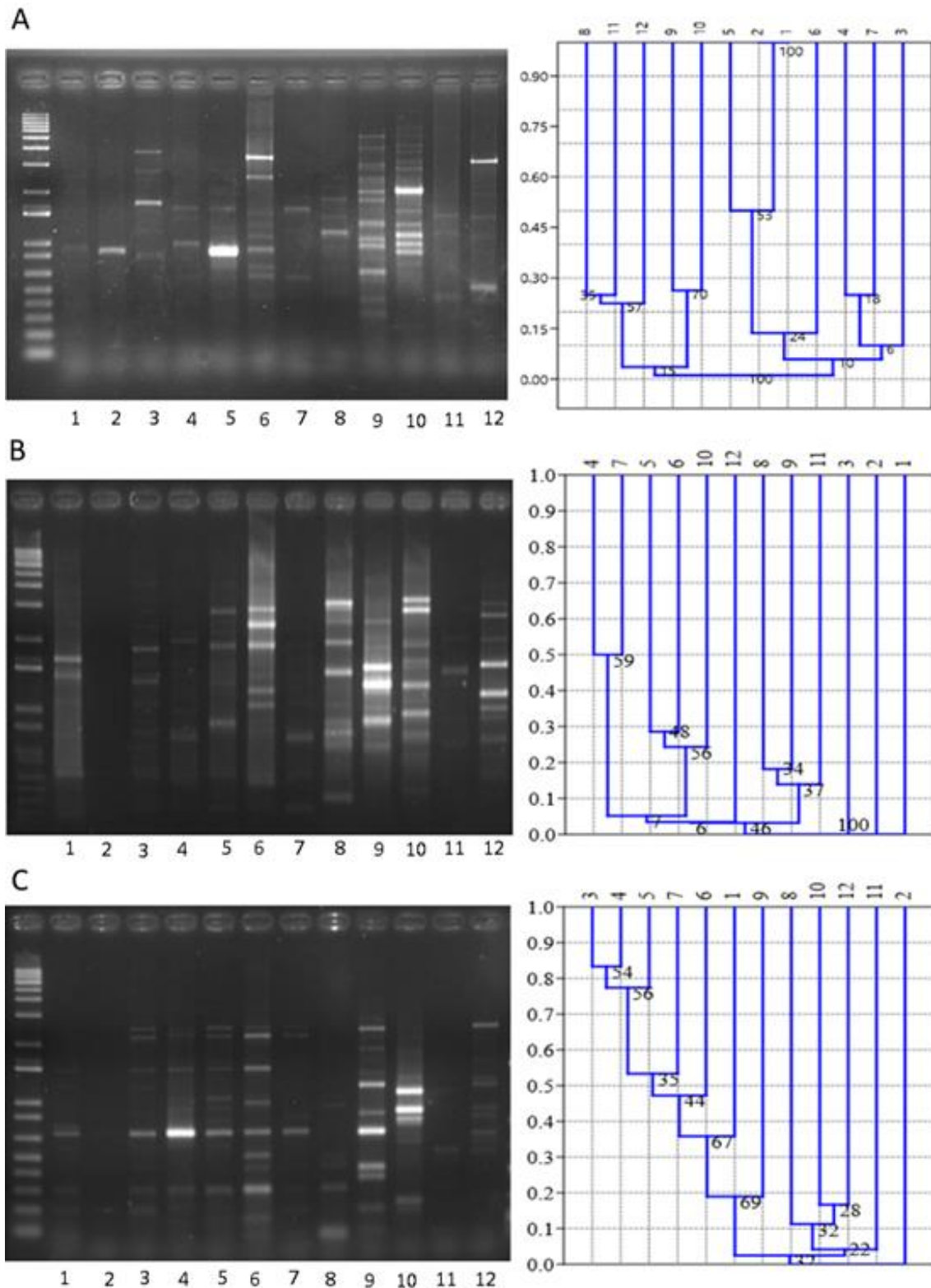


Figure 1. High intraspecies diversity of *Azospirillum brasilense* strains as revealed by genomic fingerprinting tools – BOX (A), ERIC (B), and REP (C) PCR. Strains: 1 = CMS18; 2 = CMS11; 3 = BDF25; 4 = CMS1630; 5 = CMS2131; 6 = CMS05; 7 = BDF23; 8 = CMS2058; 9 = CMS1626; 10 = CMS2153; 11 = BDF12; 12 = BDF145.1.

Tabela 3Number of polymorphic bands of *Azospirillum* strains obtained with different fingerprint techniques.

Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Code	CMS 18	CMS 11	BDF 25	CMS 1630	CMS 2131	CMS 5	BDF 23	CMS 2058	CMS 1626	CMS 2153	BDF 12	BDF 145.1	Total	Average
BOX	1	1	3	3	2	7	2	3	13	11	2	3	51	4.3
REP	5	0	6	5	6	9	3	3	9	6	1	8	61	5.1
ERIC	3	0	2	2	3	6	1	8	5	6	2	9	47	3.9
Total	9	1	11	10	11	22	6	14	27	23	5	19	159	4.4

(*) Number refers to the numbers representing the strains code on some of the figures and tables.

A identificação das sequências do gene 16S rRNA, com base na análise de pesquisa BLAST-N indica que todas as cepas foram relacionadas com *Azospirillum*, exceto a CMS1626 e CMS 2153, respectivamente, *Pseudomonas* e *Bacillus* (Tabela 4). A reconstrução filogenética, baseada em sequências parciais do gene 16S rRNA, coloca todas as nove cepas analisadas, em um clado com 92%, de suporte bootstrap composto por sequências do tipo *A. brasilense* (SP7) e também *A. formosense*, e *A. tabaci* (Figura 2). As sequências 16S rDNA, das cepas 11 e 12, possuem a característica de inserção de *Azospirillum brasilense* SP7 (AGAGAGAATTTGGGC), enquanto todas as outras não. Algumas linhagens apresentaram maior similaridade com *A. formosense* (Seq 2 a Seq7 - Figura 2).

Tabela 4

Identificação por homologia da sequência do gene 16S rRNA de cepas de *Azospirillum* com o banco de dados GenBank pela pesquisa BLAST N.

Código	Identidade	Acesso	Descrição	Filo	Classe
CMS11	99,63%	KY399208.1	<i>Azospirillum sp.</i>	Proteobactéria	Alpha
	99,63%	KP676398.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	Proteobactéria	Alpha
	99,53%	MK543104.1	<i>Azospirillum formosense</i>	Proteobactéria	Alpha
BDF25	99,43%	MK543104.1	<i>Azospirillum formosense</i>	Proteobactéria	Alpha
	99,43%	MK542995.1	<i>Azospirillum formosense</i>	Proteobactéria	Alpha
	99,43%	MK542990.1	<i>Azospirillum formosense</i>	Proteobactéria	Alpha
CMS163 0	99,77%	KY399211.1	<i>Azospirillum sp.</i>	Proteobactéria	Alpha
	99,77%	CP007794.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	Proteobactéria	Alpha
	99,77%	MK543104.1	<i>Azospirillum formosense</i>	Proteobactéria	Alpha
CMS213 1	99,40%	KY399211.1	<i>Azospirillum sp</i>	Proteobactéria	Alpha
	99,47%	CP007794.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	Proteobactéria	Alpha
	99,40%	KC920687.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	Proteobactéria	Alpha
CMS05	99,33%	MK543104.1	<i>Azospirillum formosense</i>	Proteobactéria	Alpha
	99,33%	MK542995.1	<i>Azospirillum formosense</i>	Proteobactéria	Alpha
	99,33%	MK542990.1	<i>Azospirillum formosense</i>	Proteobactéria	Alpha
BDF23	99,33%	MK543104.1	<i>Azospirillum formosense</i>	Proteobactéria	Alpha

	99,33%	MK542995.1	<i>Azospirillum formosense</i>	Proteobactéria	Alpha
	99,33%	MK542990.1	<i>Azospirillum formosense</i>	Proteobactéria	Alpha
CMS205 8	99,71%	MK301162.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	Proteobactéria	Alpha
	99,71%	KP676405.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	Proteobactéria	Alpha
	99,71%	KP676404.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	Proteobactéria	Alpha
CMS162 6	99,21%	LR722854.1	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	Proteobactéria	Alpha
	99,21%	MK114600.1	<i>Pseudomonas reactans</i>	Proteobactéria	Alpha
	99,21%	MG972893.1	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	Proteobactéria	Alpha
CMS215 3	100,00%	OP435758.1	<i>Bacillus tequilensis</i>	Proteobactéria	Alpha
	100,00%	OP435766.1	<i>Bacillus tequilensis</i>	Proteobactéria	Alpha
	100,00%	OP435780.1	<i>Bacillus velezensis</i>	Proteobactéria	Alpha
BDF12	95,86%	CP032340.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	Proteobactéria	Alpha
	95,86%	CP032339.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	Proteobactéria	Alpha
	95,86%	CP012915.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	Proteobactéria	Alpha
BDF 145.1	96,17%	AB480699.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	Proteobactéria	Alpha
	95,98%	MK543093.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	Proteobactéria	Alpha
	95,86%	MT993417.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	Proteobactéria	Alpha

Os resultados obtidos, com o experimento de co-inoculação, indicaram que a inoculação fúngica aumentou a taxa de colonização, independentemente da inoculação bacteriana (Figura 3). Entretanto, as cepas bacterianas afetaram o número de perfilhos e o peso seco da raiz (Tabela 5). Três linhagens bacterianas afetaram, negativamente, o desenvolvimento do peso seco da raiz (BDF12, BDF23 e CMS18), e o número de perfilhos, foi também afetado negativamente, no controle não inoculado e CMS05 e CMS145.1, enquanto a linhagem CMS1630 aumentou significativamente. Por outro lado, a relação Raiz/Parte aérea foi afetada pela interação da co-inoculação. A inoculação, com as bactérias CMS18 e BDF25, diminuiu significativamente a relação Raiz/Caule na testemunha, sem inoculação fúngica, em relação aos tratamentos inoculados com o FMA CNPMS06 (Tabela 6).

Tabela 5

Efeito da inoculação com diferentes cepas de *A. brasilense* em número de perfilhos (NP), peso seco (PS) e peso seco da raiz (PSR) em *U. brizantha* cv. Marandu.

Strain	NP (unid.)	PS (g)	PSR (g)
Witness	10.4b	4.7a	3.7abc
CMS18	12.6ab	4.4a	3.1c
CMS11	11.5ab	4.7a	3.9abc
BDF25	12.3ab	4.7a	3.6abc
1630	15.75a	4.6a	4.4a
2131	12.2ab	4.7a	4.0ab
CMS05	10.8b	4.8a	3.9abc
BDF23	11.8ab	4.4a	3.3bc
CMS2058	11.3ab	4.5a	3.7abc
CMS1626	11.5ab	4.4a	3.7abc
CMS2153	12ab	4.4a	3.8abc
BDF12	12ab	4.6a	3.4bc
BDF145.1	10.2b	4.5a	3.8abc

Means (n=4) followed by the same letter do not differ by the Tukey test at 5% probability ($P \leq 0.05$).

