

Desinfestação de sementes de plantas dos gêneros
Paspalum e *Brachiaria* para ensaios de inoculação
in vitro de bactéria fixadora de nitrogênio



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

DOCUMENTOS 314

Desinfestação de sementes de plantas dos gêneros *Paspalum* e *Brachiaria* para ensaios de inoculação *in vitro* de bactéria fixadora de nitrogênio

*Stefan Schwab
Juliana dos Santos Menezes
Wiglison Bruno Aires Nascimento
Bruna Pessanha do Nascimento
Jéssica de Paula Ferreira
Carlos Magno dos Santos
Bianca Baccili Zanotto Vigna
Karem Guimarães Xavier Meireles
Marcia Soares Vidal
José Ivo Baldani*

Embrapa Agrobiologia
Rio de Janeiro, RJ
2020

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia
Rodovia BR 465, km 7
CEP 23891-000, Seropédica, RJ
Caixa Postal 74.505
Fone: (21) 3441-1500
Fax: (21) 2682-1230
www.embrapa.br/agrobiologia
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agrobiologia

Presidente
Bruno José Rodrigues Alves

Secretária-Executiva
Carmelita do Espírito Santo

Membros
*Ednaldo Silva de Araújo, Janaina Ribeiro Costa
Rouws, Luc Felicianus Marie Rouws, Luis
Cláudio Marques de Oliveira, Luiz Fernando
Duarte de Moraes, Marcia Reed Rodrigues
Coelho, Maria Elizabeth Fernandes Correia,
Nátia Élen Auras*

Supervisão editorial
Maria Elizabeth Fernandes Correia

Normalização bibliográfica
Carmelita do Espírito Santo

Tratamento das ilustrações
Maria Christine Saraiva Barbosa

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Maria Christine Saraiva Barbosa

Foto da capa
Juliana dos Santos Menezes

1ª edição
2020: Edição eletrônica

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Agrobiologia

DESINFESTAÇÃO de sementes de plantas dos gêneros *Paspalum* e
Brachiaria para ensaios de inoculação *in vitro* de bactéria fixadora de
nitrogênio / Stefan Schwab *et al.* Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2020.
22 p.: (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 314).
ISSN: 1517-8498.

1. Gramíneas forrageiras. 2. Inoculação. 3. Estirpe bacteriana. 4. FBN.
I. Schwab, Stefan. II. Menezes, Juliana dos Santos. III. Nascimento, Wiglison B.
Aires. IV. Nascimento, Bruna Pessanha. V. Ferreira, Jéssica de Paula.
VI. Santos, Carlos Magno dos. VII. Vigna, Bianca, Baccili, Zanotto. VIII. Meireles,
Karen Guimarães Xavier. IX. Vidal, Márcia Soares. XI. Baldani, J. I. XII. Embrapa
Agrobiologia. XIII. Série.

633.2 - CDD 23. Ed.
CGPE: 16062

Autores

Stefan Schwab; Marcia Soares Vidal; José Ivo Baldani

Pesquisadores da Embrapa Agrobiologia. BR 465, km 07, CEP 23.891-000, Seropédica/RJ, e-mails: stefan.schwab@embrapa.br; marcia.vidal@embrapa.br; ivo.baldani@embrapa.br.

Juliana dos Santos Menezes

Discente de graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. BR 465, km 07, CEP 23.897-000, Seropédica/RJ. *In memoriam*.

Wiglison Bruno Aires Nascimento

Discente de graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. BR 465, km 07, CEP 23.897-000, Seropédica/RJ, e-mail: aires.bruno1@gmail.com.

Bruna Pessanha do Nascimento

Discente de graduação em Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. BR 465, km 07, CEP 23.897-000, Seropédica/RJ, e-mail: bruna-pessanha@hotmail.com.

Jéssica de Paula Ferreira

Discente de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. BR 465, km 07, CEP 23.897-000, Seropédica/RJ, e-mail: jeessica_ufrjr@yahoo.com.br.

Carlos Magno dos Santos

Pesquisador bolsista de pós-doutorado da Embrapa Agrobiologia. BR 465, km 07, CEP 23.891-000 – Seropédica/RJ, e-mail: c.magno.s@hotmail.com.

Bianca Baccili Zanotto Vigna

Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste. Rodovia Washigton Luiz, km 234, Caixa Postal 339, Fazenda Canchim, CEP 13.560-970, São Carlos/SP, e-mail: bianca.vigna@embrapa.br.

Karem Guimarães Xavier Meireles

Pesquisadora da Embrapa Gado de Corte. Av. Rádio Maia nº 830, Zona Rural, CEP: 79.106-550, Campo Grande/MS, e-mail: karem.meireles@embrapa.br.

Apresentação

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) em conjunto com a fotossíntese formam a base da vida no planeta. O manejo da FBN através do uso de inoculantes microbianos ganhou alcance com a cultura da soja no Brasil. No entanto, outras culturas podem se beneficiar deste processo para suprir ao menos parte da sua demanda de nitrogênio. Ampliar a substituição de fertilizantes nitrogenados pela FBN traz efeitos positivos nas esferas econômica e ambiental.

O desenvolvimento e validação de um inoculante envolvem diferentes etapas de prospecção, entendimento da simbiose e veiculação do produto inoculante, assim como a avaliação dos efeitos benéficos de fixação biológica de nitrogênio e promoção de crescimento. As características de cada cultura impõem novos desafios de pesquisa que frequentemente resultam em novas metodologias ou adaptações necessárias dos métodos já existentes.

Nesta publicação os autores se dedicaram a descrever procedimentos resultantes de adaptações experimentais para promover a desinfestação e germinação de sementes de gramíneas forrageiras. Estas etapas são fundamentais para a validação dos inoculantes desenvolvidos e servem de referência para estudos posteriores nesta temática.

Boa leitura!

Maria Elizabeth Fernandes Correia
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

Sumário

Introdução	11
Detalhamento sobre o material biológico	12
Quebra da dormência, desinfestação e germinação das sementes	13
Procedimento 1	14
Procedimento 2	14
Procedimento 3	16
Inoculação da bactéria diazotrófica <i>A. brasilense</i> estirpe Sp245 e incubação das plantas	17
Análise da presença de <i>Azospirillum brasilense</i> estirpe Sp245 nos tecidos das plantas inoculadas	18
Conclusão	20
Referências bibliográficas	20

Introdução

Os estudos sobre o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) em gramíneas forrageiras dos gêneros *Paspalum* e *Brachiaria* fazem parte da história das pesquisas em FBN no Brasil (BALDANI; BALDANI, 2005). O primeiro trabalho sobre fixação de nitrogênio em *Paspalum* spp., publicado por Johanna Döbereiner em 1966, descreve o isolamento e a caracterização da bactéria fixadora de nitrogênio (i.e., diazotrófica) *Azorhizophilus* (ex-*Azotobacter*) *paspali* a partir da rizosfera de *P. notatum* (grama forquilha ou batatais), e também de *P. plicatum* (pasto negro ou capim colchão) (DÖBEREINER, 1966). Posteriormente, a fixação de nitrogênio em plantas de *P. notatum* cv. Batatais foi demonstrada através de experimentos em câmara de incubação enriquecida com $^{15}\text{N}_2$ (DE-POLLI et al., 1977). Estudos utilizando a técnica da diluição isotópica de ^{15}N em *P. notatum* cv. Batatais cultivada em campo demonstraram uma contribuição de até 25% para a incorporação de N via FBN (BODDEY et al., 1983a, 1983b).

Em *Brachiaria* spp., a contribuição da FBN para o aporte de N na cultura mostrou ser de até 39%, dependendo da espécie ou cultivar avaliada (BODDEY; VICTORIA, 1986). Posteriormente, estudos envolvendo 14 genótipos plantados em um tanque com solo enriquecido com ^{15}N mostraram uma contribuição da FBN de até 26% (REIS et al., 2001). Neste mesmo trabalho, a partir de plantas de *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. humidicola*, cultivadas no Rio de Janeiro, Goiânia e Bahia, foram isoladas bactérias fixadoras de nitrogênio predominantemente da espécie *Nitrospirillum* (ex-*Azospirillum*) *amazonense*. Esses resultados demonstram o potencial da FBN para o aporte de N, em substituição ao menos parcial da fertilização nitrogenada, como forma de compensar o investimento financeiro e de mitigar os impactos ambientais decorrentes da fabricação e uso desses fertilizantes nas pastagens. Uma das tecnologias limpas que utilizam a FBN consiste na inoculação das sementes/plantas com preparações denominadas inoculantes ou biofertilizantes contendo bactérias diazotróficas.