Tabela 6

Efeito da co-inoculação com diferentes cepas de *A. brasilense* e Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) na relação raiz/parte aérea (RPA) em *U. brizantha* cv. Marandu.

Bacteria	AMF		
	Control	CNPMS11	CNPMS06
Control	0.89225 Ans	0.719 aNS	0.76825 nsNS
CMS18	0.49575 Bb	0.705 aAB	0.8877nsA
CMS11	0.82675 abNS	0.8789 aNS	0.787 nsNS
BDF25	0.62325 abB	0.743 aAB	0.982 nsA
1630	0.90375 Ans	1.042 aNS	0.9185 nsNS
2131	0.74150 abNS	0.8805 aNS	0.91075 nsNS
CMS05	0.77625 abNS	0.78925 aNS	0.84375 nsNS
BDF23	0.72825 abNS	0.7445 aNS	0.744 nsNS
CMS2058	0.83725 abNS	0.7345 aNS	0.835 nsNS

CMS1626	0.8975 Ans	0.91875 aNS	0.7305 nsNS
CMS2153	0.84225 abNS	0.993 aNS	0.79125 nsNS
BDF12	0.74025 abNS	0.72175 aNS	0.74425 nsNS
BDF145.1	0.78375 abNS	0.8235 aNS	0.889 nsNS

Means (n = 4) followed by the same capital letters horizontally and lowercase letters vertically do not differ statistically from each other by the Tukey test at 5% probability.

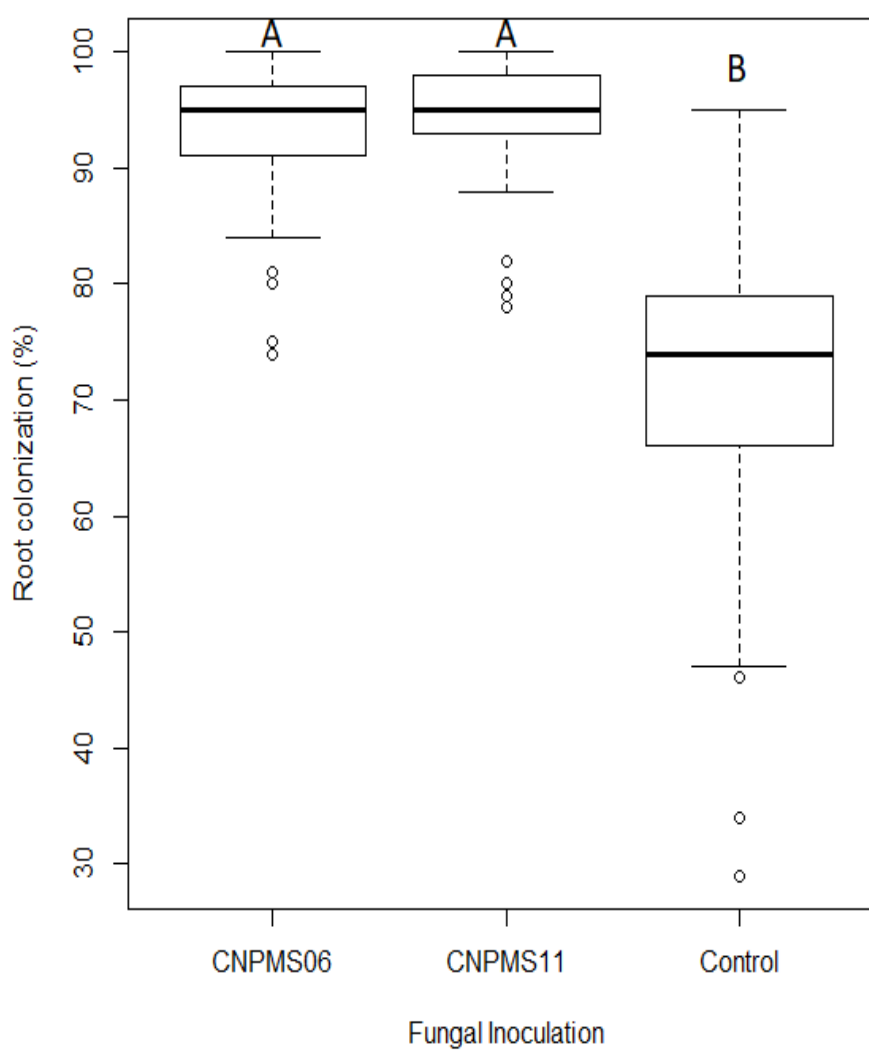


Figura 3. Colonização radicular de *Urochloa brizantha* em resposta à inoculação de duas cepas de FMA em relação ao controle não inoculado em solo nativo. Boxplot seguido das mesmas letras maiúsculas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

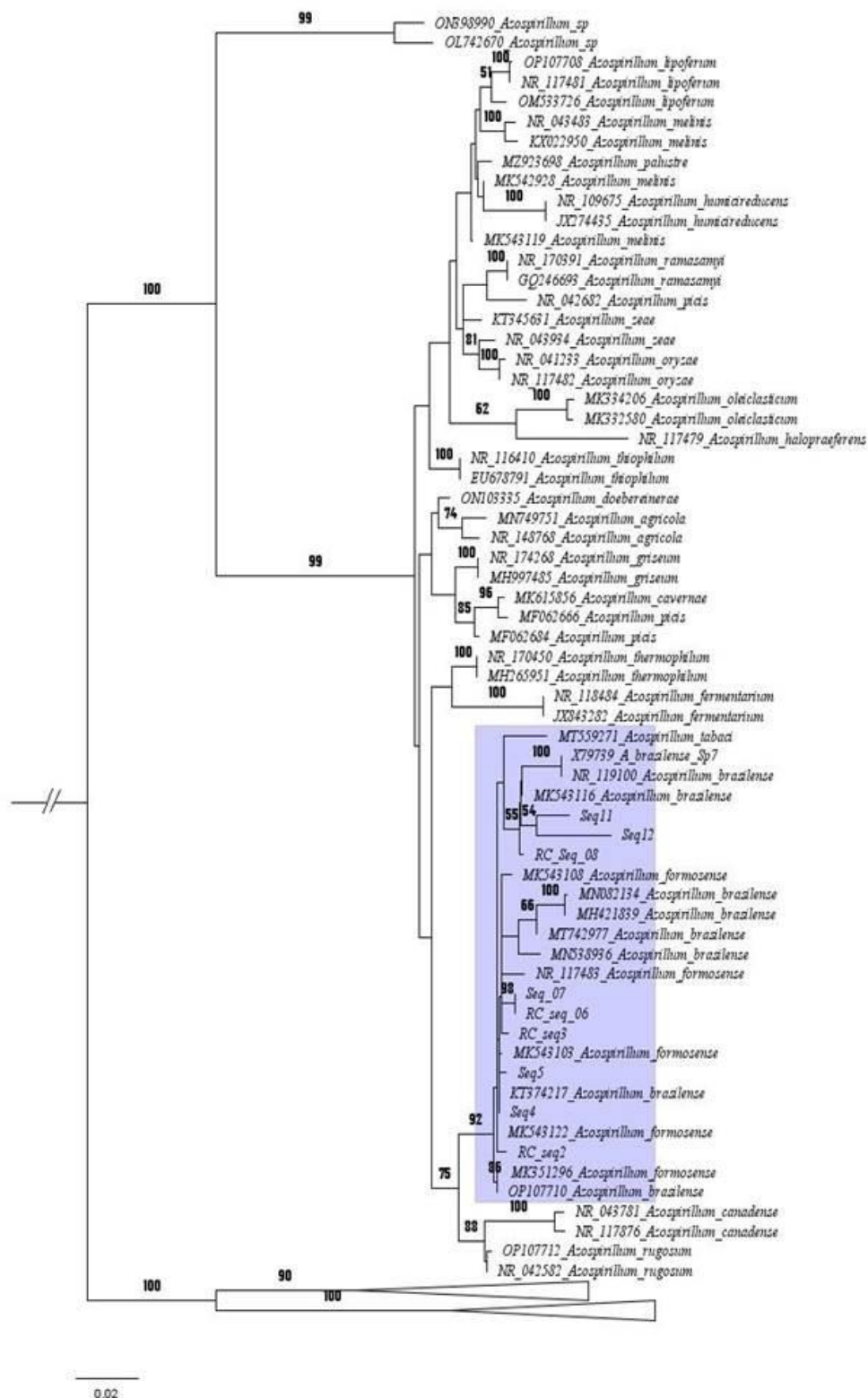


Figure 2. A árvore foi construída usando IQ-TREE 1.6.12, sob o modelo evolutivo TN+F+R3, consenso de 100 árvores bootstrap. O grupo externo foi KR811206 *Methylobacterium marchantiae*; AF363138 *Bradyrhizobium japonicum*; JQ670249 *Rhizobium aegyptiacum*; e NR041396 *Agrobacterium tumefaciens*. Cepas: Seq2 = CMS11; Seq3 = BDF25; Seq4=CMS1630; Seq5 = CMS2131; Seq6 = CMS05; Seq7 = BDF23; Seq8 = CMS 2058; Seq11 = BDF12; Seq12 = BDF145.1.

Discussão

A caracterização das cepas, de *Azospirillum*, usando as três técnicas de impressão digital, forneceu uma visão geral da diversidade genética e do parentesco das cepas. Obteve-se perfis de bandas confiáveis e reprodutíveis com todos os métodos. A combinação das três técnicas proporcionou uma melhor caracterização da diversidade genética das cepas, pois parecem se complementar, principalmente, para superar algumas de suas fragilidades. Um ponto fraco dessas técnicas é que a homologia é baseada na posição/migração da banda no gel de agarose. Assim, dois amplicons do mesmo tamanho, podem não ter a mesma “homologia” – origem genética. Além disso, as limitações da separação do tamanho do amplicon em géis de agarose perdem resolução para resolver fragmentos com menos de 10 pb de diferença de tamanho. No entanto, este aspecto pode ser melhorado usando primers, marcados com fluorescência e separação de amplicons de PCR, em sistemas automatizados de eletroforese capilar [16]. O problema de homologia, na interpretação dos perfis de bandas, é mais significativo quando se analisa géis com uma ou poucas bandas. De acordo com os dados, parece ser o caso das cepas CMS11 e CMS18, no gel BOX-PCR (Figura 1). Essas duas cepas eram semelhantes, com base no dendrograma BOX-PCR, mas eram claramente diferentes, quando analisadas por ERIC e REP-PCR (Figura 1).