A inoculação de bactérias diazotróficas já vem sendo testada em *Brachiaria* spp. em nível de campo (GUIMARÃES et al., 2016; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2016). No entanto, faltam informações mais básicas sobre a interação que ocorre entre as bactérias inoculadas e suas plantas hospedeiras,

informações essas mais facilmente obtidas em condições experimentais controladas, *in vitro*. Sob estas condições, é interessante que apenas planta e bactéria estejam presentes, em gnotobiose. Condições experimentais para o cultivo *in vitro* de *Paspalum* e *Brachiaria*, após desinfestação de suas sementes e germinação, já têm sido reportadas na literatura (BOVO; MROGINSKI, 1989; MAROUSKY; WEST, 1990; VIKRANT; RASHID, 2001; QUESENBERRY et al., 2010; CABRAL et al., 2011). Entretanto, nestes casos a finalidade era a multiplicação das plantas via embriogênese somática ou a duplicação do número de cromossomos, e não estudos de interação com microrganismos, que é o objetivo do presente documento. O sucesso relativo do processo de esterilização das sementes não foi detalhado nesses estudos, possivelmente por conta dos objetivos distintos desses trabalhos. Todavia, já foi descrito na literatura que nem sempre se consegue eliminar todas as bactérias no processo de desinfestação das sementes (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). Fatores como forma de coleta das sementes (da planta *versus* do chão), idade do lote e modo de conservação influenciam no nível de infestação por microrganismos.

Este documento descreve adaptações experimentais, a partir dos trabalhos citados no parágrafo anterior, para a inoculação *in vitro* de bactérias diazotróficas, que resultaram em três procedimentos eficientes para a desinfestação e germinação das sementes. O sucesso dessas adaptações foi verificado através do uso da bactéria *Azospirillum brasilense* marcada com a proteína verde fluorescente (GFP), ou corada com o *kit* Live/Dead BacLight (Invitrogen), e estudos de interação com as plantas por microscopia confocal de varredura a *laser*.

Detalhamento sobre o material biológico

A Tabela 1 contém a descrição dos cultivares de pastagens utilizados no presente trabalho, sendo as sementes de *Brachiaria* spp. fornecidas pela Embrapa Gado de Corte e as de *Paspalum* spp. pela Embrapa Pecuária Sudeste. Em relação à estirpe bacteriana, foi utilizada a estirpe Sp245 de *A. brasilense*, cedida pelo Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD) da Embrapa Agrobiologia.

Tabela 1. Cultivares vegetais utilizados.

Espécie	Cultivar vegetal	Referência	Sucesso com procedimento de nº	Necessidade de quebra da dormência das sementes?*
<i>B. brizantha</i>	Marandu	(NUNES et al., 1984)	1 3	Sim Não
<i>B. brizantha</i>	Paiaguás	(DO VALLE et al., 2013)	2	Não
<i>Brachiaria</i> spp.	Ipyporã	(DO VALLE et al., 2017)	1	Sim
<i>B. ruziziensis</i>	Ruziziensis	(GERMAIN; EVRARD, 1953)	2	Não
<i>B. decumbens</i>	Basilisk	(PRAIN, 1919)	3	Não
<i>P. regnellii</i>	BRS Guará	(KARMOUCHE et al., 2015)	1 3	Sim Sim
<i>P. atratum</i>	Pojuca	(KARIA; DE ANDRADE, 2001; RAMOS et al., 2002)	1 3	Sim Não

*Ver respectivo procedimento.

Quebra da dormência, desinfestação e germinação das sementes

Os trabalhos que descrevem a desinfestação das sementes não detalham o grau de desinfestação alcançado com o procedimento; por exemplo, qual a porcentagem de sementes sem sinal de contaminação. Na adaptação dos procedimentos aqui utilizados, buscou-se monitorar esse grau de desinfestação alcançado. No entanto, e conforme mencionado acima, muitos fatores influenciam nesse grau de infestação por microrganismos, tais como: a idade do lote e modo de conservação das sementes, a forma de coleta da semente de forrageira (podendo ser do chão por varredura, ou coleta da parte aérea por derriça em pano, por exemplo). Atualmente é possível comprar sementes de forrageira com descrição da forma de coleta da semente. Estas

duas formas de coleta e armazenamento, aliadas à própria genética da planta, são fatores que dificultam a comparação entre diferentes procedimentos realizados em ocasiões distintas. Os três procedimentos a seguir permitiram a obtenção de resultados satisfatórios em diferentes situações, com lotes de sementes de boa qualidade.

Procedimento 1

Na adaptação da metodologia previamente empregada para *P. notatum* (MAROUSKY; WEST, 1990), foram utilizadas neste trabalho sementes das gramíneas relacionadas na Tabela 1, procedimento 1. A quebra da dormência consistiu em imergir as sementes em ácido sulfúrico a 96% por 10 min, no caso de *Brachiaria* spp., ou por cerca de 5 s, no caso de *Paspalum* spp., mantendo-se sob agitação por inversão manual do tubo. Após a remoção do ácido, as sementes são lavadas por imersão em água destilada, seguido de imersão em etanol 70% por 5 min sob agitação por inversão manual do tubo. O álcool etílico foi removido, e as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio (> 1% de cloro ativo) contendo Tween 20 a 0,05%, e mantendo-se por 10 min sob agitação por inversão do tubo. A solução foi removida em ambiente estéril (capela de fluxo laminar), e as cariopses foram lavadas cinco vezes em água destilada estéril.

As sementes foram colocadas sobre meio Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950), com 1/10 da força adicionado de nitrato de potássio 5,0 mM, sólido (ágar 14 g/L), em placa de Petri com o auxílio de uma pinça de aço esterilizada em chama. A placa foi incubada a 28 °C durante aproximadamente 7 a 10 dias, até atingir o tamanho conforme apresentado na Figura 1.

Procedimento 2

O segundo procedimento foi testado com sucesso para os cultivares relacionados na Tabela 1, procedimento 2. Consistiu em descascar e imergir as sementes em etanol 70% por 3 min. Dessa etapa em diante todos os procedimentos devem ser realizados em ambiente estéril (p.ex., capela de fluxo laminar) a fim de diminuir os riscos de contaminação. Em seguida, o etanol foi removido e as sementes foram lavadas uma vez com água destilada estéril. Posteriormente as sementes foram lavadas com hipoclorito



Fotos: Juliana dos Santos Menezes

Figura 1. Sementes de *Brachiaria* spp. e *Paspalum* spp. germinadas em placas de Petri com meio Hoagland sólido utilizando o procedimento 1. À esquerda, sementes germinadas de *B. brizantha* cv. Marandu, enquanto à direita, *P. atratum* cv. Pojuca.

de sódio (4-6% de cloro ativo) por 15 min sob agitação a ~20 rpm em agitador basculante. Após 3 lavagens de 10 min cada sob agitação em água destilada estéril, as sementes foram transferidas assepticamente para placas de Petri contendo meio ágar/água (ágar 0,5% com 500 mg/L de extrato de levedura). As placas foram incubadas em estufa a 30 °C na ausência de luz por um período de 2 dias, e então transferidas para estufa BOD a 28–30 °C com fotoperíodo de 12 h. Utilizando este protocolo é possível atingir cerca de 95%–100% de plântulas livres de microrganismos (Fig. 2).

Foto: Jéssica de Paula Ferreira



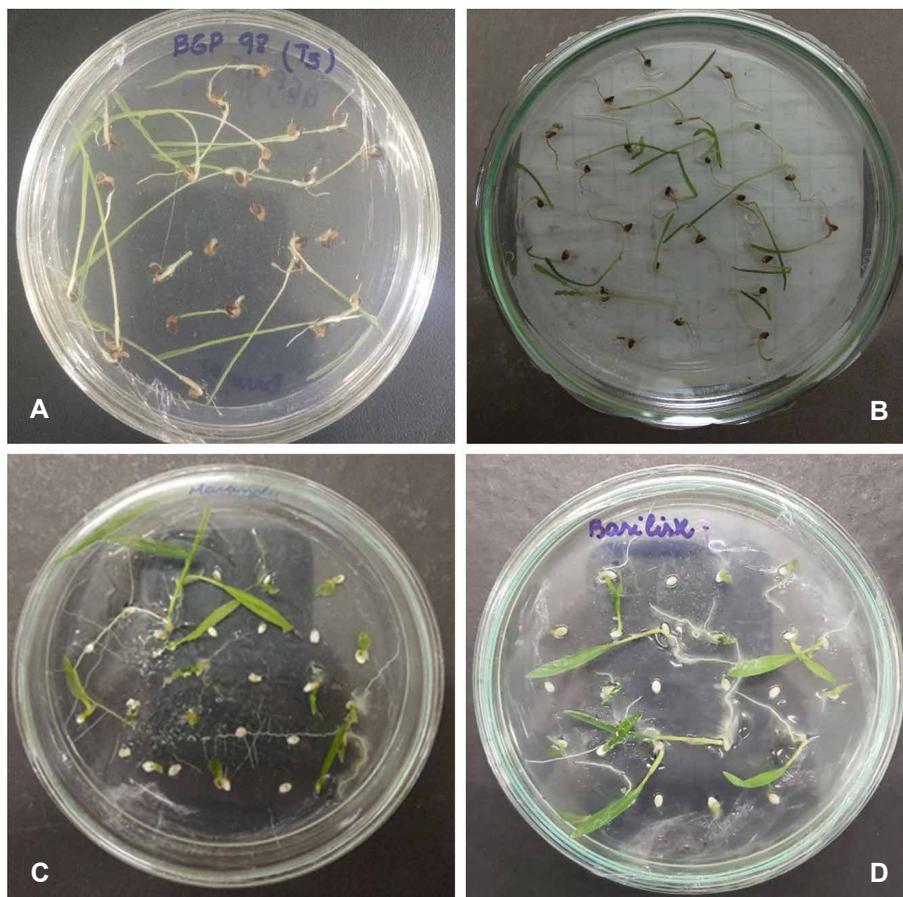
Figura 2. Sementes de *B. brizantha* cv. Paiaguás germinadas em placas de Petri com meio Ágar-Água utilizando o procedimento 2.