A reconstrução filogenética, baseada nas sequências do gene 16S rRNA, coloca todas as nove cepas sequenciadas, em um clado composto por cepas do tipo *A. brasilense*, *A. formosense* e *A. tabaci*, e confirma as limitações do gene 16S rRNA, na taxonomia de *Azospirillum* [17, 1]. No entanto, a similaridade de *A. brasilense* e *A. formosense* também é conhecida, por reconstruções com outros marcadores gênicos como *rpoD* [17, 1]. Duas das cepas sequenciadas (11 e 12) possuem uma assinatura indel (5'-AGAGAGAATTTGGGC-3'), que está presente em *A. brasilense* SP7 e em outras cepas de *A. brasilense*, mas não em todas elas. As sequências de *A. formosense* carecem desse indel. Uma caracterização adicional, usando outros marcadores de genes, é necessária para identificar completamente essas cepas. Contudo, apesar das limitações do sequenciamento do 16S rDNA e problemas relacionados com a qualidade do sequenciamento (dados não mostrados), estes resultados estão de acordo com as técnicas de impressão digital de genotipagem, de que as cepas são geneticamente divergentes e formam dois grupos.

O REP-PCR e a árvore gênica 16S rDNA, recuperaram dois grupos de cepas semelhantes. Por exemplo, o clado formado pelas sequências das amostras 8, 11 e 12, juntamente com *A. brasilense* Sp7 com 55% de suporte bootstrap, na árvore filogenética (Figura 2), e no dendrograma REP-PCR, com as amostras 8, 10, 11 e 12. O segundo grupo da árvore é formado pelas sequências 2 a 7, enquanto as sequências 6 e 7 são idênticas, e no dendrograma, o grupo é composto por todas essas linhagens exceto a 2 (Figura 1). Além disso, as linhagens 4, 6 e 7 sempre estiveram intimamente relacionadas, em todos os agrupamentos de dendrogramas, bem como as linhagens 8 e 11. Esses resultados são consistentes e demonstraram a complementaridade, das análises genômicas de impressões digitais e da filogenia do 16S rDNA. Isso, abre possibilidades de identificação de grupos de cepas próximas ou distantes, de cepas conhecidas como *A. brasilense* Sp7, que é uma das cepas mais estudadas neste gênero [1].

Por outro lado, a identificação pela ferramenta BLAST-N fornece uma forma rápida de identificação de cepas desconhecidas, devendo ser utilizada como o primeiro passo, em um processo de identificação de micróbios, por meios moleculares. No entanto, a precisão da identificação requer análises filogenéticas adicionais, como exemplificado por nossos resultados (Figura 2 e Tabela 4), bem como a inclusão de outros marcadores gênicos, como rpoD Maroniche et al [17] e sequências completas do genoma. No experimento, de co-inoculação, a bactéria que apresentou maior promoção de crescimento de *U. brizantha*, foi a linhagem CMS1630.

Acknowledgments

Agradecemos à Embrapa Milho e Sorgo e à CAPES.

Referências

- Cassán, F., Coniglio, A., López, G., Molina, R., Nievas, S., de Carlan, C. L. N., Donadio, F., Torres, D., Rosas, S., Pedrosa, F. O., de Souza, E., Zorita, M. D., de-Bashan, L., & Mora, V. (2020). Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. *Biology and Fertility of Soils*, 56(4), 461–479. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>
- Hungria, M., Barbosa, J. Z., Rondina, A. B. L., & Nogueira, M. A. (2022). Improving Maize Sustainability with Partial Replacement of N-fertilizers by Inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Agronomy Journal*. <https://doi.org/10.1002/agj2.21150>
- Pereg, L., de-Bashan, L.E., Bashan, Y. (2016). Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. *Plant Soil* 399:389–414. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2778-9>.
- Tarrand, J.J.; KRIEG, N.R.; Döbereiner, J. A taxonomic study of *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen-nov and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.*, 24:967- 980, 1978.
- Hartmann, A., Baldani, JI, 2006. Capítulo 3.1.5. O gênero *Azospirillum*. *Procariotos* (5): 115-140. https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_6.
- Zambrano, ER, Jiménez-Salgado, T., Tapia-Hernández, A. (2007). Estudio de bacterias asociadas a orquídeas (Orchida cea). *Lankesteriana* 7 (1e2): 322-325.
- Wijayawardene, N. N., Hyde, K., Dai, D., Goto, B. T., Saxena, R., Erdoğan, M., Selçuk, F., Rajeshkumar, K. C., Aptroot, A., Błaszczowski, J., Boonyuen, N., da Silva, G. A., de Souza, F. A., Dong, W., Ertz, D., Haelewaters, D., Jones, E., Karunarathna, S., Kirk, P., ... Thines, M. (2022). *Outline of Fungi and fungus-like taxa – 2021*. 13(February), 53–453. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/13/1/2>.
- Chen, M., Arato, M., Borghi, L., Nouri, E., Reinhardt, D. (2018). Beneficial Services of Arbuscular Mycorrhizal Fungi – From Ecology to Application. *Frontiers in Plant Science*, v.9, 1270. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01270/full>.
- Chen, W., Koide, R. T., Adams, T. S., DeForest, J. L., Cheng, L., & Eissenstat, D. M. (2016). Root morphology and mycorrhizal symbioses together shape nutrient foraging strategies of temperate trees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(31), 8741–8746. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601006113>

- Kobae, Y. (2019). Dynamic phosphate uptake in arbuscular mycorrhizal roots under field conditions. *Frontiers in Environmental Science*, 6(JAN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00159>
- Brundrett MC, Tedersoo L (2018) Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytol* 220:1108–1115. doi: 10.1111/nph.14976
- Basiru S, Mwanza HP, Hijri M (2021) Analysis of arbuscular mycorrhizal fungal inoculant benchmarks. *Microorganisms* 9:1–18. doi: 10.3390/microorganisms9010081
- Chen, M., Arato, M., Borghi, L., Nouri, E., & Reinhardt, D. (2018). Beneficial services of arbuscular mycorrhizal fungi – from ecology to application. *Frontiers in Plant Science*, 9(September), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01270>
- Ruíz-Sánchez, M., Armada, E., Muñoz, Y., García de Salamone, I. E., Aroca, R., Ruíz-Lozano, J. M., & Azcón, R. (2011). *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. *Journal of Plant Physiology*, 168(10), 1031–1037. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.12.019>
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F. J., & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5, 25–40.
- Brusetti L, Malkhazova I, Gtari M, et al (2008) Fluorescent-BOX-PCR for resolving bacterial genetic diversity, endemism and biogeography. *BMC Microbiol* 8:1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-220>.
- Maroniche GA, García JE, Salcedo F, Creus CM (2017) Molecular identification of *Azospirillum* spp.: Limitations of 16S rRNA and qualities of rpoD as genetic markers. *Microbiol Res* 195:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.11.009>
- Wilson LA, Sharp PM. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. *Mol Biol Evol*. 2006 Jun;23(6):1156-68. doi: 10.1093/molbev/msj125. Epub 2006 Mar 13. PMID: 16533821
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F. J., & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5, 25–40.
- Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In Stackebrandt, E & Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (pp. 115-175). New York: John Wiley & Sons.

Informações complementares - modificação do primer 16S rDNA

Aplicamos o primer blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), que é uma ferramenta para encontrar primers específicos para um modelo de PCR, para testar a homologia do conjunto de primers 27F e 1492R, em direção à *Azospirillum*, na base de dados NCBI NR.

1. Pesquisa usando as sequências originais do primer

Como a ferramenta PRIMER-BLAST não permite pesquisas usando símbolos que representam posições degeneradas, substituímos M por A ou C na sequência do primer 27F (ver Tabela 2) e o Y por C ou T. E testamos todas as combinações para avaliar o alteração do conjunto de primers – em TM, GC% e Self e Self 3' e complementaridade.

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGAGTTTGATCA A TGGCTCAG	20	55.45.	6.00		3.00
Reverse primer	GGTTACCTTGTTACGACTT	19	52.42.	5.00		1.00
			20	11		

Products on target templates

>[MW646017.1](#) Uncultured *Azospirillum* sp. clone WYHS-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 1445

Forward primer 1 AGAGTTTGATCATGGCTCAG 20

Template 1 20

Reverse primer 1 GGTTACCTTGTTACGACTT 19

Template 1445 1427

>[KJ127964.1](#) Uncultured *Azospirillum* sp. clone NJFU_SLX-S89 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 1441

Forward primer 1 AGAGTTTGATCATGGCTCAG 20

Template 1 20

Reverse primer 1 GGTTACCTTGTTACGACTT 19

Template 1441 1423

>[KF287758.1](#) Uncultured Azospirillum sp. clone aw176 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 1442

Forward primer 1 AGAGTTTGATCATGGCTCAG 20

Template 1 20

Reverse primer 1 GGTTACCTTGTTACGACTT 19

Template 1442 1424

>[AF521650.1](#) Azospirillum sp. Arm2-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 1447

Forward primer 1 AGAGTTTGATCATGGCTCAG 20

Template 1 20

Reverse primer 1 GGTTACCTTGTTACGACTT 19

Template 1447 ..C..... 1429

>[NR_174268.1](#) Azospirillum griseum strain L-25-5 w-1 16S ribosomal RNA, partial sequence

product length = 1446

Forward primer 1 AGAGTTTGATCATGGCTCAG 20

Template 1C..... 20

Reverse primer 1 GGTTACCTTGTTACGACTT 19

Template 1446 1428

>[MK804689.1](#) Azospirillum sp. strain AA2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 1446

Forward primer 1 AGAGTTTGATCATGGCTCAG 20

Template 1C..... 20

Reverse primer 1 GGTTACCTTGTTACGACTT 19

Template 1446 1428

>[DQ288689.1](#) Azospirillum brasilense strain MTCC4038 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 1449

Forward primer 1 AGAGTTTGATCATGGCTCAG 20

Template 1 20

Reverse primer 1 GGTTACCTTGTTACGACTT 19

Template 1449 ..C..... 1431

>[DQ288688.1](#) Azospirillum brasilense strain MTCC4037 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 1453

Forward primer 1 AGAGTTTGATCATGGCTCAG 20

Template 1 20

Reverse primer 1 GGTTACCTTGTTACGACTT 19

Template 1453 ..C..... 1435

>[AY118225.1](#) Azospirillum sp. DA10-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 1446

Forward primer 1 AGAGTTTGATCATGGCTCAG 20

Template 1 20

Reverse primer 1 GGTTACCTTGTTACGACTT 19

Template 1446 ..C..... 1428

>[CP059452.1](#) Azospirillum brasilense strain 2020WEIHUA_K plasmid unnamed3, complete sequence

product length = 1448

Forward primer 1 AGAGTTTGATCATGGCTCAG 20

Template 113460C..... 113479

Reverse primer 1 GGTTACCTTGTTACGACTT 19

Template 114907 ..C..... 114889

product length = 1448

Primer modified (1492Rm)