Procedimento 3

No terceiro procedimento foram executadas etapas distintas para a desinfestação de sementes das gramíneas listadas na Tabela 1, procedimento 3. Para as sementes de *Paspalum* spp., foi testado com sucesso um protocolo fazendo uso de peróxido de hidrogênio, adaptado de um trabalho prévio (LI et al., 2016) e proposto por Dos-Santos et. al (não publicado). No caso das sementes de *P. regnellii*, estas necessitam de uma etapa prévia de imersão de aproximadamente 5 s em ácido sulfúrico 96%; o restante do procedimento é comum a ambas as cultivares. A quebra da dormência se inicia com a lavagem das sementes em água destilada estéril, mantendo-se sob leve agitação durante 30 min. Após a remoção da água, as sementes são imersas em uma solução de H_2O_2 a 80% e incubadas durante 40 min à temperatura ambiente. A solução de H_2O_2 é removida e então é realizada uma lavagem das sementes com água e solução de Hoagland na proporção de 1:1 durante 10 minutos com agitação manual.

Para as sementes de *Brachiaria* spp., é necessário descascar as sementes antes de se iniciar a metodologia de desinfestação, pois as mesmas possuem microrganismos endofíticos que não se conseguiu eliminar com nenhum agente sanitizante sem comprometer a germinação. As sementes são descascadas cuidadosamente com o auxílio de uma pinça de ponta fina e de uma agulha, e não se recomenda utilizar lixa ou similares pois as sementes mostram-se frágeis. Após descascadas, as sementes são imersas em etanol 70%, mantendo-se sob agitação manual durante 3 min. O álcool é retirado e as sementes são lavadas com água destilada estéril. Adiciona-se hipoclorito de sódio (4-6% de cloro ativo) e coloca-se sob agitação em um agitador do tipo basculante a ~20 rpm durante 20 min. Depois de se remover a solução de hipoclorito, são realizadas quatro lavagens com água destilada estéril, sendo três lavagens mantidas sob agitação durante 3 minutos e uma lavagem sob agitação durante 5 min.

Após o tratamento das sementes tanto de *Paspalum* quanto de *Brachiaria*, as mesmas foram colocadas sobre meio ágar-água (ágar 0,5% suplementado com meio LB a 500 mg/L) com o auxílio de uma pinça de aço esterilizada em chama, e incubadas a 28 °C durante 7 dias (Fig. 3). As plântulas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e granulados de polipropileno para sustentação das mesmas, e incubadas a 25 °C até que estivessem desenvolvidas.



Fotos: Bruna Pessanha do Nascimento

Figura 3. Sementes de *Paspalum* spp. e *Brachiaria* spp. germinadas em placas de Petri com meio Ágar-Água utilizando o procedimento 3. **A:** *P. Atratum* cv. Pojuca; **B:** *P. regnellii* cv. BRS Guará; **C:** *B. brizantha* cv. Marandu, e **D:** *B. decumbens* cv. Basilisk.

Inoculação da bactéria diazotrófica *A. brasilense* estirpe Sp245 e incubação das plantas

O processo de inoculação consiste no transplante das plântulas para tubos de ensaio de 20 cm x 3 cm (compr. x diâm.) com um sistema hidropônico estéril contendo 30 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) ou Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950) modificados sem fonte de nitrogênio e

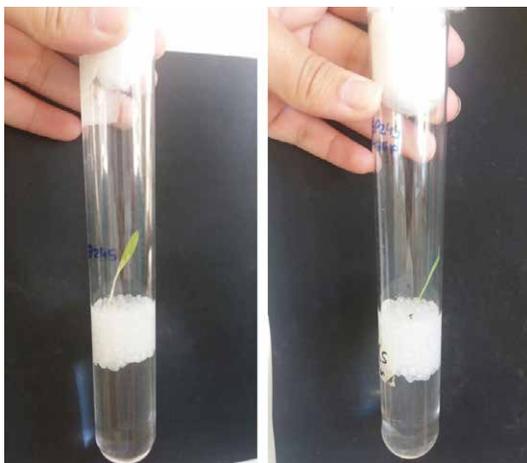


Figura 4. Incubação das plântulas de *Brachiaria* spp. e *Paspalum* spp. em tubos de ensaio contendo meio MS acrescido de granulados de polipropileno. À esquerda, plântula de *B. brizantha* cv. Marandu, enquanto à direita, *P. atratum* cv. Pojuca.

carbono, adicionado de granulados de polipropileno que fornecem sustentação às plântulas. Antes da introdução da plântula, as células bacterianas, pré-cultivadas em meio DYGS (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA JR; VICTOR, 1986), são lavadas com tampão PBS (NaCl 137 mM, fosfato de sódio 10 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4), e as mesmas são inoculadas no meio de cultura em uma concentração que pode variar entre 10^5 e 10^7 células/mL, homogeneizando o sistema em vórtice. Alternativamente, a inoculação pode ser realizada por imersão das raízes diretamente na suspensão bacteriana, incubação por até 1 hora, para depois se transferir a planta para o sistema hidropônico (Fig. 4). Após o transplante, as plantas são cultivadas em condições controladas em uma câmara de incubação, a 25–30°C e 16 h / 8 h de fotoperíodo, por aproximadamente 20 dias, ou até que o espaço do tubo fique apertado para a planta, alternativamente pode-se retirar a parte aérea da planta para fora, trocando-se o algodão, e incubando-se por mais alguns dias.

Análise da presença de *Azospirillum brasilense* estirpe Sp245 nos tecidos das plantas inoculadas

A presença da bactéria nos tecidos da planta pôde ser confirmada por análises de microscopia. No presente documento, foram utilizadas duas estratégias para marcação fluorescente da bactéria *Azospirillum brasilense* estirpe Sp245,

realizando-se em seguida análises de microscopia confocal de varredura a laser. A primeira estratégia consistiu em utilizar os corantes fluorescentes SYTO™ 9 e iodeto de propídio presentes no kit comercial Live/Dead BacLight (Invitrogen), enquanto que a segunda estratégia envolveu o uso da bactéria geneticamente modificada expressando a proteína verde fluorescente (GFP). Ambas as estratégias permitiram visualizar a interação do microrganismo com tecidos de *Brachiaria* e *Paspalum* (Fig. 5).