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	20	55.14	45.00	6.00	3.00
Reverse primer	TACGGCTACCTTGTTACGACTT	22	59.18	45.45	3.00	1.00

Products on target templates

>[AF521650.1](#) Azospirillum sp. Arm2-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 1450

Forward primer 1 AGAGTTTGATCATGGCTCAG 20

Template 1 20

Reverse primer 1 TACGGCTACCTTGTTACGACTT 22

Template 1450 1429

>[DQ288689.1](#) Azospirillum brasilense strain MTCC4038 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 1452

Forward primer 1 AGAGTTTGATCATGGCTCAG 20

Template 1 20

Reverse primer 1 TACGGCTACCTTGTTACGACTT 22

Template 1452 1431

>[DQ288688.1](#) Azospirillum brasilense strain MTCC4037 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 1456

Forward primer 1 AGAGTTTGATCATGGCTCAG 20

Template 1 20

Reverse primer 1 TACGGCTACCTTGTTACGACTT 22

Template 1456 1435

>[AY118225.1](#) Azospirillum sp. DA10-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 1449

Forward primer 1 AGAGTTTGATCATGGCTCAG 20

Template 1 20

Reverse primer 1 TACGGCTACCTTGTTACGACTT 22

Template 1449 1428

>[AY118224.1](#) Azospirillum sp. DA2-3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 1443

Forward primer 1 AGAGTTTGATCATGGCTCAG 20

Template 1 20

Reverse primer 1 TACGGCTACCTTGTTACGACTT 22

Template 1443 1422

>[AY118223.1](#) Azospirillum sp. DA6-2-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 1461

Forward primer 1 AGAGTTTGATCATGGCTCAG 20

Template 1 20

Reverse primer 1 TACGGCTACCTTGTTACGACTT 22

Template 1461 1440

>[CP059452.1](#) Azospirillum brasilense strain 2020WEIHUA_K plasmid unnamed3, complete sequence

product length = 1451

Forward primer 1 AGAGTTTGATCATGGCTCAG 20

Template 113460C..... 113479

Reverse primer 1 TACGGCTACCTTGTTACGACTT 22

Template 114910 114889

product length = 1451

Forward primer 1 AGAGTTTGATCATGGCTCAG 20

Template 66994C..... 67013

Reverse primer 1 TACGGCTACCTTGTTACGACTT 22

Template 68444 68423

Primer pair		Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self	Self 3'
						complementarity	complementarity
Forward primer		AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	20	56.	50.	7.00	5.00
				92	00		
Reverse primer		TACGGCTACCTTGTTACGACTT	22	59.	45.	3.00	1.00
				18	45		

Products on target templates

>[CP059453.1](#) Azospirillum brasilense strain 2020WEIHUA_K plasmid unnamed4, complete sequence

product length = 1451

Forward primer 1 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 20

Template 570233 570252

Reverse primer 1 TACGGCTACCTTGTTACGACTT 22
 Template 571683 571662

Search altering the degenerated base in both primrs

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	20	56.92	50.00	7.00	5.00
Reverse primer	TACGGTTACCTTGTTACGACTT	22	57.15	40.91	5.00	1.00

Products on target templates

>[HG917273.1](#) Uncultured Azospirillum sp. partial 16S rRNA gene, clone E296

product length = 1452

Forward primer 1 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 20

Template 1 20

Reverse primer 1 TACGGTTACCTTGTTACGACTT 22

Template 1452 1431

Informações complementares - Reprodutibilidade do padrão de bandas

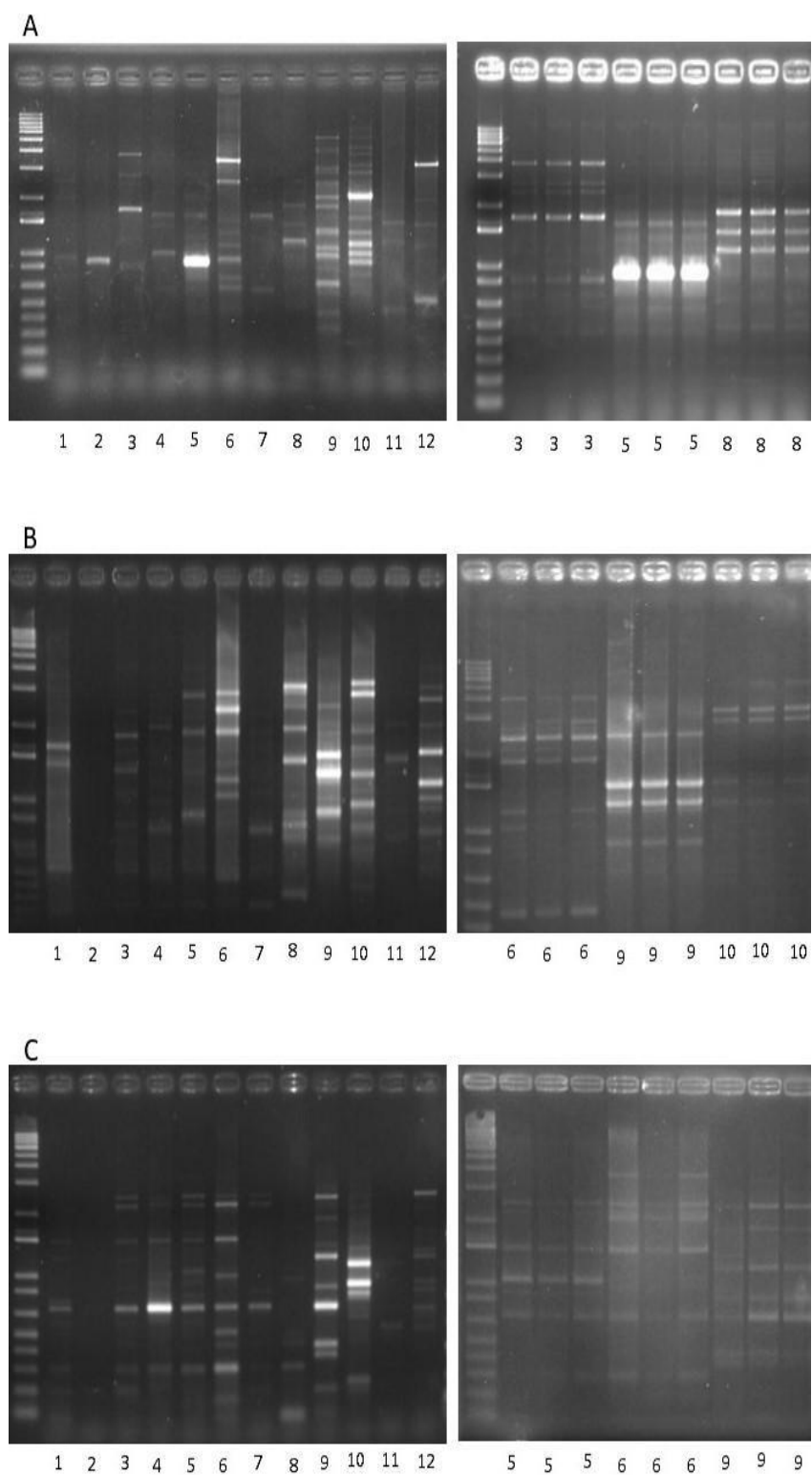


Figure 1. Reprodutibilidade das técnicas BOX – PCR (A), ERIC – PCR (B) e REP – PCR (C), através da amplificação do material biológico em triplicata. Strains: 1 = CMS18; 2 = CMS11; 3 = BDF25; 4 = CMS1630; 5 = CMS2131; 6 = CMS05; 7 = BDF23; 8 = CMS2058; 9 = CMS1626; 10 = CMS2153; 11 = BDF12; 12 = BDF145.1.

Artigo para submissão ao Journal of Seed Science

Júlia Pimenta Pereira

Universidade Federal de São João del-Rei, Sete Lagoas – MG

juliapimentap@gmail.com

ARTIGO 2 - Avaliação do potencial germinativo e viabilidade de sementes de *Urochloa brizantha* cv. Marandu, submetidas aos tratamentos de escarificação e de desinfestação de sementes.

PEREIRA, J.P.¹; SILVA, M. S. S²; PARRELLA, N.N.D¹; SILVA, A.P.C.M¹; SOUZA, F. A.³; MARRIEL, I. E.^{1,3}

¹Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), *Campus Sete Lagoas*.

²UNIFEEN – Centro Universitário, Graduando em Ciências Biológicas.

³Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais

EVALUATION OF GERMINATION POTENTIAL AND VIABILITY OF *Urochloa Brizantha* cv. Marandu.

EVALUATION OF GERMINATION POTENTIAL AND VIABILITY OF *Urochloa Brizantha* cv. Marandu SUBMITTED TO SCARIFICATION AND SEED DISINFESTATION TREATMENTS.

PEREIRA, J.P.^{1*}; SILVA, M. S.²; PARRELLA, N.N.D¹; SILVA, A.P.C.M1SOUZA, F. A.³;
MARRIEL, I. E.^{1,31}

ABSTRACT - The evaluation, of the physical and of physiological quality, of seeds is an important aspect for the contribution of the existing knowledge about the seeds of *U. brizantha* available in the Brazilian market. This study aimed to evaluate aspects related to the quality of two seed lots (A and B), acquired from different suppliers, as well as the influence of scarification and of disinfestation, treatments carried out in the laboratory on the germination potential and viability of the seeds studied. Tests for purity, germination tetrazolium, determination of moisture, through the imbibition curve, and electrical conductivity were performed. It was found that lots A and B showed low levels of purity, viability and germination. Scarified seeds from lot B showed superior viability and germination compared to lot A. Natural seeds from lot A showed higher germination when compared to lot B. Seeds from both lots showed sensitivity to the disinfestation protocol, having low germination and significant damage in viability. The imbibition curve showed that intact seeds had higher water content than scarified ones, indicating that scarification reduced imbibition.

Index terms: *Brachiaria brizantha*. Escarification. Disinfestation. Seeds.

¹Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ) - 35701-970 – Sete Lagoas, MG, Brasil.

² UNIFEEN – Centro Universitário - 35701-242 - Sete Lagoas, MG, Brasil.

³ Embrapa Milho e Sorgo, 35701-970 – Sete Lagoas, MG, Brasil.

*corresponding author < juliapimentap@gmail.com

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GERMINATIVO E VIABILIDADE DE SEMENTES DE *Urochloa brizantha* cv. Marandu SUBMETIDAS AOS TRATAMENTOS DE ESCARIFICAÇÃO E DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES.

RESUMO - A avaliação da qualidade, física e fisiológica, de sementes é um aspecto importante, para a contribuição do conhecimento existente sobre as sementes de *U. brizantha*, disponíveis no mercado brasileiro. Este trabalho objetivou avaliar aspectos relacionados à qualidade de dois lotes de sementes (A e B), adquiridos de fornecedores distintos, bem como a influência dos tratamentos de escarificação e dedesinfestação, realizados em laboratório, no potencial germinativo e na viabilidade das sementes estudadas. Foram realizados testes de pureza, de germinação, de tetrazólio, determinação da umidade, através da marcha de absorção, e condutividade elétrica. Verificou-se que os lotes A e B apresentaram baixos níveis de pureza, de viabilidade e de germinação. Sementes escarificadas, do lote B, apresentaram superioridade na viabilidade e na germinação, em comparação ao lote A. As sementes naturais, do lote A, apresentaram maior germinação quando comparadas ao lote B. Sementes de ambos os lotes demonstraram sensibilidade ao protocolo de desinfestação, tendo baixa germinação e prejuízo significativo na viabilidade. A marcha de absorção demonstrou que sementes intactas apresentaram maior teor de água que as escarificadas, indicando que a escarificação reduziu a embebição.

Termos para indexação: *Brachiaria brizantha*, escarificação, desinfestação, sementes

INTRODUÇÃO

A pecuária de corte foi responsável por 27,4% do PIB, em 2020, colocando o Brasil como um dos principais produtores e exportadores, de carne do mundo (FAO, 2022). A pastagem ainda é considerada a forma mais econômica e viável de produzir e oferecer alimentos aos bovinos e, por isso, é a base, de praticamente, toda a produção de carne bovina no Brasil (Dias-Filho, 2014). Segundo a Embrapa Agroecologia (2021), existem aproximadamente 200 milhões de hectares de pastagens cultivadas, inseridas em sistemas extensivos de criação de animais, no país.

Ao longo dos anos, as espécies de *Urochloa* (sin. *Brachiaria*) se tornaram as forrageiras mais utilizadas em pastagens, na América do Sul, exercendo papel importante na expansão da pecuária em solos ácidos e pobres do Cerrado (Valle et al., 2008). Dentre as espécies desse gênero, a *U. brizantha*, se destaca sendo a espécie forrageira mais semeada no Brasil, estando presente em cerca de 90% das áreas de pastagens cultivadas no país, e com maior volume de sementes destinadas à exportação (Crispim e Branco, 2002).

O crescimento da demanda por forrageiras vem impulsionando o desenvolvimento da indústria sementeira no Brasil. O país é considerado o maior produtor, consumidor e exportador de sementes de forrageiras tropicais. Cerca de 95% da produção, dessas sementes, tem sido destinada ao comércio interno e o restante exportado para países da América do Sul e Central (Martins, 1997; Marchi et al., 2008). Estima-se que 60% da produção de sementes de gramíneas forrageiras, do Brasil, seja de *U. brizantha*, devido à sua capacidade adaptativa ao clima e aos solos de baixa fertilidade (Beling, 2016).

Apesar da importância, a qualidade das sementes de *U. brizantha* comercializadas no país, nem sempre é satisfatória. Microrganismos, potencialmente patogênicos, já foram identificados em sementes de pastagens no Brasil. Entre estes patógenos destacam-se os fungos, frequentemente, responsáveis por perdas de rendimento e de qualidade de sementes (Guimarães et al., 2006). Segundo Neergaard (1979), os fungos podem provocar aborto, deformações, redução de tamanho e demais prejuízos nas sementes, os quais têm reflexos na diminuição da viabilidade e da germinação das mesmas. Por outro lado, é escasso o conhecimento sobre a qualidade sanitária de sementes forrageiras, produzidas e comercializadas no país, o que contribui para o aumento da incidência de doenças em áreas de pastagens e para a produção de baixa qualidade

(Vechiato e Aparecido, 2010). Segundo Mallmann et al. (2013), sementes de baixa qualidade sanitária são uma das frequentes causas do fracasso na formação de áreas de pastagens, o que causa impactos negativos na sustentabilidade da atividade pecuária.

Além de questões relacionadas à qualidade sanitária, sementes de *U. brizantha* possuem dificuldade para germinar, tendo como principal fator a ocorrência de dormência dessas sementes (Lago; Martins, 1998). A condição de dormência se define como o fenômeno em que sementes viáveis não germinam, mesmo em ambientes favoráveis (Taiz; Zeiger, 2004). Nas gramíneas forrageiras tropicais, a expressão da dormência se associa à causas fisiológicas, condições de armazenamento ou à causas físicas, relacionadas à diminuição da entrada de oxigênio, causada pela cobertura natural da semente (Whiteman; Mendra, 1982). Diferentes tratamentos podem ser utilizados para superar a dormência, e, entre eles, a imersão de sementes em ácido sulfúrico, tem demonstrado influência no aumento significativo da germinação das sementes e na uniformidade desse processo (Martins e Silva, 2003). Ainda, práticas de desinfestação de sementes podem auxiliar na limpeza e na eliminação de agentes patógenos, diminuindo o risco do estabelecimento de pastagens de baixa qualidade, a contaminação do solo com microrganismos indesejados e o prejuízo na produção. Ademais, sementes livres de microrganismos são importantes em estudos conduzidos em laboratórios, e que têm como objetivo a avaliação do efeito de bactérias benéficas, como por exemplo, as promotoras de crescimento, no desenvolvimento das plantas (Baldani, 2006).

A qualidade das propriedades genéticas, físicas, fisiológicas e sanitárias das sementes é a base para o sucesso do cultivo de pastagens. Segundo Dalpont et al. (2013), sementes de alta qualidade são um fator decisivo para o sucesso de atividades agrícolas, afetando diretamente o resultado final do plantio, proporcionando alto vigor de plantas e diminuição de doenças veiculadas por sementes.

Estudos acerca da avaliação da qualidade, de sementes, se fazem necessários, devido à crescente demanda de sementes de gramíneas forrageiras, no mercado brasileiro, à medida que elas são necessárias na recuperação de pastagens, no uso da integração lavoura-pecuária e nas demais atividades como o plantio direto. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar aspectos relacionados à qualidade do lote de sementes de *U. brizantha* cv. Marandu, adquiridos de dois diferentes fornecedores da indústria sementeira. Taxa de pureza, de viabilidade, de

condutividade elétrica e de umidade foram avaliados, bem como a influência dos tratamentos de escarificação e de desinfestação, na germinação das sementes estudadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Fornecedores de sementes *U. brizantha*

As sementes comerciais, de *Urochloa brizantha* cv. Marandu, utilizadas nesse trabalho foram adquiridas de 2 empresas sementeiras distintas (fornecedores A e B). O fornecedor A, cujas sementes são provenientes da safra 2019/2020, indicaram a taxa de 60% de pureza, e 80% de germinação no rótulo do produto.

As sementes do fornecedor B, cujas sementes são da safra 2019/2020, acompanham o boletim de análise de sementes, que indica uma taxa de pureza de 60% e 80% de viabilidade. O fornecedor B atestou que os lotes de sementes são produzidos, de acordo com as normas e padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e analisados em laboratório credenciado no RENASEM - Registro Nacional de Sementes e Mudanças.

As sementes foram submetidas aos testes de pureza e de viabilidade, bem como à determinação da umidade, pela marcha de absorção, e condutividade elétrica. Ainda, protocolos de desinfestação de sementes foram testados, com o objetivo de avaliar produtos e procedimentos, que possam contribuir para a obtenção de sementes com maior qualidade sanitária e que auxiliem na quebra de dormência. O teste de germinação, de sementes naturais e tratadas, foi realizado a fim de se obter informações sobre a influência que processos, como a escarificação e desinfestação, exercem sobre a germinação de sementes de *U. brizantha*.

Teste de Pureza

Foi determinada a pureza física, de ambos os lotes comerciais, de sementes de *Brachiaria brizantha*, lote A e lote B. Dessa forma, seguindo as indicações das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992), 6 amostras de 10g de sementes, de cada lote, foram peneiradas para a separação dos componentes do material inerte. Posteriormente, o exame visual e a separação manual dos componentes, complementaram a separação das sementes dos demais materiais,

que compõem o lote (impurezas). Em seguida, o peso das sementes livres dos componentes inertes foi aferido, em balança de alta precisão e, por diferença (peso inicial menos o peso final da amostra) foi determinada a taxa de pureza de cada lote. O objetivo da análise de pureza foi determinar a composição da amostra, de um lote de sementes, assim como as partículas inertes que a constituem.

Escarificação e desinfestação de sementes

Para a desinfestação das sementes comerciais, foram testados diferentes protocolos de combinações de hipoclorito de sódio (NaClO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) com outros agentes higienizantes a fim de se obter o protocolo que apresente melhor limpeza de sementes de *U. brizantha*, viabilize tecnologias de inoculação com os microrganismos benéficos e não comprometa a estrutura física. No total, foram testados 5 protocolos para a desinfestação e higienização das sementes de *U. brizantha* cv. Marandu dos fornecedores A e B (Tabela 1).

Tabela 1. Protocolos aplicados para a desinfestação de sementes de *U. Brizantha* e as etapas realizadas em cada um.

Protocolo	Etapas						
	Sementes (g)	Tamizador	NaClO (%)	Tween 20 (gotas)	Agitação mecânica (min)	Álcool 92,8%	H2O2 (v/v)
1	50	-	2	-	15	-	30
2	50	X	2	-	15	-	30
3	50	-	2	5	15	-	30
4	50	-	2	-	15	-	30
5	50	-	2	-	15	X	30
6	50	-	4	-	15	-	30

A letra “X” indica a utilização do equipamento/substância na condução do protocolo.

Imediatamente, após a aplicação de cada teste de desinfestação, cerca de 20 sementes de cada fornecedor foram transferidas para placas de Petri, contendo meio sólido comercial MRS (KAVI), a fim de se avaliar o crescimento de microrganismos nas sementes, submetidas aos diferentes protocolos de desinfestação. As placas, contendo as sementes, foram incubadas em estufa a 25°C, por um período de 2 a 3 dias. As sementes, desinfestadas (D) restantes, foram conduzidas ao teste de germinação, após secagem em ambiente controlado.

Para a escarificação (E), sementes dos fornecedores A e B foram submetidas ao processo, para auxílio na quebra da dormência e para contribuição na limpeza e na sanitização das mesmas. As sementes foram submersas em ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄), conforme manual de Regras para análises de Sementes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2009), por 15 minutos e sob agitação mecânica. Imediatamente, após o período de imersão, as sementes foram lavadas com água em abundância, objetivando a interrupção da ação do ácido, e encaminhadas para a secagem, em ambiente estéril, para posterior teste de germinação.

Ainda, sementes foram submetidas à combinação de ambos os tratamentos, escarificação seguida de desinfestação (E+D). A ordem estabelecida, para aplicação dos tratamentos, foi determinada considerando a reação de ácido, quando em contato com água, visando a segurança do operador e a proteção das estruturas físicas das sementes.

Determinação da viabilidade pelo teste de tetrazólio

O teste tetrazólio indica, de forma rápida, a viabilidade de um lote de sementes (Brasil, 2009), utilizado, principalmente, em espécies que apresentam dormência, como é o caso de várias espécies do gênero *Urochloa*.

Para embebição de água, pelas sementes, foram utilizadas duas folhas de papel Germitest, saturados em água destilada, dentro de uma caixa do tipo Gerbox, onde foram colocadas as sementes, e recobertas, por outro papel Germitest saturado em água. Em cada Gerbox foram colocadas 100 sementes. O processo de embebição teve duração de 18h, numa temperatura de 30°C. Após as 18h, as sementes foram cortadas longitudinalmente, sendo aproveitado o lado melhor. Após o corte, as sementes foram imersas em solução incolor do 2,3,5 trifenil cloreto tetrazólio (0,5%), usada como indicador dos tecidos vivos, o que possibilita a leitura de uma semente viável (coloração vermelha) e não viável (semente descolorida). As sementes

permaneceram 4h na solução de tetrazólio, e logo em seguida, foi realizada a contagem das sementes que apresentavam a coloração vermelha (Brasil, 2009).

Condutividade elétrica

Para avaliação da condutividade elétrica, da solução de embebição de sementes, foi utilizado o teste de “condutividade de massa” ou sistema de copo, realizada por meio de seis sub-amostras (repetições,) colocadas para embeber, em copos plásticos de 200 ml, mantidos a 25°C. As leituras, da condutividade elétrica, foram realizadas com o condutivímetro Marconi CA, no período de 0h a 101 h. Os dados foram avaliados pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, para comparação das médias.

Marcha de absorção

Foi avaliada a marcha de absorção de água, de sementes, para determinar o teor de água das sementes, ao atingir a fase III de germinação (Bewley e Black, 1994). Após a determinação inicial do teor de água, foi realizada a pesagem de quatro repetições, de 50 sementes escarificadas e intactas, somente do lote B. A seguir, as sementes foram colocadas para embeber, em caixas plásticas transparentes, do tipo Gerbox, tendo como substrato duas folhas de papel mata borrão, umedecidas com a quantidade de água destilada, equivalente a 2,5 vezes o peso seco do papel. As amostras foram mantidas em câmara de germinação tipo BOD, com temperaturas alternadas 20-35°C, e fotoperíodo de 8h. Após 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 72 e 96 horas, as sementes foram removidas das caixas plásticas, e pesadas em balança com precisão de 0,0001g. Com os valores das pesagens consecutivas, foi calculada a percentagem de ganho de água, em relação ao peso inicial das sementes, a fim de se estabelecer a marcha de absorção, conforme proposto por Moreira (2014). Os dados foram avaliados pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, para comparação das médias.

Teste de germinação

O teste de germinação, de sementes de *U. brizantha* cv. Marandu, foi realizado e conduzido segundo RAS (Brasil, 2009), com adaptações, tendo como objetivo principal a determinação do potencial máximo de germinação, das sementes avaliadas. Para o teste, foram utilizadas amostras de sementes escarificadas, sementes desinfestadas, sementes escarificadas e desinfestadas, e sementes *in natura*, dos dois fornecedores, A e B. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em fatorial 2x4, totalizando 8 tratamentos, com quatro repetições de 50 sementes cada. As sementes foram distribuídas em duas folhas de papel Germitest, umedecidas com 2,5 vezes o peso delas, e alocadas em caixas transparentes tipo gerbox. As caixas foram mantidas em câmaras germinadoras tipo BOD, com temperaturas alternadas 20-35°C e fotoperíodo de 8h. Foram feitas 2 contagens do número de plântulas, aos 7 e aos 21 dias. A porcentagem de germinação, corresponde ao número de sementes, que produziram plântulas consideradas normais. Os dados foram avaliados pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, para comparação das médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes, de *U. brizantha* cv. Marandu avaliadas, de ambos os fornecedores, A e B, apresentaram 47,6% e 20,3%, respectivamente, de taxa de pureza (Tabela 2). A partir, da safra 2008/2009, as sementes dessa espécie devem conter o mínimo de 60% de sementes puras, conforme a Instrução Normativa nº 30, publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2009). No entanto, os lotes de sementes de *U. brizantha*, comumente possuem um considerável volume de material inerte, como pedregulhos, galhos, etc; o que foi evidenciado pelo teste de pureza, aplicado aos lotes avaliados.

Assumindo que o percentual de germinação de sementes de *U. brizantha*, seja da ordem de 100%, a pureza necessária para atingir VC indicado, no rótulo do produto (60 e 80%) seria de 60 e 80 %, respectivamente, ou seja, teores de impurezas de 40 e 20 %, respectivamente. Aplicando esse raciocínio, aos lotes de sementes dos dois fornecedores, verificou-se que para o fornecedor A, o lote apresentou pureza de 47,5%, e neste caso, o percentual de germinação teria que ser de 101%, para atingir um VC de 48, indicado no rótulo do produto. No caso do fornecedor B, o lote apresentou pureza de 20,3%, e neste caso, o percentual de germinação teria que ser de 236%, para atingir um VC de 48 indicado no rótulo do produto.

Tabela 2 - Taxa de impurezas de sementes *U. brizantha* cv. Marandu (Nascimento), calculada a partir da diferença entre as médias dos pesos, de sementes com impurezas e de sementes sem impurezas.

Fornecedor	Peso inicial da amostra (g)	Peso de sementes (g)	Taxa de pureza (%)	VC	Germinação estimada (%)
A	10	4,75	47,5	48	101
B	10	2,03	20,3	48*	236

*Considerando a germinação (%) igual a viabilidade (%).

O uso de sementes, de má qualidade, principalmente, em relação à pureza e à germinação, se tornou uma prática convencional. Habitualmente são encontrados lotes de sementes, com excesso de impurezas, como resíduos vegetais, torrões de solo, pedregulhos e, ainda, sementes de outras espécies (Quadros et al., 2012).

Para a determinação do protocolo de desinfestação, de sementes de *U. brizantha* mais eficiente, as placas com meio MRS, contendo sementes desinfestadas foram observadas quanto ao crescimento de microrganismos, após o período de incubação, e, foi possível perceber que, entre os 5 protocolos de desinfestação, aplicados às sementes do fornecedor B, o Protocolo 4, no geral, foi o que apresentou a menor presença de colônias de fungos e de bactérias, em suas repetições, após o período de 3 dias de incubação (Figura 1).

Porém, os protocolos aplicados não apresentaram eficiência, na desinfestação das sementes, visto que uma alta presença de microrganismos, principalmente fungos, foi constatada no interior das placas. Apesar, da influência negativa, que microrganismos patógenos podem impor sobre sementes do gênero *Urochloa*, poucos estudos que tratam de práticas de limpeza dessas sementes se encontram disponíveis. Diante disso, é imprescindível o desenvolvimento de estudos que abordem o aprimoramento, a adequação de técnicas já conhecidas ou o desenvolvimento de novos protocolos, de desinfestação, específicos para sementes de *U. brizantha*, a fim de atender a necessidade de melhoria das condições sanitárias, sem que haja prejuízos estruturais e fisiológicos nas sementes.

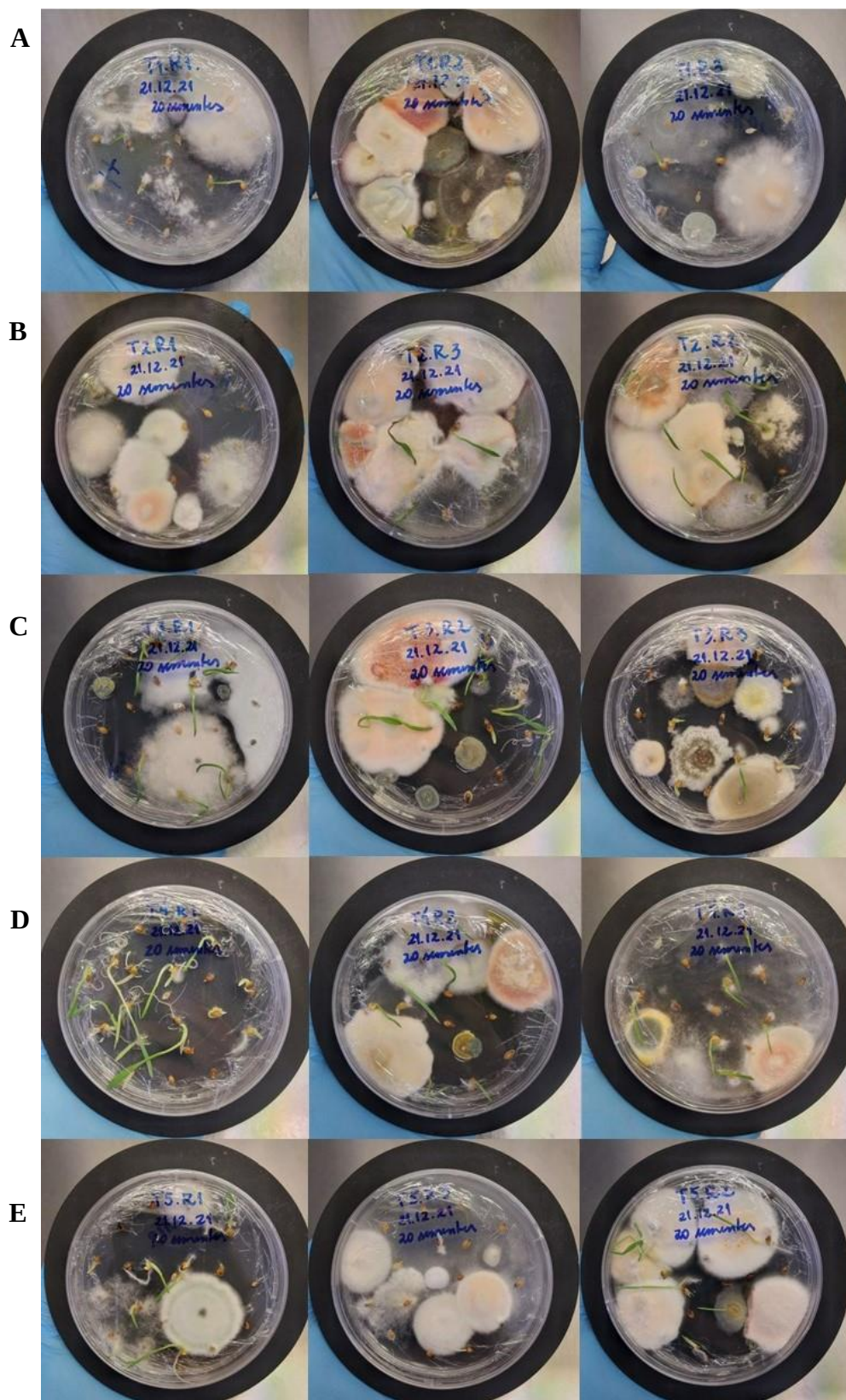


Figura 1. Repetições de placas, de cada um dos 5 protocolos de desinfestação, de sementes de *U. brizantha*, após 3 dias de incubação, em estufa a 25°C. Códigos: A = protocolo 1 em 3 repetições; B

= protocolo 2 em 3 repetições; C = protocolo 3 em 3 repetições; D = protocolo 4 em 3 repetições; E = protocolo 5 em 3 repetições.

Através da observação dos dados de viabilidade, obtidos por meio do teste de tetrazólio, verificou-se que as sementes não apresentaram diferenças significativas entre lotes, em todos os tratamentos. No entanto, ocorreu diferenças entre os tratamentos, dentro de cada lote (Tabela 3). O teste de tetrazólio demonstrou que as sementes submetidas ao protocolo de escarificação, seguido de desinfestação (E+D), apresentaram as maiores médias (Tabela 3), indicando que a combinação destes tratamentos, pode favorecer a viabilidade de sementes de *U. brizantha*.

Tabela 3. Viabilidade pelo teste de tetrazólio, de diferentes tratamentos de sementes de *U. brizantha* cv. Marandu, provenientes dos lotes A e B avaliados.

Tratamentos	Lote A	Lote B
Escarificação (E)	40Aa	35Aab
Desinfestação (D)	0Ab	0Ac
Escarificação + Desinfestação (D+E)	45Aa	50Aa
Testemunha	20Aab	20Abc

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na horizontal, e minúsculas na vertical, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Conforme Marcos Filho (2005), o ácido sulfúrico é utilizado por promover a permeabilidade do tegumento à água e às trocas gasosas, o que contribui para que as sementes continuem viáveis. Ainda que esses tratamentos tenham contribuído para a representação das maiores médias obtidas nos testes, a maior parte dos estudos relatam taxas de viabilidade superiores a 80%, como Santos, 2011 que observou a viabilidade de sementes escarificadas de *U. brizantha* de 79,5%. A baixa viabilidade obtida pelo teste de tetrazólio em ambos os lotes pode estar diretamente relacionada à baixa pureza determinada nos produtos. Segundo Neergaard (1979), impurezas presentes são veiculadoras de fungos e demais microrganismos que podem provocar, entre outros prejuízos, a diminuição da viabilidade das sementes.

Já no tratamento de desinfestação, quando isolado, as médias zeradas demonstraram prejuízo significativo, na viabilidade das sementes, de ambos os lotes, o que pode sugerir sensibilidade das sementes a este tipo de tratamento. Segundo Schwab et. al (2020), para sementes do gênero *Urochloa*, é necessário descascar as sementes, antes de se iniciar a metodologia de desinfestação, uma vez que as mesmas possuem microrganismos endofíticos que, em seu

estudo, não foi possível eliminar apenas com agentes sanitizantes, sem comprometer a germinação. Um fator a ser considerado é o tempo de contato das sementes, com água e demais líquidos, quando submetidas ao teste de desinfestação. Após a absorção de água, suficiente para garantir o completo processo de germinação, há a ocorrência da formação de novos tecidos e a ativação do metabolismo das sementes, compreendendo a fase II do processo germinativo. Nesta fase, em caso de não haver condições necessárias para a protusão da radícula, a semente morre e perde a viabilidade.

Para a condutividade elétrica, não houve diferença significativa, entre os tempos avaliados, desde a hora 0 até a hora 101 (Tabela 5. A CE foi superior para sementes escarificadas, indicando ser um tratamento que proporciona às sementes, maior absorção de solutos presentes na sistemática do solo.

Tabela 5. Condutividade elétrica (CE), de sementes de *U. brizantha* (Lote B), com e sem escarificação, em ácido sulfúrico.

Períodos	CE mS cm ⁻¹ g ⁻¹	
	Sem escarificação	Escarificada
0 h	312.6083 Aa	704.8514 Ba
1 h	315.1071 Aa	709.7848 Ba
2 h	313.7627 Aa	728.4909 Ba
3 h	313.8920 Aa	748.1110 Ba
5 h	316.7059 Aa	832.8500 Ba
7 h	316.8885 Aa	847.7250 Ba
25 h	329.6879 Aa	864.4519 Ba
28 h	369.5390 Aa	893.7019 Ba
47 h	357.6096 Aa	907.2067 Ba
71 h	382.2361 Aa	972.3339 Ba
95 h	371.0415 Aa	897.3143 Ba
101 h	364.2081 Aa	938.6000 Ba

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na horizontal, e minúsculas, na VERTICAL, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey.

No entanto, verificou-se um crescimento nas médias, ao longo dos períodos de avaliação, tanto

das sementes escarificadas, quanto das sementes naturais. Isso pode ser explicado pelo coeficiente de variação (CV) alto, na análise do conjunto de dados, de 44,39%. O CV fornece a variação dos dados obtidos em relação à média. Quanto menor for o seu valor, mais homogêneos serão os dados. O coeficiente de variação é considerado baixo (apontando um conjunto de dados bem homogêneos) quando for menor ou igual a 25%.

Em relação ao teor de água das sementes, obtido a partir da marcha de absorção, é possível observar que as sementes escarificadas apresentaram superioridade em relação às sementes intactas, na primeira pesagem (Tabela 6).

Tabela 6. Marcha de absorção de águas, de sementes de *U. brizantha*, sem escarificação e com escarificação química, com ácido sulfúrico.

Períodos	Peso (g)	
	Não escarificada	Escarificada
0h	405,0000 Bh	506,7500 Ag
1h	572,7500 Ag	530,2500 Ag
2 h	613,7500 Af	547,2500 Bf
3 h	620,7500 Af	579,7500 Af
5 h 30	675,2500 Ae	604,2500 Be
9 h	682,7500 Ae	634,7500 Be
11 h	712,0000 Ae	660,5000 Bd
21 h	775,0000 Ad	667,5000 Bd
27 h	801,2500 Ad	695,7500 Bc
32 h	840,2500 Ac	730,0000 Bb
53 h ¹	865,5000 Ab	756,2500 Bb
77 h	886,0000 Ab	828,7500 Ba
101 h	946,7500 Aa	868,7500 Ba

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na horizontal, e minúsculas, na vertical, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott e Knott.

No entanto, ao final do teste, as sementes escarificadas apresentaram peso inferior. Após o período de 2 horas de embebição, ocorreu diferença na hidratação das sementes. As intactas

apresentaram maior teor de água que as escarificadas, indicando que a escarificação reduziu a embebição. Durante a embebição, as sementes intactas partiram de um peso inferior ao peso das sementes escarificadas. Entretanto, após as 2 primeiras horas, a quantidade de água embebida pelas sementes intactas, supera as das sementes escarificadas, sugerindo que os tecidos dos envoltórios, de sementes desse gênero, apresentam alto grau de desidratação (Câmara e Stacciarini-Seraphin 2002).

Na Figura 1, observa-se a evolução da embebição, das sementes intactas, caracterizando o padrão trifásico de absorção de água. O modelo trifásico, estabelecido em Bewley et al. (2012), considera que a Fase I, de embebição, ocorre na primeira hora, possibilitando um crescente aumento na taxa inicial de embebição. Nas sementes escarificadas, não houve diferença significativa de peso, entre as duas primeiras horas, ocorrendo assim, somente na terceira hora de absorção (Tabela 4). Essa fase caracteriza-se por um processo físico, independente da atividade metabólica da semente, devido à acentuada diferença entre os potenciais hídricos, das sementes.

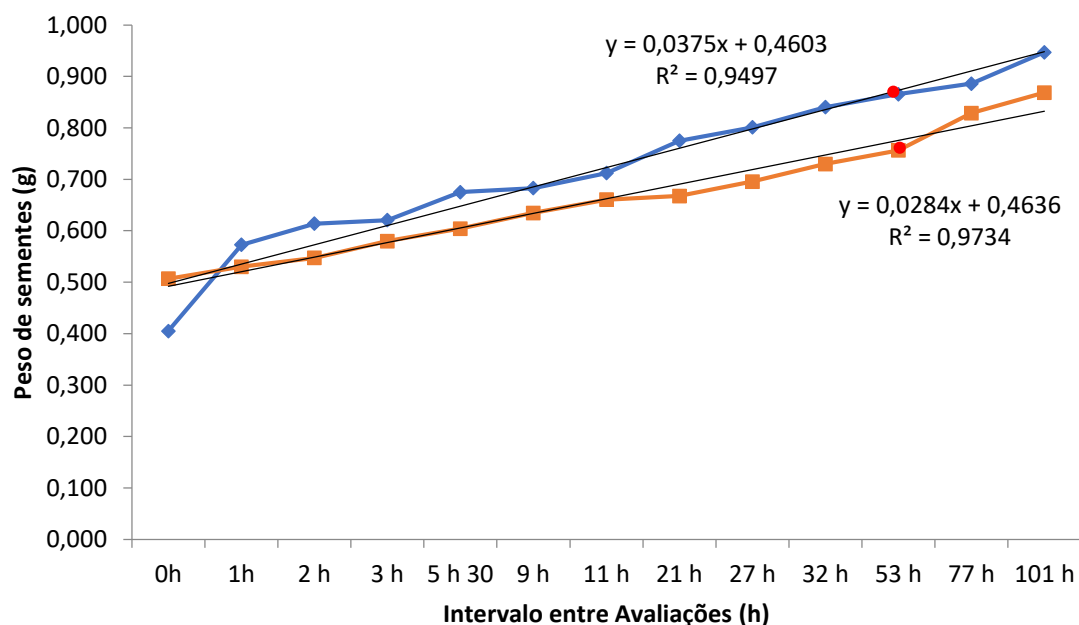


Figura 2. Variação do peso, em sementes intactas (linha azul) e em sementes escarificadas (linha laranja), de *U. brizantha*, pertencentes ao lote B, em função do tempo de embebição. O ponto vermelho corresponde a hora de protusão da radícula, de ambas as sementes.

Após o período de 1 e 2 horas, verificou-se uma estabilização no ganho de massa, demonstrando uma lenta absorção de água, comumente encontrada na fase II. No presente trabalho, foi

observado uma absorção mais lenta, onde não foram verificadas diferenças significativas, entre os períodos consecutivos avaliados, mas sim diferença em períodos maiores (Tabela 6). Nesta fase, ocorreu uma intensa atividade respiratória, e acentuados processos metabólicos, importantes para o desenvolvimento e o crescimento embrionário, estimulando a germinação, sendo representada pela protrusão radicular. É então iniciada a Fase III, onde houve o aumento no ganho de água, para atendimento à demanda das novas células, em processo de formação da plântula (Marcos Filho, 2005). Desta maneira, a Fase III para as sementes intactas e com escarificação química, foi iniciada após as 53 horas de embebição.

Na análise dos dados obtidos pelo teste de germinação de sementes submetidas aos tratamentos de escarificação (E), desinfestação (D) e escarificação seguida de desinfestação (E+D), verifica-se que houve interação significativa entre os lotes A e B (Tabela 7).

Tabela 7. Primeira contagem (PCG) e segunda contagem (G) de sementes germinadas, de dois lotes comerciais (A e B), de *U. brizantha*, submetidas a diferentes tratamentos.

TRATAMENTOS	PCG	
	LOTE A	LOTE B
Escarificação E	17Ba	35Aa
Desinfestação D	3Ab	2Ac
D+E	8Ab	11Ab
Testemunha	4Ab	2Ac
	G	
	LOTE A	LOTE B
Escarificação E	20Ba	49Aa
Desinfestação D	5Ac	6Ab
D+E	9Abc	14Ab
Testemunha	16Aab	8Bb

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na horizontal, e minúsculas, na vertical, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey.

A superioridade das sementes do Lote B, quando escarificadas, foi constatada por apresentarem melhor germinação, indicando se tratar de sementes melhores e mais vigorosas, em comparação ao Lote A. Porém, quando as testemunhas (sementes naturais) são comparadas, em relação à germinação (G), o Lote A apresentou melhor germinação nas variáveis, primeira contagem de

germinação (PCG), e segunda contagem de germinação (G).

Quanto aos tratamentos de sementes testados, o que se mostrou mais eficiente foi a escarificação, que teve maior número de sementes germinadas na primeira e na última contagem (G), em ambos os lotes (Tabela 7). Esse resultado sugere que a escarificação pode ter auxiliado na superação de dormência das sementes, o que proporcionou maior germinação. Para Silva et al. (2018), a utilização do ácido sulfúrico torna a germinação da *Brachiaria* mais rápida. No entanto, a germinação de sementes escarificadas, do lote A, não foi superior à testemunha, tendo suas médias estatisticamente iguais. Já o tratamento de desinfestação (D), demonstrou baixo desempenho, indicando que o processo de desinfestação não foi eficiente, ou não contribuiu para a quebra de dormência da semente, causando prejuízo na germinação.

Estes resultados corroboram aos observados por outros autores (Silva et al., 2008; Lima et al., 2015), quando verificaram que a aplicação de H_2SO_4 proporcionou aumento significativo, na germinação de sementes de braquiária. Anteriormente, Munhoz et al. (2009), já tinham constatado que a utilização de ácido sulfúrico, na quebra de dormência de sementes de *B. brizantha* cv. 'MG-5', acelera o crescimento inicial da radícula e da parte aérea, e não prejudica o desenvolvimento da biomassa das plântulas.

CONCLUSÕES

1. Apesar da vigência da Instrução Normativa nº 30 – MAPA, que dispõe sobre os valores mínimos de pureza em lotes de sementes comercializados, valores abaixo do recomendado, apresentados por sementes de *U. brizantha*, oriundas de lotes diferentes, sugerem a necessidade de maior aporte legal e de ações fiscalizatórias, acerca de sementes desse gênero, ofertadas no mercado.
2. Sementes escarificadas responderam, com destaque positivo, aos testes de germinação, de viabilidade e de condutividade elétrica, sugerindo que este tratamento pode auxiliar na promoção da permeabilidade do tegumento à água e às trocas gasosas, contribuindo para o desenvolvimento inicial de sementes de *U. brizantha*.
3. O protocolo de desinfestação aplicado, demonstrou influência negativa na germinação das sementes de *U. brizantha*, o que sugere sensibilidade das sementes a este tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÂMARA, H. H. L. L.; STACCIARINI-SERAPHIN, E. Germinação de sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu sob diferentes períodos de armazenamento e tratamento hormonal. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, v. 32, n. 1, p. 21-28, 2002.
- BALDANI, A. L. *Métodos de desinfestação superficial para obtenção de sementes de milho livres de microrganismos*. Seropédica, 2006. (EMBRAPA Agrobiologia. Documentos, 212)
- BELING, R. R. *Anuário Brasileiro de Sementes 2016*. Santa Cruz do Sul: Gazeta, 2016.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Número 44, de 22 de novembro de 2016. Diário Oficial da União, Número 230. ISSN 1677- 7042. Brasília, DF. Dezembro de 2016
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfd/a/arquivos-publicacoes-laboratorio/regras-para-analise-de-sementes.pdf/view>
- COSTA, K. A. P.; FAQUIN, V.; OLIVEIRA I. P. Doses e fontes de nitrogênio na recuperação de pastagens do capim-marandu. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, n. 62, p. 192-199, 2010.
- CRISPIM, S.M.A.; BRANCO, O.D. Aspectos gerais das Braquiárias e suas características na sub-região da Nhecolândia, Pantanal, MS. Corumbá, 2002. (EMBRAPA Pantanal. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento).
- DALPONT, E. C.; SILVA, J. B.; SOUZA, L. M. S.; CARVALHO, M. A. C.; ZARATIN, C. Qualidade Sanitária de Sementes de Maçaranduba. *Revista de Ciências AgroAmbientais*, v. 11, p. 173-176, 2013.
- DIAS-FILHO, M. B. *Diagnóstico das pastagens no Brasil*. Belém, 2014. 36p. (EMBRAPA Amazônia Oriental. Documentos, 402). Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/986147/diagnostico-das-pastagens-no-brasil>

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Effects of stress and injury on meat and by-product quality. Chapter 2: In: G HEINZ (Ed). Guidelines for Humane Handling, Transport and Slaughter of Livestock. 2001, p. 6–10. Disponível em: https://www.wellbeingintlstudiesrepository.org/acwp_faafp/20/. Acesso em: outubro de 2022.

GUIMARÃES, L.R.A. et al. Fungos associados às sementes comerciais de braquiária. In: *Jornada Científica da Embrapa Gado de Corte*, Campo Grande, 2006. (EMBRAPA Gado de Corte).

LAGO, A. A.; MARTINS, L. Qualidade fisiológica de sementes de *Brachiaria brizantha*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 33, n. 2, p. 199-204, 1998.

MACEDO, M. C. M. et al. *Degradação de pastagens, alternativas de recuperação e renovação, e formas de mitigação*. Campo Grande, 2013. (EMBRAPA Gado de Corte). Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/976514>. Acesso em outubro de 2022.

MACEDO, M. C. M. Pastagens nos ecossistemas Cerrados: evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, Goiânia, 2005. p. 56-84.

MALLMANN, G. et al. Fungos e nematoides associados a sementes de forrageiras tropicais. *Summa Phytopathologica*. v. 39, p. 201-203, 2013.

MARCHI, C. E. et al. Químico e termoterapia em sementes e aplicação de fungicidas em *Brachiaria brizantha* como estratégias no manejo do carvão. *Summa Phytopathologica*. v. 34, n. 4, p. 321-325, 2008.

MARCOS FILHO, J. *Fisiologia de sementes de plantas cultivares*. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

MARTINS, L.; SILVA, W. R. Efeitos imediatos e latentes de tratamentos térmico e químico em sementes de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu. *Bragantia*. v. 62, n. 1, p. 81-83, 2008.

MARTINS, L.; SILVA, W. R.; LOT, R. C. Tratamentos térmicos e superação da dormência em sementes de *Brachiaria brizantha* (Hoechst. ex A. Rich) Stapf. Informativo ABRATES, Curitiba, v. 7, n. 1 e 2, p. 245, 1997.

MUNHOZ, R.E.F.; ZONETTI, P.C.; ROMAN, S. (2007) – Avaliação da quebra de dormência com ácido sulfúrico em sementes de *Brachiaria brizantha* cultivar Mg5. In: V EPCC Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar.

NEERGAARD, P. Seed pathology. London: The Macmillan, 1979. v.1, 839p.

FILHO, A.O. *Produção e Manejo de Bovinos de Corte*. **KCM Editora**, 155p. Cuiabá, 2015. ISBN 978-85-7769-212-5

QUADROS, D. G. et al. Componentes da produção e qualidade de sementes dos cultivares marandu e xaraés de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf colhidas por varredura manual ou mecanizada. *Ciências Agrárias*. v. 33, n. 5, p. 2019- 2028, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi: 10.5433/1679-0359.2012v33n5p2019> >

SILVA, A.L.M.S.; Torres, F.E.; GARCIA, L.L.P.; Mattos, E.M. e Teodoro, P.E. (2014) – Tratamentos para quebra de dormência em *Brachiaria brizantha*. *Revista de Ciências Agrárias*, vol. 37, n. 5, p. 37-41.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2004. 719p.

VALLE, C. B. et al. *O capim-xaraés (Brachiaria brizantha cv. Xaraés) na diversificação das pastagens de braquiária*. Campo Grande, 2004. (Embrapa Gado de Corte. Série Documentos, 149).

VALLE, C.B. do; JANK, L. (Org.) *Melhoramento de forrageiras tropicais*. Campo Grande, 2008. p.55-87. (Embrapa Gado de Corte)

VECHIATO, M. H.; APARECIDO, C. C.; FERNANDES, C. D. *Frequência de fungos em lotes de sementes comercializadas de Brachiaria e Panicum*. São Paulo, 2010 (Instituto Biológico. Documento técnico, 007). Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/870871>. Acesso em: outubro de 2022.

WHITEMAN, P. C.; MENDRA, K. Effects of storage and seed treatments on germination of *Brachiaria decumbens*. *Seed Science and Technology*, Zürichv, v. 12, p. 233-242, 1982.

ZILLI, J. E. et al. *Análise da qualidade do substrato composto por areia e vermiculite para cultivo de leguminosas em vasos Leonard, nas condições da Embrapa Agrobiologia*. Seropédica, 2011. (EMBRAPA Agrobiologia. Documentos, 289)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados indicam que as estirpes usadas, neste trabalho, possuem potencial para exploração da simbiose com *U. brizantha* cv. *Marandu*. No entanto, ajustes são necessários para o estabelecimento de protocolos de limpeza e de desinfestação, que proporcionem maior eficiência do processo de inoculação. Dessa maneira, será possível avaliar com mais clareza, a influência que *Azospirillum* sp. e que FMAs exercem sobre o desenvolvimento inicial da gramínea. O tratamento químico de sementes, com ácido sulfúrico, demonstrou ser bastante eficiente, na quebra de dormência das sementes de *U. brizantha*, ainda que essas, tenham apresentado qualidade inferior ao imposto pela legislação.

Portanto, a continuação de estudos que visem a pesquisa de práticas e de procedimentos, que possam trazer benefícios ambientais e econômicos, para o campo, como o uso de microrganismos promotores de crescimento, no processo de recuperação de pastagens, são essenciais para o desenvolvimento de uma agropecuária mais sustentável.