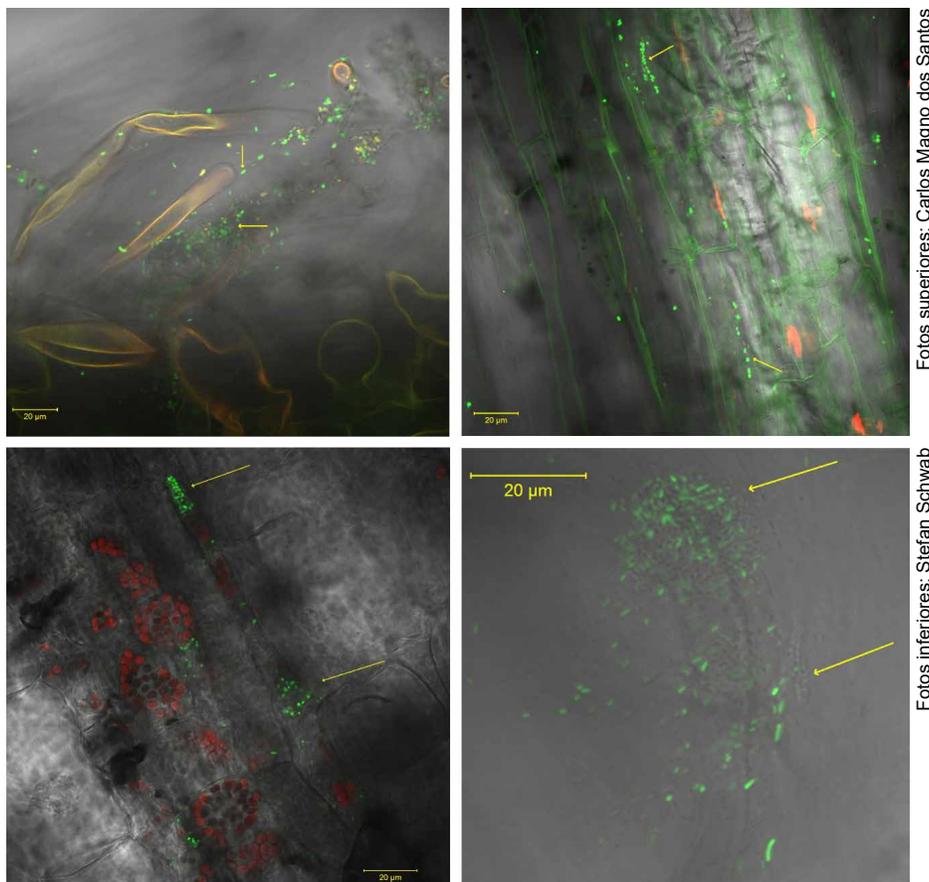


Figura 5. Interação, sob condições *in vitro*, entre a bactéria *Azospirillum brasilense* Sp245 marcada com o kit Live/Dead BacLight e raiz de *P. regnellii* BRS Guará (em cima à esquerda), raiz de *P. atratum* cv. Pojuca (em cima à direita), ou marcada com GFP e folha de *B. decumbens* cv. Basilisk (em baixo à esquerda), e pelo radicular de *P. atratum* cv. Pojuca (em baixo à direita). As setas indicam as células bacterianas, marcadas em verde.

Conclusão

A metodologia adaptada descrita neste documento permite a eficiente desinfestação de sementes de *Brachiaria* e *Paspalum* e, conseqüentemente, a realização de estudos de interação entre a bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense* e as referidas gramíneas em condições livres de outros microrganismos. O procedimento tem auxiliado as pesquisas que visam elucidar como ocorre a comunicação molecular entre a bactéria e as plantas, através de análises de sequenciamento massivo de RNA (“RNA-Seq”), informações estas que serão base para o desenvolvimento de inoculantes destas gramíneas de pastagens e, possivelmente, de outras plantas da família *Poaceae*.

Referências bibliográficas

- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 549-579, 2005.
- BODDEY, R. M.; CHALK, P. M.; VICTORIA, R.; MATSUI, E. The ^{15}N isotope dilution technique applied to the estimation of biological nitrogen fixation associated with *Paspalum notatum* cv. Batatais in the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 15, n. 1, p. 25-32, 1983.
- BODDEY, R. M.; CHALK, P. M.; VICTORIA, R. L.; MATSUI, E.; DOBEREINER, J. The use of the ^{15}N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv. batatais. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 1036-1045, 1983.
- BODDEY, R. M.; VICTORIA, R. L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ^{15}N labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**, v. 90, p. 265-292, 1986.
- BOVO, O. A.; MROGINSKI, L. A. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured mature and immature embryos of *Paspalum notatum* (*Gramineae*). **Plant Science**, v. 65, n. 2, p. 217-223, 1989.
- CABRAL, G. B.; CARNEIRO, V. T. de C.; LACERDA, A. L.; VALLE, C. B. do; MARTINELLI, A. P.; DUSI, D. M. de A. Somatic embryogenesis and organogenesis in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 107, p. 271-282, 2011.
- DE POLLI, H.; MATSUI, E.; DOBEREINER, J.; SALATI, E. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by $^{15}\text{N}_2$ incorporation. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 9, n. 2, p. 119-123, 1977.
- DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 357-365, 1966.

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

GERMAIN, R.; EVRARD, C. Un nouveau *Brachiaria* de l'est du Congo Belge. **Bulletin du Jardin Botanique de l'Etat, Bruxelles / Bulletin van den Rijksplantentuin**, v. 23, n. 3/4, p. 373–377, 1953.

GUIMARÃES, S. L.; SANTOS, C. S. A. dos; SILVA, E. M. B.; POLIZEL, A. C.; BATISTA, E. R. Nutritional characteristics of marandu grass (*Brachiaria brizantha* cv. marandu) subjected to inoculation with associative diazotrophic bacteria. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 24, p. 873-882, 2016.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular - California Agricultural Experiment Station**, v. 347, 1950.

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

KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P. de. **Cultivo do capim Pojuca**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2001. 2 p. (Embrapa Cerrados. Recomendação Técnica, 50).

KARMOUCHE, P. J. P. S.; VERZIGNASSI, J. R.; FERNANDES, C. D.; MATTA, F. de P.; ROCHA, J. E. da S.; LIBORIO, C. B. 5; LIMA, N. D.; MONTEIRO, L. C.; BENTEO, G. L.; VIDA, R. M.; JESUS, L. de; CORADO, H. S. Qualidade fisiológica de sementes de *Paspallum regnellii* cv. BRS Guará. In: JORNADA CIENTÍFICA EMBRAPA GADO DE CORTE, 11., 2015, Campo Grande, MS. **Anais...** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2015. 114 p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 213). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/158060/1/Qualidade-fisiologica-de-sementes.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2020.

LI, X. GENG, X.; XIE, R.; FU, L. JIANG, J.; AGO, L. SUN, J. The endophytic bacteria isolated from elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schumach) promote plant growth and enhance salt tolerance of Hybrid Pennisetum. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 190, 2016.

MAROUSKY, F. J.; WEST, S. H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured mature caryopses of bahiagrass (*Paspalum notatum* Flugge). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 20, n. 2, p. 125-129, 1990.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NUNES, S. G.; BOOCK, A.; PENTEADO, M. I. de O.; GOMES, D. T. *Brachiaria brizantha* cv. marandu. Campo Grande, MS: EMBRAPA-CNPGC, 1984. 31 p. (EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 21).

PRAIN, D. **Flora of tropical Africa**. London: L. Reeve & Co, 1919. v. 9, part 2.

QUESENBERRY, K. H.; DAMPIER, J. M.; LEE, Y. Y.; SMITH, R. L.; ACUÑA, C. A. Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. **Euphytica**, v. 175, n. 1, p. 43-50, 2010.

RAMOS, A. K. B.; LEITE, G. G.; FERNANDES, F. D.; VILELA, L.; BARCELLOS, A. de O.; FRANCO, G. L. **Uso e manejo de pastagens de capim Pojuca**: origem, adaptação e características gerais. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 7 p. (Embrapa Cerrados. Circular Técnica, 21).

REIS, V. M.; REIS JÚNIOR, F. B. dos; QUESADA, D. M.; OLIVEIRA, O. C. de; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation associated with tropical pasture grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, n. 9, p. 837-844, 2001.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, v. 12, n. 1-2, p. 32, 1986.

VALLE, C. B. do; EUCLIDES, V. P. B.; MONTAGNER, D. B.; FERNANDES, C. D.; MACEDO, M. C. M.; VERZIGNASSI, J. R.; MACHADO, L. A. Z. BRS Paiaguás: A new *Brachiaria* (*Urochloa*) cultivar for tropical pastures in Brazil. **Tropical Grasslands - Forrajes Tropicales**, v. 1, p. 121-122, 2013.

VALLE, C. B. do; EUCLIDES, V. P. B.; MONTAGNER, D. B.; VALERIO, J. R.; MENDES-BONATTO, A. B.; VERZIGNASSI, J. R.; TORRES, F. Z. V.; MACEDO, M. C. M.; FERNANDES, C. D.; BARRIOS, S. C. L.; DIAS FILHO, M. B.; MACHADO, L. A. Z.; ZIMMER, A. H. BRS **Ipyporã** ("**belo começo**" em guarani): híbrido de *Brachiaria* da Embrapa. Brasília, DF: Embrapa, 2017. 17 p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado técnico, 137).

VIKRANT; RASHID, A. Direct as well as indirect somatic embryogenesis from immature (unemerged) inflorescence of a minor millet *Paspalum scrobiculatum* L. **Euphytica**, v. 120, n. 2, p. 167-172, 2001.

Embrapa

Agrobiologia

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL