



**OLAVO AUGUSTO ARQUIMED LOPES DE SÁ**

**LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS EM PASTOS  
CONSORCIADOS: MÉTODOS PARA MENSURAR A  
COMPOSIÇÃO BOTÂNICA DA DIETA E DIVERSIDADE E  
EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO EM  
AMENDOIM FORRAGEIRO**

**LAVRAS – MG**

**2017**

**OLAVO AUGUSTO ARQUIMED LOPES DE SÁ**

**LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS EM PASTOS CONSORCIADOS: MÉTODOS PARA  
MENSURAR A COMPOSIÇÃO BOTÂNICA DA DIETA E DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA  
DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO EM AMENDOIM FORRAGEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Zootecnia, área de concentração em  
Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção  
do título de Doutor

Prof. Dr. Daniel Rume Casagrande  
Orientador

Profa. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Lopes de Sá, Olavo Augusto Arquimed.

Leguminosas forrageiras em pastos consorciados : Métodos para mensurar a composição botânica da dieta e diversidade e eficiência de bactérias fixadoras de nitrogênio em amendoim forrageiro / Olavo Augusto Arquimed Lopes de Sá. - 2017.

76 p. : il.

Orientador(a): Daniel Rume Casagrande.

Coorientador(a): Fátima Maria de Souza Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Leguminosas forrageiras. 2. Composição botânica da dieta.  
3. Bactérias fixadoras de nitrogênio. I. Casagrande, Daniel Rume.  
II. Moreira, Fátima Maria de Souza. III. Título.

**OLAVO AUGUSTO ARQUIMED LOPES DE SÁ**

**LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS EM PASTOS CONSORCIADOS: MÉTODOS PARA  
MENSURAR A COMPOSIÇÃO BOTÂNICA DA DIETA E DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA  
DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO EM AMENDOIM FORRAGEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Zootecnia, área de concentração em  
Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção  
do título de Doutor

APROVADO em 15 de setembro de 2017

Profa. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira (UFLA)

Prof. Dr. José Carlos Batista Dubeux Júnior (University of Florida, EUA)

Prof. Dr. Mateus Pies Gionbelli (UFLA)

Prof. Dr. Paulo Ricardo Gherardi Hein (UFLA)

Prof. Dr. Daniel Rume Casagrande  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2017**

*A minha família e aos demais que poderão usufruir  
do conteúdo dessa tese. Façam bom proveito!*

***Dedico***

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e Programa de Pós graduação em Zootecnia.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Professor Daniel Casagrande pela orientação, confiança, amizade e por todos os ensinamentos repassados. Lembro, também, dos demais professores da forragem da UFLA, Thiago Bernardes, Márcio Lara e Carla Ávila que contribuíram para construção dos meus conhecimentos. Estendo esses agradecimentos ao professor Antônio Ricardo Evangelista, que me orientou no início da carreira ainda torce por nós.

À Professora Fátima Moreira pela coorientação, pelo apoio, exemplo de mulher comprometida com a ciência, acolhedora e sempre disposta a ajudar.

Ao Professor José Dubeux pela disponibilidade em contribuir como banca da tese e atenção.

Ao Professor Mateus Gionbelli pelos ensinamentos científicos e pela maestria em presidir a CHUMADIGUMA.

Ao Professor Paulo Hein pela suporte técnico nas análises do espectro NIR e por todo tempo dedicado.

Aos meus pais pelo importante apoio, incentivo, por confiarem na minha responsabilidade e capacidade e por sempre estarem ao meu lado. Ao Banja, meu irmão, pela grande amizade.

Aos meus avós, em especial meu avô Antônio, pelo constante apoio, exemplo de honestidade, trabalho, inteligência e pelos ensinamentos.

À Rafaela, minha noiva, que sempre esteve junto a mim, dando carinho, amor, me apoiando, corrigindo minha escrita e não medindo forças pra que eu concluísse todas minhas etapas com êxito! Pra você, qualquer palavra seria pouca coisa para descrever o que sinto! Te amo!

Aos meus irmãos da família República Bendito Grau que sempre estão presentes.

Aos amigos que construí durante os 11 anos participando do Núcleo de Estudos em Forragicultura e Pastagens – NEFOR, pela importante ajuda na condução do experimento, sem citar nomes, pois a participação e auxílio de todo grupo tanto na coleta de dados, como nos momentos de confraternização foi muito importante.

Ao Borginho, Adeílson e Nicinha (Nepomuceno) que ajudaram com o pessoal de campo e cedendo material experimental.

Aos demais amigos e colegas de Montes Claros, que, por alguns momentos, fizeram-me lembrar que existe muito mais além da ciência e do dia a dia de Lavras.

Agradeço a Claudia, da CEPLAC, pelo auxílio ao fornecer material experimental e nas visitas à Lavras. Ao Robert Boddey, da EMBRAPA Agrobiologia, pelo auxílio na interpretação e condução das análises de abundância isotópica de  $^{13}\text{C}$  do material experimental.

Muito obrigado a todos!

## Sumário

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>11</b>
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b> .....	<b>14</b>
<b>ARTIGO 1 - MÉTODOS DE ESTIMAÇÃO DO CONSUMO DE GRAMÍNEAS E LEGUMINOSAS EM BOVINOS</b> .....	<b>15</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>
<b>ARTIGO 2 - ESTIRPES DE <i>Bradyrhizobium</i> SÃO MICROSIMBIONTES DE <i>Arachis pintoii</i> EM DUAS CONDIÇÕES EDÁFICAS E CLIMÁTICAS</b> .....	<b>50</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>52</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>53</b>
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>58</b>
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>68</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>73</b>

## **PRIMEIRA PARTE – INTRODUÇÃO GERAL**

## INTRODUÇÃO

Incrementar e otimizar o uso de leguminosas em pastagens pode ser uma alternativa para produzir de maneira mais sustentável no ambiente agropecuário. O aumento da produtividade em sistemas pastoris passa, necessariamente, pelo uso de fontes de nitrogênio (N), que aceleram o crescimento e formação de novos tecidos das plantas (NASSIRI & ELGERSMA, 2002). Porém, o valor dos adubos nitrogenados está cada vez mais oneroso e o processo industrial para sua fabricação requer elevado custo energético (KOZIOSKI & CIOCCA, 2000).

No contexto de mudanças climáticas, o governo brasileiro objetivou reduzir as emissões de gases de efeito estufa (GEE) entre 36,1% a 38,9%, baseada nas emissões projetadas para 2020 (3.236 milhões de toneladas de equivalente CO<sub>2</sub>). Com relação ao setor agrícola, a expectativa é para reduzir 730 milhões de toneladas de equivalente CO<sub>2</sub> para 2020. Uma das ações envolvidas é a expansão da fixação biológica de nitrogênio (FBN) para 5,5 milhões de hectares de área cultivada para substituir o uso de fertilizantes nitrogenados (BRASIL, 2010). Entretanto, para culturas as quais não é possível depender totalmente da FBN, o uso de leguminosas é uma alternativa para substituir ou suplementar a adubação nitrogenada (VAILLANCOURT et al., 2017).

Algumas bactérias tem capacidade de associar-se com as leguminosas e estabelecer uma relação de simbiose, a FBN. Nesse processo, as bactérias fazem a captura do N atmosférico, por meio da enzima nitrogenase, transformando-o numa forma assimilável pelas plantas. Como é um processo realizado por organismos vivos, a FBN pode ter maior ou menor eficiência, variando em função de características edáficas, especificidade planta-simbionte, características e espécie da bactéria, entre outros (FERREIRA et al., 2016; ULZEN et al., 2016).

O *Arachis pintoi* (amendoim forrageiro) é uma das leguminosas mais promissoras para o manejo em consórcio com gramíneas em regiões de clima tropical, devido ao seu maior valor nutritivo e tolerância a desfolhação (FERNANDES et al., 2013; TAMELE et al., 2017). Não foram encontrados estudos sobre a diversidade de microssimbiontes nos nódulos de amendoim forrageiro. Atualmente, a identificação das bactérias é possível pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e outros genes mais específicos (housekeeping *atpD*, *dnak*, *glnII*, *recA*, *rpoB* e *gyrB*) (WILLEMS et al., 2001; DELAMUTA et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2015; RIBEIRO et al., 2015). Essas tecnologias mais recentes, consistem em importantes ferramentas que podem auxiliar no processo de seleção de estirpes mais eficientes em fixar o N<sub>2</sub> atmosférico, resultando num incremento do potencial produtivo do sistema e aporte de N no solo.

Além das diretrizes já comentadas, a otimização na produção e uso de leguminosas forrageiras em pastagens consorciadas pode ocorrer, também, em função da melhor utilização dos recursos disponíveis. Para isso, é necessário melhorar a compreensão dos processos de ciclagem de nutrientes, ingestão de forragem e excreção de nutrientes via fezes e urina, uma vez que os sistemas pastoris são formados pelos componentes Solo-Planta-Animal (BODDEY et al., 2004). Nesse contexto, ter conhecimento sobre as respostas de bovinos em pastagens requer a utilização de métodos validados e eficientes em prever os parâmetros de consumo.

Em virtude da grande variabilidade de resultados encontrados na literatura utilizando indicadores, é necessário cuidado na preparação de amostras e nas técnicas de análise (FERREIRA et al., 2009). As fibras indigestíveis e a digestibilidade das plantas forrageiras tem sido os marcadores internos mais utilizadas para estimar o consumo de matéria seca (CMS) em pastagens, associado a um marcador externo, para quantificar a produção fecal (LEE & HRISTOV, 2013; HELLWING et al., 2015; REIS et al., 2017). Segundo Detmann et al. (2004) entre os métodos existentes, destaca-se a estimativa do potencial de degradação da fibra em detergente neutro (FDN), expresso complementarmente como sua fração indigestível, ou FDNi. Esta porção é empregada como base para estimativa da digestão efetiva dos componentes fibrosos, sendo, no entanto, seu estudo isolado preponderante ao entendimento dos efeitos de repleção física ao ambiente ruminal (HARPER & McNEILL, 2015; KRÄMER-SCHMID et al., 2016).

Quando se trata de produção a pasto, os métodos mais usuais (marcadores internos e externos) geram estimativas acerca do consumo total dos animais, porém, quando nos deparamos com pastos consorciados, a dificuldade maior é saber o que foi ingerido, ou seja, a composição botânica da dieta. Atualmente, as técnicas mais utilizadas para prever a proporção de gramíneas e leguminosas ingeridas são por meio de isótopos de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ ) e alcanos (GARCIA et al., 2000; MACHADO et al., 2013), porém os procedimentos para realização dessas análises são onerosos e demandam tempo.

A tecnologia da espectroscopia do infravermelho próximo (NIRS), é um método mais recente e é capaz de caracterizar grande parte dos materiais biológicos, além disso as análises são realizadas de maneira rápida e não destrutiva (DECRUYENAERE et al., 2009; RESTAINO et al., 2009). Apesar dessa técnica ter grande potencial e ser altamente promissora, é imprescindível desenvolver modelos matemáticos para validar o uso da espectroscopia NIR na estimativa da composição botânica da dieta (LYONS & STUTH, 1992).

Dessa maneira, objetivou-se através dos capítulos escritos nessa tese: Estudar e desenvolver técnicas capazes de estimar a ingestão e proporção de gramíneas e leguminosas na dieta de bovinos com análise nas fezes por meio da espectroscopia NIR e abundância do carbono 13. Descrever a diversidade genética e eficiência de bactérias isoladas de nódulos de *Arachis pintoi* estabelecidos em áreas de pastagens consorciadas com gramíneas.

## REFERÊNCIAS

- BODDEY, R.M.; MACEDO, R.; TARRÉ, R.M.; FERREIRA, E.; DE OLIVEIRA, O.C.; REZENDE, C.P.; CANTARUTTI, R.B.; PEREIRA, J.M.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Nitrogen cycling in *Brachiaria* pastures: the key to understanding the process of pasture decline. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. 103: 389-403, 2004.
- BRASIL. Decreto 7.390, de 9 de dezembro de 2010. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2010/Decreto/D7390.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2010/Decreto/D7390.htm)>. Acesso em: 22/10/2017.
- DECRUYENAERE, V.; LECOMTE, P.; DEMARQUILLY, C.; AUFRERE, J.; DARDENNE, P.; STILMANT, D.; BULDGEN, A. Evaluation of green forage intake and digestibility in ruminants using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS): Developing a global calibration. **Animal Feed Science and Technology**, 148: 138–156, 2009.
- DELAMUTA, J.R.M.; RIBEIRO, R.A.; MENNA, P.; BANGEL, E.V.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. **Braz. J. Microbiol.** v. 43, p. 698–710, 2012.
- DETMANN, E.; ZERVOUDAKIS, J.T.; CABRAL, L.S.; ROCHA JÚNIOR, V.R.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A.C.; PONCIANO, N.J.; FERNANDES, A.M. Validação de Equações Preditivas da Fração Indigestível da Fibra em Detergente Neutro em Gramíneas Tropicais. **R. Bras. Zootec.**, v.33, n.6, p.1866-1875, 2004 (Supl. 1).
- DOVE, H. & MAYES, R. W. Plant wax components: a new approach to estimating intake and diet composition in herbivores. **Journal of Nutrition**, 126, 13±26, 1996.
- FERNANDES, G.M.; POSSENTI, R.A.; MATTOS, W.T.; SCHAMMASS, E.A. and FERRARI JUNIOR, E. In situ degradability and selected ruminal constituents of sheep fed with peanut forage hay. **Archives of Animal Nutrition**, Vol. 67, No. 5, 393–405, 2013. <http://dx.doi.org/10.1080/1745039X.2013.834581>
- FERREIRA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; MARCONDES, M.I.; PAIXÃO, M.L.; PAULINO, M.F.; VALADARES, R.F.D. Avaliação de indicadores em estudos com ruminantes: digestibilidade. **R. Bras. Zootec.**, v.38, n.8, p.1568-1573, 2009.
- FERREIRA, T.C.; AGUILAR, J.V.; SOUZA, L.A.; JUSTINO, G.C.; AGUIAR, L.F.; CAMARGOS, L.S. pH effects on nodulation and biological nitrogen fixation in *Calopogonium mucunoides*. **Braz. J. Bot.** 39(4):1015–1020, 2016. DOI 10.1007/s40415-016-0300-0

- GARCIA, S.C.; HOLMES, C.W.; HODGSON, J. MACDONALD, A. The combination of the n-alkanes and  $^{13}\text{C}$  techniques to estimate individual dry matter intakes of herbage and maize silage by grazing dairy cows. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, 135, 47±55, 2000.
- GUIMARÃES, A.A.; FLORENTINO, L.A.; ALMEIDA, K.A.; LEBBE, L.; SILVA, K.B.; WILLEMS, A.; MOREIRA, F.M.S. High diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from several legume species and land uses in Brazilian tropical ecosystems. **Syst Appl Microbiol**, v. 38, p. 433–441, 2015.
- HARPER, K.J.; MCNEILL, D.M. The Role of iNDF in the Regulation of Feed Intake and the Importance of Its Assessment in Subtropical Ruminant Systems (the Role of iNDF in the Regulation of Forage Intake). **Agriculture**, 5(3), 778-790; 2015. doi:10.3390/agriculture5030778
- HELLWING, A.L.F.; LUND, P.; WEISBJERG, M.R.; OUDSHOORN, F.W.; MUNKSGAARD, L.; KRISTENSEN, T. Comparison of methods for estimating herbage intake in grazing dairy cows. **Livestock Science**, 176, 61–74, 2015.
- KOZIOSKI, G.V.; CIOCCA, M.L.S. Energia e sustentabilidade em agroecossistemas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n.4, p.737-745, 2000
- KRÄMER-SCHMID, M.; LUND, P.; WEISBJERG, M.R. Importance of NDF digestibility of whole crop maize silage for dry matter intake and milk production in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, 219, 68–76, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.06.007>
- LEE, C.; HRISTOV, A.N. Evaluation of acid-insoluble ash and indigestible neutral detergent fiber as total-tract digestibility markers in dairy cows fed corn silage-based diets. **Journal of Dairy Science**, Vol. 96 No. 8, 2013. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-6442>
- LYONS, R.K; STUTH, J.W. Fecal NIRS equations for predicting diet quality of free-ranging cattle. **J. Range Manage**, 45:230-244, May 1992.
- MACHADO, C.F.; MORRIS, S.T.; HODGSON, J.; BERGER, H.; AUZA, N.J. Effect of maize grain and herbage allowance on estimated metabolizable energy intake and animal performance in beef cattle finishing systems. **Grass and Forage Science**, 61, 385–397, 2006.
- NASSIRI, M.; ELGERSMA, A. Effects of nitrogen on leaves, dry matter allocation and regrowth dynamics in *Trifolium repens* L. and *Lolium perenne* L. in pure and mixed swards. **Plant and Soil**, 246: 107–121, 2002.
- REIS, M.J.; SANTOS, S.A.; PRATES, L.L.; DETMANN, E.; CARVALHO, G.G.P.; SANTOS, A.C.S.; RUFINO, L.M.; MARIZA, L.D.; NERI, F.; COSTA, E. Comparing sheep and cattle to quantify internal markers in tropical feeds using in situ ruminal incubation. **Animal Feed Science and Technology**, 232, 139–147, 2017.
- RESTAINO, E.A.; FERNÁNDEZ, E.G.; MANNA, A.; COZZOLINO, D. Prediction of the nutritive value of pasture silage by near infrared spectroscopy (NIRS). **Chilean J. Agric. Res.**, v.69 - nº 4, 2009
- RIBEIRO, P.R.A.; SANTOS, J.V.; COSTA, E.M.; LEBBEC, L.; ASSIS, E.S.; LOUZADA, M.O.; GUIMARÃES, A.A.; WILLEMS, A.; MOREIRA, F.M.S. Symbiotic efficiency and

genetic diversity of soybean bradyrhizobia in Brazilian soils. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, 212, 85–93, 2015.

TAMELE, O.H., LOPES DE SÁ, O.A.A., BERNARDES, T.F., LARA, M.A.S., CASAGRANDE, D.R. Optimal defoliation management of brachiaria grass–forage peanut for balanced pasture establishment. **Grass and Forage Science**. 00:1–10, 2017. <https://doi.org/10.1111/gfs.12332>

ULZEN, J.; ABAIDOO, R.C.; MENSAH, N.E.; MASSO, C.; ABDELGADIR, A.H. *Bradyrhizobium* Inoculants Enhance Grain Yields of Soybean and Cowpea in Northern Ghana. *Front. Plant Sci.*, 7:1770, 2016. doi: 10.3389/fpls.2016.01770

VAILLANCOURT, M.; CHANTIGNY, M.; PAGEAU, D.; VANASSE, A. Impact of a Clover Cover Crop Combined With Organic or Mineral Fertilizer on Yield and Nitrogen Uptake of Canola. **Canadian Journal of Plant Science**, 2017. <https://doi.org/10.1139/CJPS-2017-0180>.

WILLEMS, A.; DOIGNON-BOURCIER, F.; GORIS, J.; COOPMAN, R.; DE LAJUDIE, P.; DE VOS, P.; GILLIS, M. DNA–DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 1315–1322, 2001.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**

## ARTIGO 1 - MÉTODOS DE ESTIMAÇÃO DO CONSUMO DE GRAMÍNEAS E LEGUMINOSAS EM BOVINOS

### RESUMO

Objetivou-se desenvolver e adequar técnicas capazes de estimar a ingestão e proporção de gramíneas e leguminosas na dieta de bovinos com análise nas fezes por meio do NIRS e abundância do carbono 13. Foram realizados dois experimentos com novilhas da raça Tabapuã confinadas e dispostas em quadrados latinos 4 x 4, com quatro dietas e quatro novilhas, em cada experimento. No primeiro experimento, as dietas tiveram a seguinte composição: 100% *Brachiaria brizantha* (cv. Marandu); 66,7% *B. brizantha* + 33,3% *Arachis pintoii* (cv. Belomonte); 33,3% *B. brizantha* + 66,7% *A. pintoii*; e 100% *A. pintoii*. No outro experimento, a seguinte dieta foi utilizada: 100% *Cynodon dactylon* (cv. Coast-cross); 66,7% *C. dactylon* + 33,3% *Medicago sativa* (cv. Crioula); 33,3% *C. dactylon* + 66,7% *M. sativa*; e 100% *M. sativa*. O período experimental foi de 15 dias, sendo 10 dias de adaptação a dieta e 5 dias de coleta. A dieta foi fornecida duas vezes ao dia (8 e 17 h), e as sobras recolhidas diariamente. Para obtenção das fibras indigestíveis, os fenos e as fezes foram incubados e tratados com solução de detergente neutro (FDNi) ou ácido (FDAi). Foi determinado a abundância isotópica <sup>13</sup>C nas fezes secas e moídas (FSM), FDNi e FDAi das fezes. O consumo de matéria seca (CMS) e composição botânica da dieta foram estimados através do FDNi e FDAi nas fezes e pela técnica da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) dos fenos. As comparações entre os valores observados e estimados da composição botânica foram realizadas em função do quadrado médio do erro da predição (QMEP) e da partição das fontes de variação do QMEP. Para as análises do espectro NIR, somente a FDNi e FDAi das fezes foram avaliadas. Após o tratamento dos espectros, foram realizadas análises dos componentes principais (PCA), calibração de modelos, validação cruzada completa (*leave one out*) e validação externa (*test set*). Foram utilizados modelos de identidade ( $Y = \beta_0 + \beta_1 x$ ; com as hipóteses conjuntas:  $H_0: \beta_0 = 0$  e  $H_0: \beta_1 = 1$ ) para validação dos modelos. As análises foram realizadas por meio do procedimento REG do SAS®. A FDNi e FDAi da dieta ingerida não foi diferente da excretada nas fezes. O CMS total observado não diferiu do estimado por meio das técnicas de FDNi, FDAi e DIVMS dos fenos de gramíneas e leguminosas. Em função do QMEP, as fibras indigestíveis apresentaram melhores predições que a DIVMS para estimar a composição botânica em dietas de gramíneas e leguminosas. O modelo matemático de suavização no espectro NIR na FDNi das fezes de dietas com *Brachiaria* e amendoim forrageiro, e, o autoscale no espectro NIR na FDNi das fezes de dietas com Coast-cross e alfafa foram capazes de prever a proporção de gramíneas e leguminosas nas fezes. Pode-se concluir que pela análise do isótopo <sup>13</sup>C na FDNi das fezes, é possível estimar a composição botânica da dieta ingerida em pastagens consorciadas entre gramíneas e leguminosas. O espectro NIR é capaz de prever com eficiência a composição botânica das fezes de bovinos.

**Palavras-chave:** Consórcio. Composição botânica da dieta. Isótopos <sup>13</sup>C. NIRS.

## ABSTRACT

The objective was to develop and adapt techniques capable of estimating the intake and proportion of grasses and legumes in the diet of cattle with faecal analysis using NIRS and abundance of carbon 13. Two experiments were carried out with Tabapuã heifers confined and arranged in square latin 4 x 4, with four diets and four heifers, in each experiment. In the first experiment, the diets were the following: 100% *Brachiaria brizantha* (cv. Marandu); 66.7% *B. brizantha* + 33.3% *Arachis pintoi* (Belomonte cv); 33.3% *B. brizantha* + 66.7% *A. pintoi*; and 100% *A. pintoi*. In the other experiment, the diets were: 100% *Cynodon dactylon* (cv. Coast-cross); 66.7% *C. dactylon* + 33.3% *Medicago sativa* (cv. Crioula); 33.3% *C. dactylon* + 66.7% *M. sativa*; and 100% *M. sativa*. The experimental period was 15 days, being 10 days of adaptation to diet and 5 days of collection. The diet was offered twice a day (8 and 17 h), and the leftovers collected daily. In order to obtain the indigestible fibers, the hays and feces were incubated and treated with neutral detergent solution (FDNi) or acid (FDAi). <sup>13</sup>C isotopic abundance was determined in the ground dry faeces (FSM), FDNi and FDAi of faeces. The dry matter intake (CMS) and the botanical composition of the diet were estimated through FDNi and FDAi in the feces and by the in vitro dry matter digestion (DIVMS) of the hays. The comparisons between the observed and estimated values of the botanical composition were performed in the function of the mean square of the prediction error (QMEP) and the partition of the sources of variation of the QMEP. For analyzes of the NIR spectrum, only one FDNi and FDAi of feces were evaluated. After the treatment of the spectra, main component analyzes (PCA), calibration of models, complete cross validation (*leave one out*) and external validation (*test set*) were performed. Identity models were used ( $Y = \beta_0 + \beta_1.x$ , with the following joint hypotheses:  $H_0: \beta_0 = 0$  and  $H_0: \beta_1 = 1$ ) for validation of the models. Analyzes were performed using the SAS® REG procedure. The FDNi and FDAi of the ingested diet was not different from that excreted in the faeces. The total CMS observed did not differ from that estimated using the techniques of FDNi, FDAi and DIVMS of grass and legume hay. As a function of QMEP, as indigestible fibers presented better estimates compared to DIVMS to predicting the botanical composition in grass and legume diets. The mathematical model of smoothing in the NIR spectra in the FDNi of the feces of diets with *Brachiaria* and forage peanut, and autoscale in the NIR spectrum in the FDNi of the feces of Coast-cross and alfalfa diets were capable of predicting the proportion of grasses and legumes in the feces. It can be concluded that by analyzing the <sup>13</sup>C isotope in the FDNi of the feces, it is possible to estimate the botanical composition of the diet ingested in pastures intercropped between grasses and legumes. The NIR spectrum is able to predict the efficiency of the botanical composition of cattle faeces.

**Keywords:** Mixed pastures. Botanical composition of the diet. Isotopes <sup>13</sup>C. NIRS.

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de indicadores para estimar o consumo de ruminantes em pastos em monocultivo são conhecidos e bastante replicados mundialmente, uma vez que, nesse caso, a dieta é composta, exclusivamente, por uma espécie forrageira. Marcadores externos, como óxidos de titânio e cromo dosados oralmente em bovinos e ovinos, têm sido usados pra estimar produção fecal (BERCHIELLI et al., 2005; CARVALHO et al., 2007). Marcadores internos, como fibras em detergentes neutro (FDNi) e ácido (FDAi) indigestíveis das dietas, são utilizados para estimar o consumo de ruminantes em pastagens, porém elas não são capazes de quantificar a composição botânica da dieta de maneira direta, sendo necessário outras análises. Para mensuração direta dos componentes ingeridos, podem ser utilizados animais fistulados no esôfago, todavia o uso desse método é limitado pela necessidade de intervenção cirúrgica e autorização por comitês de ética para uso de animais.

Em função de poucas técnicas disponíveis, ainda é um limitante mensurar a composição botânica da dieta de bovinos e o consumo de gramíneas e leguminosas em pastos consorciados. Tais estudos são necessários para entender a contribuição desses alimentos em atributos nutricionais e digestivos. A técnica de abundância do carbono 13 para diferenciar material originado de plantas C3 e C4, tem fornecido estimativas acuradas sobre a proporção desses componentes nas fezes (AROEIRA et al., 2005; MACEDO et al., 2010). A avaliação da composição botânica da dieta ingerida é importante para determinar a eficiência de utilização dos componentes da gramínea e leguminosa, principalmente, em estudos de ciclagem de nutrientes (BODDEY et al., 2004). Macedo et al. (2010) utilizaram a digestibilidade *in vitro* da gramínea e leguminosa na dieta, aliado a técnica de abundância do carbono 13 nas fezes para estimar a ingestão e composição botânica da dieta. Entretanto a análise do 13C sobre as fezes sem nenhum tipo de processamento pode sofrer contaminação de componentes oriundos da descamação do epitélio ruminal, formação de componentes endógenos ou presença de microrganismos que atuam na fermentação ruminal. Além desse empecilho para analisar esse tipo de amostra, essa técnica é onerosa, trabalhosa e de difícil acesso, e o processamento das amostras para essas avaliações demanda tempo. Uma alternativa para discriminar componentes oriundos de plantas C3 e C4 é por meio da fração indigestível de gramíneas e leguminosas nas fezes.

A espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) tem potencial para caracterizar materiais biológicos, de maneira rápida e não destrutiva. Trabalhos recentes têm demonstrado a capacidade dessa técnica em descrever atributos de fezes de herbívoros e correlaciona-las com a composição da dieta (CASASUS & ALBANELL, 2014). Após a estimativa da produção fecal,

pode-se quantificar o teor de fibras indigestíveis na dieta e nas fezes, e, consecutivamente, pelo espectro NIR das fezes identificar qual proporção é originado da gramínea ou leguminosa. A coleta fecal possui vantagens, pois podem ser encontradas e amostradas com certa regularidade, sem necessidade de interferir no comportamento animal e em condições adversas de manejo. Porém, para que seja possível utilizar a espectroscopia no NIR para avaliações quantitativas e qualitativas das dietas ingeridas a partir de espectros das fezes, é necessário estabelecer modelos multivariados com base em resultados precisos. Estudos utilizando NIRS tem fornecido informações qualitativas e quantitativas da dieta ingerida a partir das fezes, desde que a variável estudada tenha uma robusta e precisa curva de calibração (DIXON & COATES, 2015).

É possível estimar o CMS através de marcadores internos das forrageiras e, também, a proporção de gramíneas e leguminosas na dieta de bovinos por meio das análises da abundância do carbono 13 e da espectroscopia no NIR nas fibras indigestíveis das fezes. Definir e padronizar técnicas capazes de estimar a ingestão e proporção de gramíneas e leguminosas na dieta de bovinos com análise nas fezes por meio da espectroscopia no NIR e abundância do carbono 13.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO E ANIMAIS**

Os experimentos foram conduzidos no setor de bovinocultura de corte da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais, Brasil (21°14' S e 45°00' W; 918 metros acima do nível do mar) e iniciado em julho de 2015. O clima do local é subtropical úmido mesotermal com invernos secos (Classificação climática de Köppen e Geiger: Cwa) (SÁ JUNIOR et al., 2012).

Oito novilhas da raça Tabapuã com peso inicial de  $333 \pm 33$  Kg, foram mantidas em baias individuais (1,2 x 4,0 m) com água *ad libitum* e sal mineral fornecido no cocho. Os animais foram, previamente, tratadas contra endo e ectoparasitas e pesados em jejum no início e final de cada período experimental.

### **4.2 TRATAMENTOS E MANEJO ALIMENTAR**

Dois experimentos compostos por quadrados latinos 4 x 4, com quatro dietas e quatro novilhas em cada experimento, foram conduzidos, simultaneamente. Os tratamentos foram proporções de feno picado de gramíneas e leguminosas fornecidas no cocho. No primeiro experimento, as dietas tiveram a seguinte composição, com base na matéria seca (MS): (1) 100% *Brachiaria brizantha* (cv. Marandu); (2) 66,7% *B. brizantha* + 33,3% *Arachis pintoi* (cv. Belomonte); (3) 33,3% *B. brizantha* + 66,7% *A. pintoi*; e (4) 100% *A. pintoi*. No outro

experimento, a seguinte dieta foi fornecida: (1) 100% *Cynodon dactylon* (L.) Pers (cv. Coast-cross); (2) 66,7% *C. dactylon* + 33,3% *Medicago sativa* (cv. Crioula); (3) 33,3% *C. dactylon* + 66,7% *M. sativa*; e (4) 100% *M. sativa*.

A dieta foi fornecida duas vezes ao dia (8 e 17 h) e o consumo de matéria seca (CMS) das novilhas foi estimado em 1,5% do peso corporal no início de cada período. A quantidade ofertada do feno foi ajustada diariamente para garantir que o animal consumisse toda forragem oferecida (alimentação restrita). Contudo, se houvessem sobras, as mesmas foram pesadas, diariamente, pela manhã e posteriormente analisadas.

O período experimental foi de 15 dias, sendo 10 dias de adaptação a dieta e 5 dias de coleta. Para representar a composição bromatológica dos fenos fornecidos (Braquiária, amendoim forrageiro, Coast-cross e alfafa), foram coletadas amostras nos dias 2, 5, 8, 11 e 14 de cada período experimental.

### **4.3 COLETA DAS FEZES**

A coleta total de fezes foi realizada nos últimos 5 dias do período, com turnos de 6 em 6 horas. Ao término de cada turno, as fezes frescas excretadas por cada animal foram pesadas e uma amostra foi colhida para quantificar o teor de MS e produção fecal num período de 24 horas. Foi utilizada estufa de circulação forçada de ar 55°C durante 72 horas ou até atingir peso constante para secagem das fezes. Posteriormente, foram moídas em moinho tipo Willey em peneira de 1 ou 2 mm, dependendo da finalidade de uso da amostra (análise bromatológica ou incubação ruminal, respectivamente). As análises laboratoriais foram executadas com amostras representativas (amostras compostas) dos períodos experimentais. Amostras compostas foram constituídas pela média ponderada da produção de MS fecal diária dos animais nos dias de coleta.

### **4.4 AVALIAÇÕES**

#### **4.4.1 ANÁLISES BROMATOLÓGICAS DOS FENOS E SOBRAS**

As amostras dos fenos oferecidos aos animais foram submetidas às análises de MS, matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE), proteína bruta (PB), conforme a AOAC (1990). Dos constituintes da fração fibrosa, analisaram-se os teores de fibra em detergente neutro (FDN) (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991), fibra em detergente ácido (FDA) pelo método proposto por Goering e Van Soest (1970). Para determinação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) foi empregada a técnica de Tilley & Terry (1963), adaptada para o uso do rúmen artificial, desenvolvida por ANKOM®, conforme descrito por Holden (1999). Para determinar a DIVMS, foram colocados, em cada compartimento (jarro de vidro), no Daisy II

da ANKOM®, 250 mg de amostras da forragem, em sacos de tecido não-tecido (TNT), lacrados a quente, com solução tampão e líquido ruminal.

Para obtenção das fibras indigestíveis, as amostras dos fenos e das sobras foram moídos em peneira de 2 mm (CASALI et al., 2008; VALENTE et al., 2011; VALENTE et al., 2015) e incubados no rúmen (*in situ*) de novilhas Tabapuã por 288 horas (HUHTANEN et al., 1994; KRIZSAN et al., 2012; KRIZSAN & HUHTANEN, 2013) utilizando sacos de TNT, na proporção de 20 mg de MS de amostra/cm<sup>2</sup> de superfície (NOCEK, 1988). Após a retirada dos sacos do rúmen, os mesmos foram lavados com água corrente até total clareamento e, imediatamente, transferidos para estufa de ventilação forçada (55°C), onde foram mantidos por 72 horas. Posteriormente, para obtenção da fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), os sacos foram tratados com solução de detergente neutro (MERTENS, 2002) por 40 minutos em autoclave à pressão de 1,1 kg cm<sup>-2</sup> e 110°C (SENGER et al., 2008). Depois foram lavados com água quente e acetona para retirada do detergente e secos em estufa a 105°C por 12 horas, e acondicionados em dessecador para pesagem. Os procedimentos descrito para quantificação dos teores de FDNi foi novamente realizado, substituindo-se, contudo, a solução de detergente neutro por solução de detergente ácido, a fim de estimar a fibra em detergente ácido indigestível (FDAi). Antes da incubação ruminal, os sacos de TNT vazios foram lavados em solução com detergente e água quente (80 °C) por 20 minutos. Em seguida, foram imersos em acetona, e levados para estufa a 105°C até secagem e peso constante.

#### **4.4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE FEZES**

Nos dois experimentos, as análises foram realizadas sobre os seguintes materiais: Resíduos das FDNi e FDAi das fezes e fezes secas e moídas (FSM). O procedimento realizado para obtenção das fibras indigestíveis foi idêntico ao descrito para os fenos.

#### **4.4.3 MÉTODOS PARA ESTIMAR A COMPOSIÇÃO BOTÂNICA DA DIETA**

##### **4.4.3.1 ABUNDÂNCIA ISOTÓPICA DO CARBONO 13**

Foi determinado a abundância isotópica <sup>13</sup>C nas FSM, FDNi e FDAi das fezes. Essas amostras foram submetidas a uma moagem ainda mais fina (pulverização) em moinho de rolos similar ao descrito por Arnold e Schepers (2004). No presente trabalho foram pesados cerca de 2,00 mg de cada sub-amostra utilizando-se uma balança de cinco casas decimais (modelo AG 245, Mettler Toledo). As sub-amostras, pesadas e embrulhadas em cápsulas de estanho, foram armazenadas em placa de Elisa, identificadas em formulário próprio, e levadas para análises de delta de <sup>13</sup>C e de <sup>15</sup>N em um espectrômetro de massas de razão isotópica modelo Delta V Advantage, da marca Thermo, acoplado a um analisador elementar automático de C e N total,

modelo Costech ECS 4010, da Costech, localizados no Laboratório John M. Day de Isótopos Estáveis da Embrapa Agrobiologia.

Foi feita análise de abundância do  $^{13}\text{C}$  nas sobras de feno colhidas no cocho. Após a análise, a proporção de gramínea e leguminosa presente nas sobras do cocho foi descontada da quantidade ofertada. Dessa forma, foi possível obter a composição botânica e CMS real da dieta.

Três métodos foram utilizados para estimar o CMS real. No primeiro deles, a análise do isótopo de  $^{13}\text{C}$  estimou a proporção de gramínea e leguminosa nas FSM. Posteriormente, o CMS diário de forragem pelas novilhas foi estimado pela DIVMS e produção fecal de cada um dos fenos da dieta, e foi calculado pela equação:

$$\text{CMS} = \text{produção fecal} / (1 - (\% \text{DIVMS} / 100))$$

Os outros dois métodos utilizaram FDAi e FDNi e se basearam em estimativas de frações indigestíveis no alimento e nas fezes. Após análise da FDNi e FDAi das fezes mensurou-se a proporção de material oriundo de gramíneas e leguminosas por meio da abundância isotópica de  $^{13}\text{C}$ . Por meio da produção total de fezes, sabe-se a quantidade da fração indigestível excretada diariamente. Sendo assim, é possível estimar quanto de cada feno foi consumido pela excreção diária de FDAi ou FDNi de gramínea ou leguminosa, em relação a proporção de FDAi ou FDNi nos fenos.

Após estimar a quantidade de gramínea e leguminosa consumida, conforme descrito acima, foi estimada a proporção de cada uma dessas espécies na dieta total ingerida. As proporções obtidas de cada um desses componentes foram comparadas com as proporções reais de gramíneas e leguminosas ingeridas pelas novilhas. As comparações entre os valores observados e estimados foram realizadas em função da significância da regressão entre dois conjuntos de dados (MAYER, STUART, & SWAIN, 1994), quadrado médio do erro de predição (QMEP) (BIBBY & TOUTENBURG, 1977) e da partição das fontes de variação do QMEP (erro de média, erro aleatório e erro sistemático) (THEIL, 1961). Essas estatísticas foram calculadas utilizando o Model Evaluation System (MES, v.3.0.1, <http://nutritionmodels.tamu.edu/mes.htm>) (TEDESCHI, 2006).

#### **4.4.3.2 ESPECTROMETRIA DO NIR**

##### **AQUISIÇÃO ESPECTRAL**

Um espectrometro FT-NIR (Bruker, modelo MPA) em conjunto a um programa computacional Opus versão 5.5 foi usado no modo reflectância difusa diretamente nas amostras.

A análise espectral foi realizada dentro de uma faixa de 9.000 a 3.600  $\text{cm}^{-1}$  (1.100 a 2.780 nm) e resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$ . Para calibração e validação dos modelos para estimativa da proporção de gramínea e leguminosa nas amostras foi aplicada a seleção de faixas espectrais pelo teste de incerteza de Martens (WESTAD; MARTENS, 2000). Para melhorar a relação sinal/ruído procedeu-se a exclusão do número de ondas de 12000 a 9000  $\text{cm}^{-1}$  (833 a 1100 nm). As amostras anômalas (*outliers*) foram detectadas por meio do gráfico resíduos de *student x leverage*. Cada espectro NIR foi resultado de uma média de 16 leituras, que foram calculadas e comparadas com um padrão (referência banhada a ouro). O espectrômetro foi conectado ao computador que coletou os dados espectrais através do programa OPUS, versão 7.5.

### **ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA**

Análise dos componentes principais (PCA) e a regressão mínimos quadrados parciais (PLS Regression ou PLS-R) foram calculadas por meio do software Chemoface v1.61 (NUNES et al., 2012). A análise dos espectros foi feita utilizando os espectros originais, e tratados com suavização pelo algoritmo *SAVITZKY-GOLAY* (com 15 pontos e polinomial de ordem 2) ou autoscale. As etapas de PCA, calibração de modelos, validação cruzada completa (*leave one out*) e validação externa (*test set*) foram realizados após tratamento dos dados.

A PCA foi usada pra filtrar as principais informações das variáveis analisadas, e explorar a dependência entre o espectro das amostras pelos agrupamentos (*clusters*). Os modelos foram ajustados pelo método PLS - R, que relacionou os dados espectrais obtidos no NIR e as propriedades estudadas. O número de variáveis latentes foi fixado em 14 para todas análises.

Regressões baseadas em PLS-R foram realizadas para estimar valores contínuos em cada uma das quatro categorias: resíduos da FDAi das fezes de dietas de Brachiaria e amendoim forrageiro (FDAi BRAR); resíduos da FDAi das fezes de dietas de Cynodon e alfafa (FDAi CYAL); resíduos da FDNi das fezes de dietas de Brachiaria e amendoim forrageiro (FDNi BRAR); resíduos da FDNi das fezes de dietas de Cynodon e alfafa (FDNi CYAL). Dentro de cada categoria foram realizadas estimativas predizendo as proporções dos componentes oriundos de gramínea ou leguminosa presentes nas amostras. Cada modelo PLS-R foi avaliado pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e erro da raiz do quadrado médio (RMSE), tanto na calibração quanto na validação cruzada.

### **CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO**

Foram utilizados os resíduos de FDNi e FDAi das fezes dos animais que consumiram dietas exclusivas de gramíneas (G) ou leguminosas (L) para calibração dos modelos preditivos com base nos espectros no NIR. Para cada tipo de análise (FDNi e FDAi) das fezes e

combinação de dieta (*Brachiaria* e amendoim forrageiro ou *Cynodon* e alfafa) foi gerado um modelo de calibração. Para cada período experimental foram formadas 11 classes, que corresponderam a amostras de fezes oriundas de animais alimentados por dietas compostas, exclusivamente, de gramíneas ou leguminosas pesadas em diferentes proporções. As classes foram construídas em proporções de 10 em 10%, ou seja, haviam 11 combinações (classes): 100%G e 0%L, 90%G e 10 %L, 80%G e 20%L, sucessivamente, até 0%G e 100%L (Tabela 1). A pesagem foi realizada em balança de precisão com 4 casas de aproximação.

Tabela 1. Preparação das amostras para gerar curva de calibração do modelo

Dieta	Processamento	Período experimental	Classe	Proporção nas amostras	
				Gramínea	Leguminosa
<i>Brachiaria brizantha</i> e <i>Arachis pintoi</i>	Resíduo da FDAi e FDNi das fezes	Período 1 ao 4	1	0%	100%
			2	10%	90%
			3	20%	80%
			4	30%	70%
			5	40%	60%
			6	50%	50%
			7	60%	40%
			8	70%	30%
			9	80%	20%
			10	90%	10%
			11	100%	0%
<i>Cynodon dactylon</i> e <i>Medicago sativa</i>	Resíduo da FDAi e FDNi das fezes	Período 1 ao 4	1	0%	100%
			2	10%	90%
			3	20%	80%
			4	30%	70%
			5	40%	60%
			6	50%	50%
			7	60%	40%
			8	70%	30%
			9	80%	20%
			10	90%	10%
			11	100%	0%

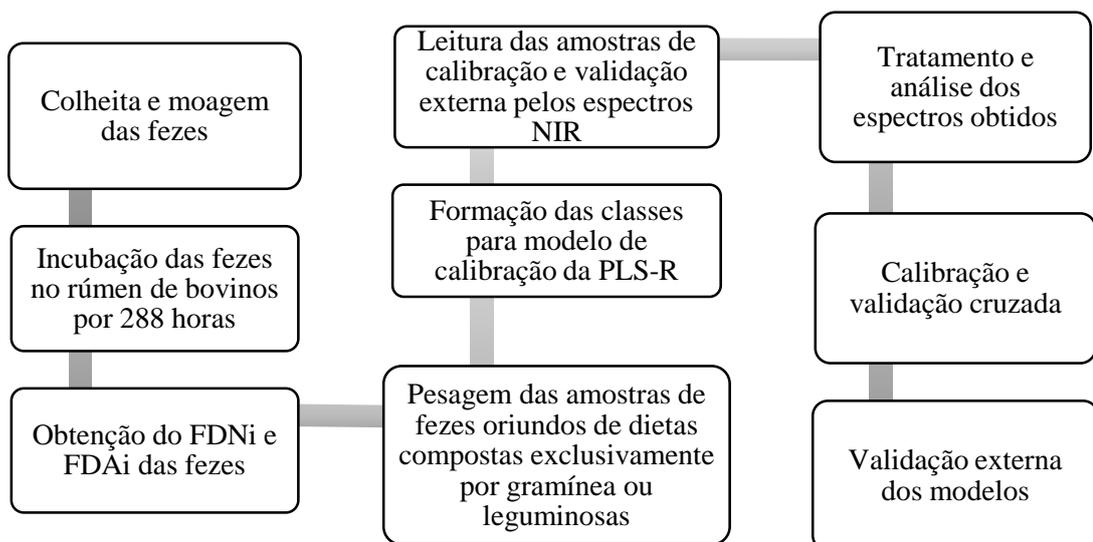
No modelo de calibração, os valores observados foram comparados com os valores estimados pelo espectro NIR por meio de regressões lineares. Os dados espectrais analisados, consistem na média de 3 espectros NIR obtidos em diferentes pontos para cada amostra. Os espectros originais sofreram dois tipos de pré-tratamentos matemáticos dos dados (suavização e *autoscale*) e para cada um deles foram desenvolvidas quatro curvas de calibração (duas dietas e dois processamentos). O modelo de calibração foi composto por 44 dados, uma vez que as amostras oriundas das mesmas dietas experimentais e processamentos foram agrupadas.

Após calibração dos modelos, foram realizadas estimativas para validar a leitura dos espectros NIR nos resíduos de FDNi e FDAi das fezes em relação a composição botânica das amostras. Primeiramente, foi realizada a validação cruzada por PLS - R pelo método randômico a partir do agrupamento de 44 amostras da mesma dieta experimental e processamento.

Os modelos, também, foram submetidos a validação externa utilizando-se 16 amostras de fezes colhidas dos tratamentos experimentais nas duas formas de análises: resíduos de FDNi e FDAi das fezes. As estimativas geradas para proporção de componentes oriundos de gramíneas ou leguminosas foram comparadas com o método de referência (abundância isotópica  $^{13}C$ ).

Foi realizada análise de correlação da proporção de gramínea e leguminosa obtida pelo método padrão (isótopo  $^{13}C$ ) em relação à estimativa gerada pelo método do espectro NIR com as amostras de validação externa. Foram utilizados modelos de identidade conforme proposto por Tedeschi (2006), a 5% probabilidade, para validação dos modelos. Este consiste no ajuste de uma equação de primeiro grau do tipo  $Y = \beta_0 + \beta_1.x$ , com as seguintes hipóteses  $H_0:\beta_0 = 0$  e  $H_0:\beta_1 = 1$ . As análises foram realizadas por meio do procedimento REG do SAS® (SAS, 2002). O protocolo para processamento das amostras e análise dos dados pode ser observado na Figura 1.

Figura 1. Fluxograma com o resumo das etapas realizadas no trabalho.



## 5. RESULTADOS

O CMS e excreção fecal diária das novilhas estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Consumo de matéria seca de forragem e excreção fecal

Dieta	Tratamento	CMS (Kg MS)			Excreção fecal diária (Kg MS)
		Gramínea	Leguminosa	Total	
<i>Cynodon dactylon</i> e <i>Medicago sativa</i>	1	4,992	0,000	4,992	1,997
	2	3,571	1,773	5,343	2,079
	3	1,867	3,708	5,576	2,153
	4	0,000	4,575	4,575	1,814
<i>Brachiaria brizantha</i> e <i>Arachis pintoi</i>	1	4,316	0,000	4,316	1,775
	2	3,065	1,474	4,539	1,820
	3	1,422	2,792	4,214	1,821
	4	0,000	3,709	3,709	1,612

As análises bromatológicas dos fenos utilizados no experimento estão apresentadas na Tabela 3. Os fenos de todas espécies tiveram teores de MS semelhantes. Em relação as gramíneas, as leguminosas tiveram maiores teores de PB e DIVMS e menores de FDN.

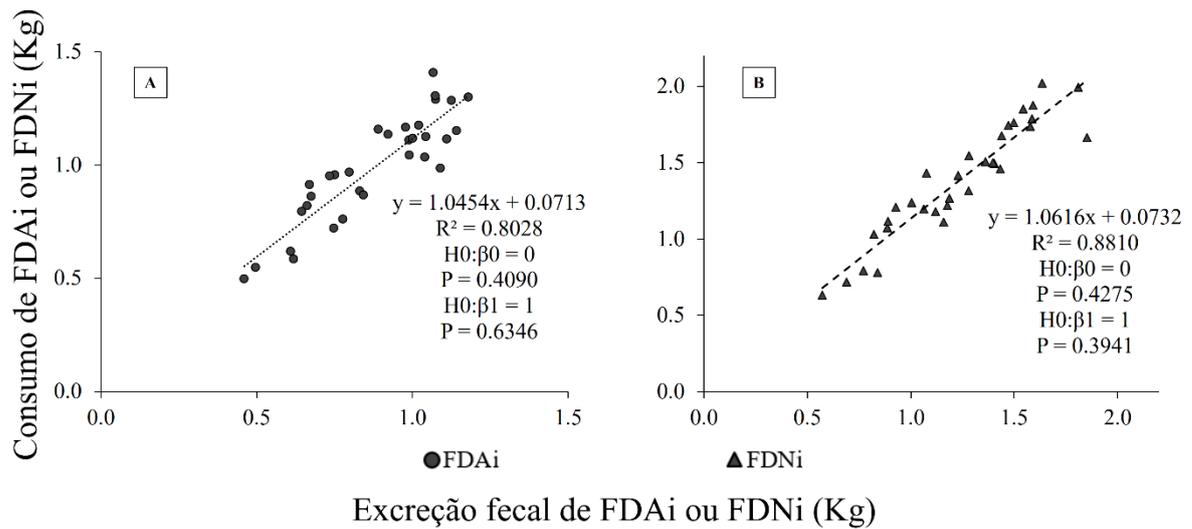
Tabela 3. Composição centesimal (%) dos fenos utilizados nas dietas experimentais

Feno	MS	PB	FDN	FDA	FDNi	FDAi	DIVMS	EE	MM
<i>Medicago sativa</i>	89,4	21,0	59,5	34,5	31,7	23,7	60,2	1,9	9,6
<i>Arachis pintoi</i>	89,9	16,9	65,9	36,2	30,8	24,2	60,5	1,7	10,0
<i>Brachiaria brizantha</i>	90,1	11,4	75,4	35,1	24,7	18,8	54,1	1,5	8,1
<i>Cynodon dactylon</i>	90,4	9,2	82,1	39,8	31,3	18,5	53,2	1,9	6,8

MS: matéria seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; FDNi: FDN indigestível; FDAi: FDA indigestível; DIVMS: digestibilidade *in vitro* da matéria seca; EE: extrato etéreo; MM: matéria mineral (cinzas)

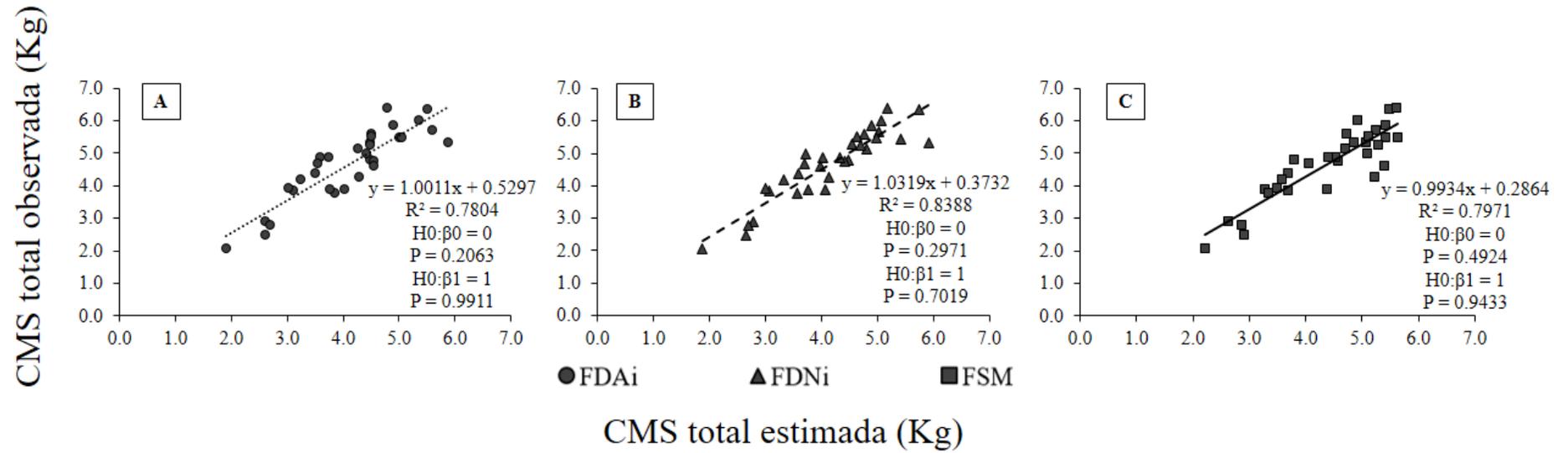
A FDAi da dieta ingerida não foi diferente da excretada nas fezes, sendo que o intercepto da equação gerada não diferiu de 0 ( $\beta_0 = 0$ ;  $P = 0,4090$ ) e coeficiente angular não diferiu de 1 ( $\beta_1 = 1$ ;  $P = 0,6346$ ). A equação gerada entre os valores da FDNi consumida e excretada, também, não diferiram e tiveram  $\beta_0 = 0$  ( $P = 0,4275$ ) e  $\beta_1 = 1$  ( $P = 0,3941$ ) (Figura 2).

Figura 2. Equações de regressão geradas entre o consumo e excreção de componentes fibrosos indigestíveis: Consumo vs excreção de FDAi (A) e consumo vs excreção de FDNi (B).



O consumo de matéria seca (CMS) total observado não diferiu do estimado por meio da técnica da FDAi dos fenos de gramíneas e leguminosas, sendo que o intercepto da regressão entre os valores observados e estimados não diferiu de 0 ( $\beta_0 = 0$ ;  $P = 0,2063$ ) e o coeficiente angular não diferiu de 1 ( $\beta_1 = 1$ ;  $P = 0,9911$ ) (Figura 3A). A FDNi dos fenos foi capaz de estimar o CMS total de gramíneas e leguminosas. Para essa fração, o intercepto da regressão linear de primeiro grau foi igual a 0,3732 e não diferiu de 0 ( $\beta_0 = 0$ ;  $P = 0,2971$ ) e o coeficiente angular foi igual a 1,0319 e não diferiu de 1 ( $\beta_1 = 1$ ;  $P = 0,7019$ ) (Figura 3B). O CMS total dos fenos de gramíneas e leguminosas, também, pode ser estimado pela técnica da DIVMS. O intercepto da equação linear gerada não diferiu de 0 ( $\beta_0 = 0$ ;  $P = 0,4924$ ) e o coeficiente angular não diferiu de 1 ( $\beta_1 = 1$ ;  $P = 0,9433$ ) (Figura 3C).

Figura 3. CMS total observada em relação à estimada por diferentes métodos: (A) FDAi; (B) FDNi; (C) DIVMS dos fenos utilizados nas dietas experimentais.



## 5.1 ABUNDÂNCIA ISOTÓPICA DO CARBONO 13

A proporção da gramínea ingerida na dieta não diferiu da estimada por meio da técnica de isótopos de  $^{13}\text{C}$  na FDAi das fezes (Figura 4A), sendo que, o intercepto foi igual a 1,3825 e não diferiu de 0 ( $P = 0,2073$ ) e o coeficiente angular igual a 0,9979 e não diferiu de 1 ( $P = 0,9041$ ). Os erros de média e aleatório representaram, respectivamente, 11,45 e 88,51% do total da EMQP (Tabela 4). O intercepto da equação gerada por meio dos isótopos de  $^{13}\text{C}$  na FDNi para estimar a proporção de gramínea na dieta não diferiu de 0 ( $\beta_0 = 0$ ;  $P = 0,7837$ ) e o coeficiente angular não diferiu de 1 ( $\beta_1 = 1$ ;  $P = 0,9034$ ) (Figura 4B). A FDNi da gramínea teve o maior erro aleatório do EQMP entre as técnicas testadas, sendo igual a 99,65%, indicando que essa fração foi a mais eficiente em estimar a composição botânica da dieta (Tabela 4). A técnica do  $^{13}\text{C}$  nas FSM estimou a proporção de gramínea consumido na dieta pela DIVMS, sendo que o intercepto da regressão linear de primeiro grau entre os valores observados e estimados não diferiu de 0 ( $\beta_0 = 0$ ;  $P = 0,0517$ ) e coeficiente angular não diferiu de 1 ( $\beta_1 = 1$ ;  $P = 0,9960$ ) (Figura 4C). Apesar de possuir equação com  $\beta_0 = 0$  e  $\beta_1 = 1$ , a técnica da DIVMS apresentou o menor partição do erro aleatório e o maior erro de média do EQMP e foi a menos eficiente em estimar a composição botânica da dieta. A proporção leguminosa ingerida na dieta, não diferiu da estimada por meio da técnica de isótopos de  $^{13}\text{C}$  na FDAi das fezes, sendo que o intercepto não diferiu de 0 ( $\beta_0 = 0$ ;  $P = 0,2967$ ) e o coeficiente angular não diferiu de 1 ( $\beta_1 = 1$ ;  $P = 0,9041$ ) (Figura 4D). A composição botânica da leguminosa na dieta ingerida não diferiu da estimada por meio do  $^{13}\text{C}$  da FDNi das fezes. Na equação gerada entre os valores observados e estimados, o intercepto não diferiu de 0 ( $\beta_0 = 0$ ;  $P = 0,9362$ ) e coeficiente angular não diferiu de 1 ( $\beta_1 = 1$ ;  $P = 0,9034$ ) (Figura 4E). A técnica do  $^{13}\text{C}$  nas FSM estimou a proporção de leguminosa consumida na dieta, sendo que, o intercepto da regressão linear de primeiro grau entre os valores observados e estimados não diferiu de 0 ( $\beta_0 = 0$ ;  $P = 0,0616$ ) e coeficiente angular não diferiu de 1 ( $\beta_1 = 1$ ;  $P = 0,8551$ ) (Figura 4F). O erro sistemático teve pequena contribuição em relação ao total do EQMP, independente do método usado para estimar o CMS.

FIGURA 4. Proporção observada de gramínea ou leguminosa consumidos nas dietas em relação à estimada por abundância do  $^{13}\text{C}$  nos seguintes materiais oriundos das fezes: (A) FDAi gramínea; (B) FDNi gramínea; (C) FSM gramínea; (D) FDAi leguminosa; (E) FDNi leguminosa; (F) FSM leguminosa.

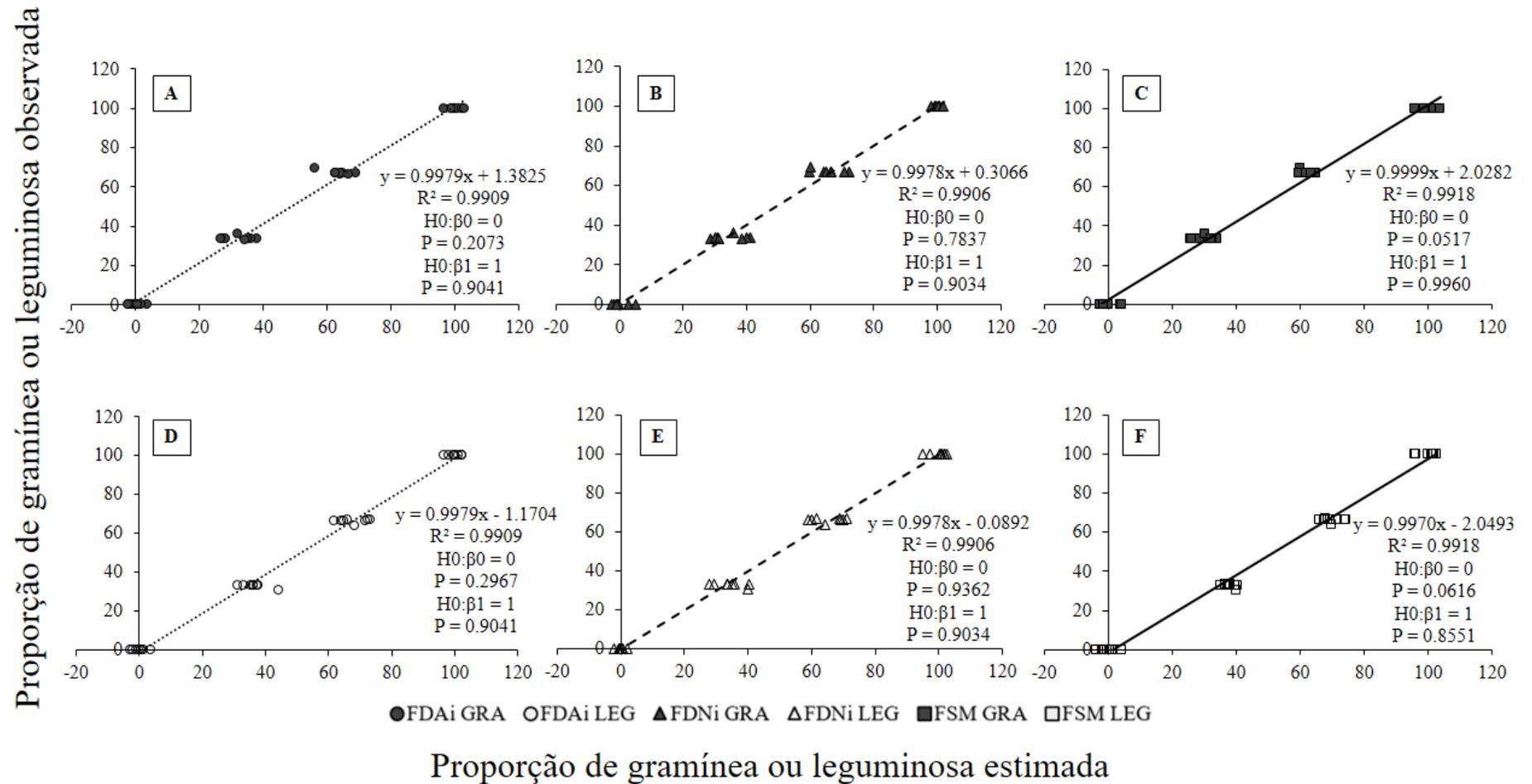


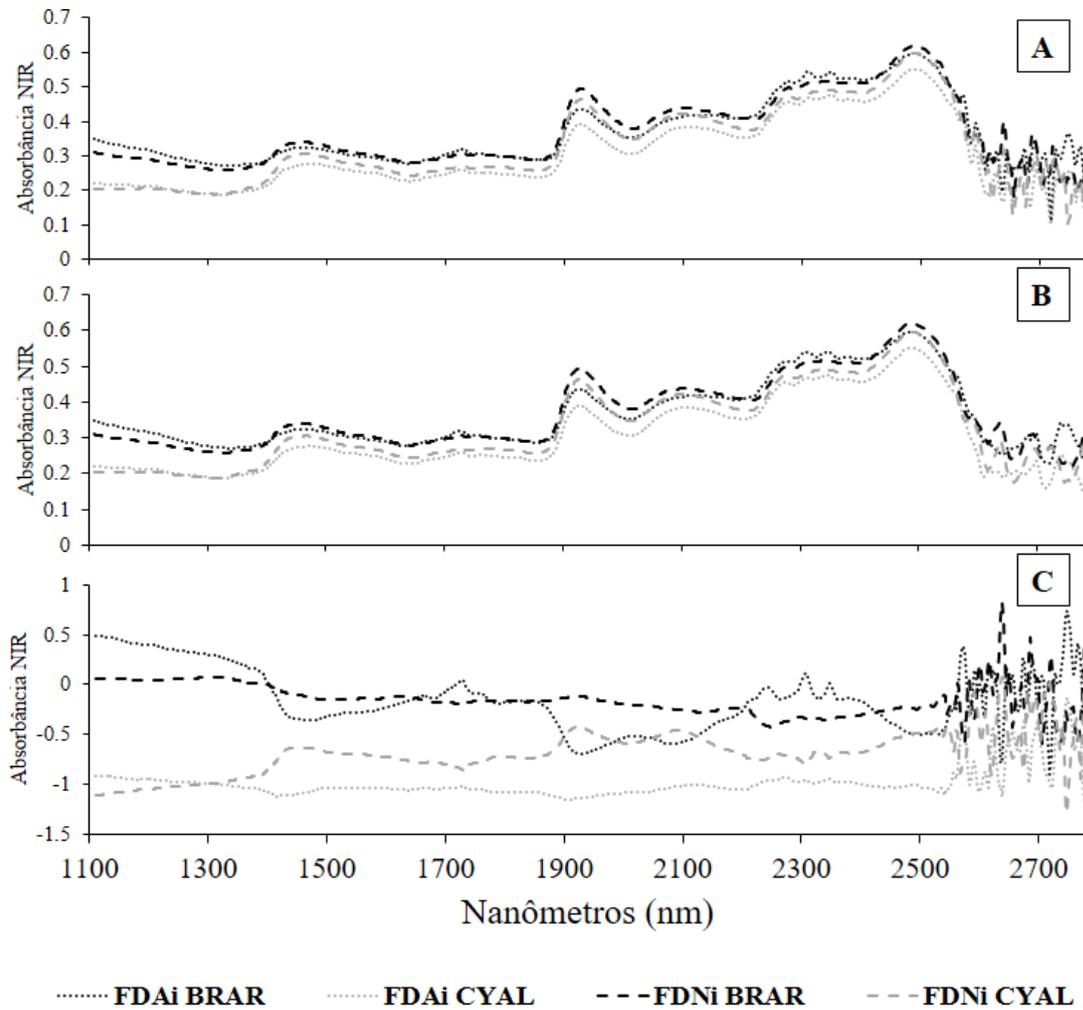
Tabela 4. Partição do EQMP dos estimadores da composição botânica da dieta por abundância do  $^{13}\text{C}$  nas FDAi, FDNi e FSM.

Parâmetro	EQMP			
	Total	Erro de média	Erro sistemático	Erro aleatório
FDAi	14,275	1,635 (11,45%)	0,006 (0,04%)	12,634 (88,51%)
FDNi	13,124	0,039 (0,30%)	0,007 (0,05%)	13,078 (99,65%)
FSM	16,218	4,872 (30,04%)	0,013 (0,08%)	11,333 (69,88%)

## 5.2 ESPECTROSCOPIA NO NIR

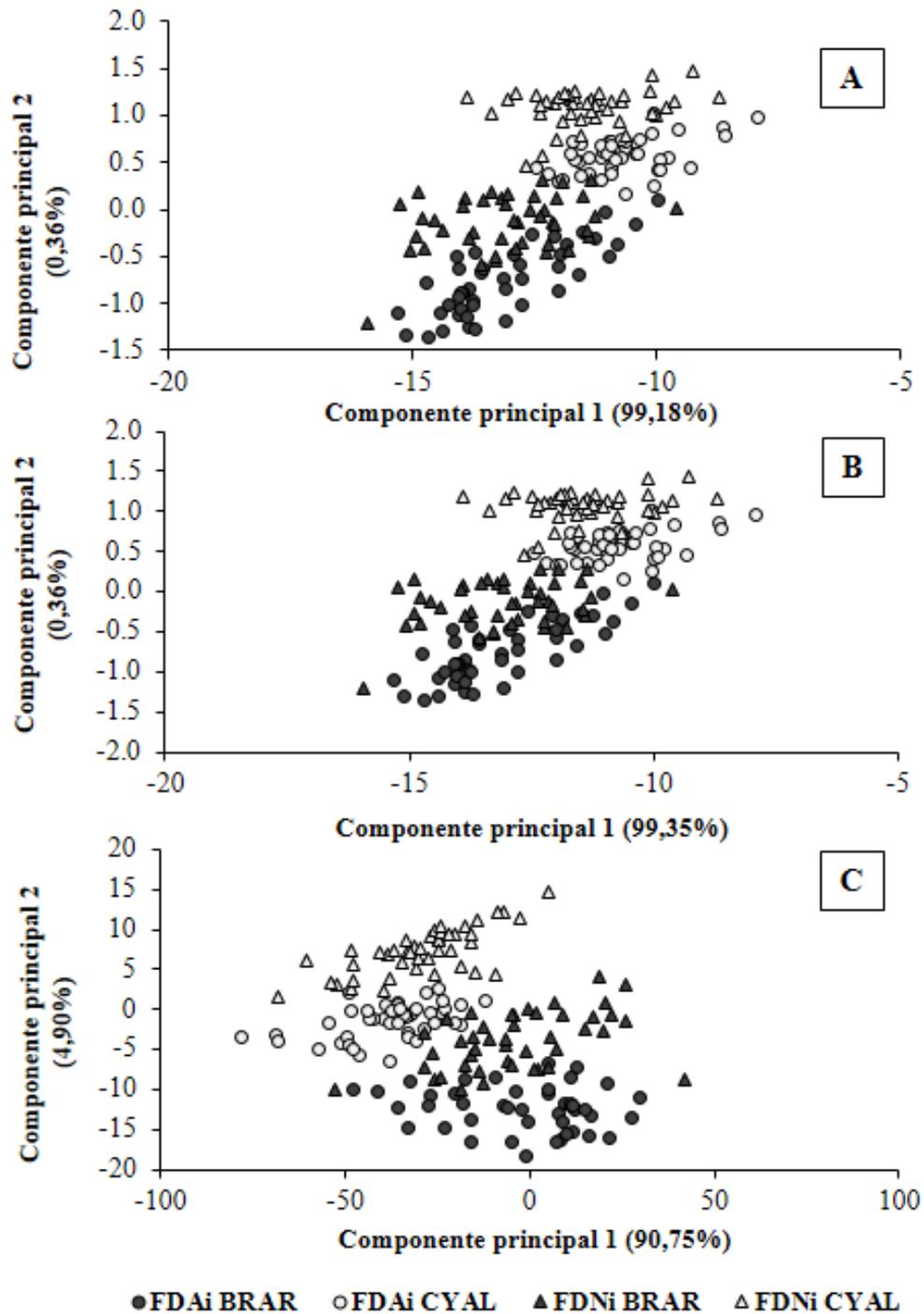
Os espectros NIR originais mensurados mostram a diferença dos padrões da resposta espectral entre os tratamentos: FDAi BRAR, FDNi BRAR, FDAi CYAL e FDNi CYAL (Figura 5). A média dos espectros NIR obtidos das fezes secas e moídas são aquelas que obtiveram os maiores valores de absorbância. Os espectros obtidos após os tratamentos, principalmente, o autoscale (Figura 6C), mostram uma alteração no padrão de ruídos.

Figura 5. Média dos espectros NIR originais (A), com tratamento matemático de suavização (B) ou autoscale (C) a partir da FDNi e FDAi das fezes de bovinos



Em todos os pré-tratamentos dos dados, é possível observar na Figura 6 que as amostras de fezes oriundas de dietas com Cynodon e alfafa agruparam-se nos valores positivos do eixo componente principal 2 (PC2). Por outro lado, nos valores negativos, agruparam-se as amostras de fezes oriundas de dietas com Brachiaria e amendoim forrageiro. Além desses dois grandes agrupamentos, é perceptível a formação de sub-grupos identificados pelas diferentes análises das fezes. A avaliação feita pela PCA mostra que os tratamentos se agruparam, indicando que o NIR é capaz de detectar parâmetros de diferentes espécies forrageiras e processamentos. O componente principal 1 (PC1) explicou 99,18, 99,35 e 90,75% da variabilidade do dados. O PC2 explicou 0,36, 0,36 e 4,90% para o espectro original ou com pré-tratamento de suavização e autoscale, respectivamente (Figura 6).

Figura 6. Gráfico de dispersão bidimensional para PC1 e PC2 da análise de componentes principais (PCA) dos espectros NIR originais (A), com tratamento matemático de suavização (B) ou autoscale (C) a partir da FDNi e FDAi das fezes de bovinos



Os modelos de calibração na PLS-R apresentaram altos coeficientes de determinação ( $R^2_{cal}$ ) sendo igual a 0,988, em média, e variando entre 0,970 e 0,999, para todos os tratamentos matemáticos (Tabela 5). Comparando as médias dos  $R^2_{cal}$  dos tratamentos aplicados nos dados, o autoscale foi superior (0,998) e a suavização (0,973) foi inferior aos dados originais (0,994) (Figuras 7, 8 e 9). A raiz do erro médio do quadrado da calibração (RMSEc) foi 43% menor

para os dados tratados com autoscale e 213% maior com suavização em relação ao original. Maiores RMSEc indicam que os pontos estão mais distantes em relação a curva da equação linear do modelo predito - estimado. A raiz do erro médio do quadrado da validação cruzada (RMSEcv) foi reduzida e o coeficiente de determinação ( $R^2_{cv}$ ) incrementado com o tratamento matemático dos dados, resultando numa melhor qualidade para as predições. A suavização apresentou menor RMSEcv e maior  $R^2_{cv}$ , em média.

Tabela 5. Calibração e validação cruzada por PLS - R dos espectros NIR originais, tratados com suavização ou autoscale para as características da FDNi e FDAi das fezes de bovinos

Tratamento dos dados	Processamento das amostras	RMSEc	$R^2_{cal}$	RMSEcv	$R^2_{cv}$	LV
Originais	FDAi ARBR	1,940	0,996	32,991	0,318	14
	FDAi CYAL	2,557	0,993	30,436	0,360	14
	FDNi BRAR	2,389	0,994	34,758	0,272	14
	FDNi CYAL	2,929	0,991	29,827	0,301	14
Suavização	FDAi ARBR	5,477	0,970	18,834	0,675	14
	FDAi CYAL	5,412	0,971	19,086	0,669	14
	FDNi BRAR	5,644	0,968	16,109	0,765	14
	FDNi CYAL	4,335	0,981	14,467	0,792	14
Autoscale	FDAi ARBR	1,242	0,998	20,592	0,618	14
	FDAi CYAL	1,519	0,998	17,370	0,712	14
	FDNi BRAR	0,971	0,999	18,469	0,711	14
	FDNi CYAL	1,822	0,997	17,710	0,690	14

Legenda: RMSEc - erro médio quadrático para a calibração;  $R^2_{cal}$  - coeficiente de determinação para calibração; RMSEcv - erro médio quadrático para a validação cruzada;  $R^2_{cv}$  - coeficiente de determinação para a validação cruzada; LV - variáveis latentes.

\*n=44 para todos tratamentos experimentais

Figura 7. Calibração do modelo com base nos espectros NIR originais em proporções de gramíneas e leguminosas nas fezes de bovinos em resíduos da (A) FDAi BRAR; (B) FDNi BRAR; (C) FDAi CYAL; (D) FDNi CYAL.

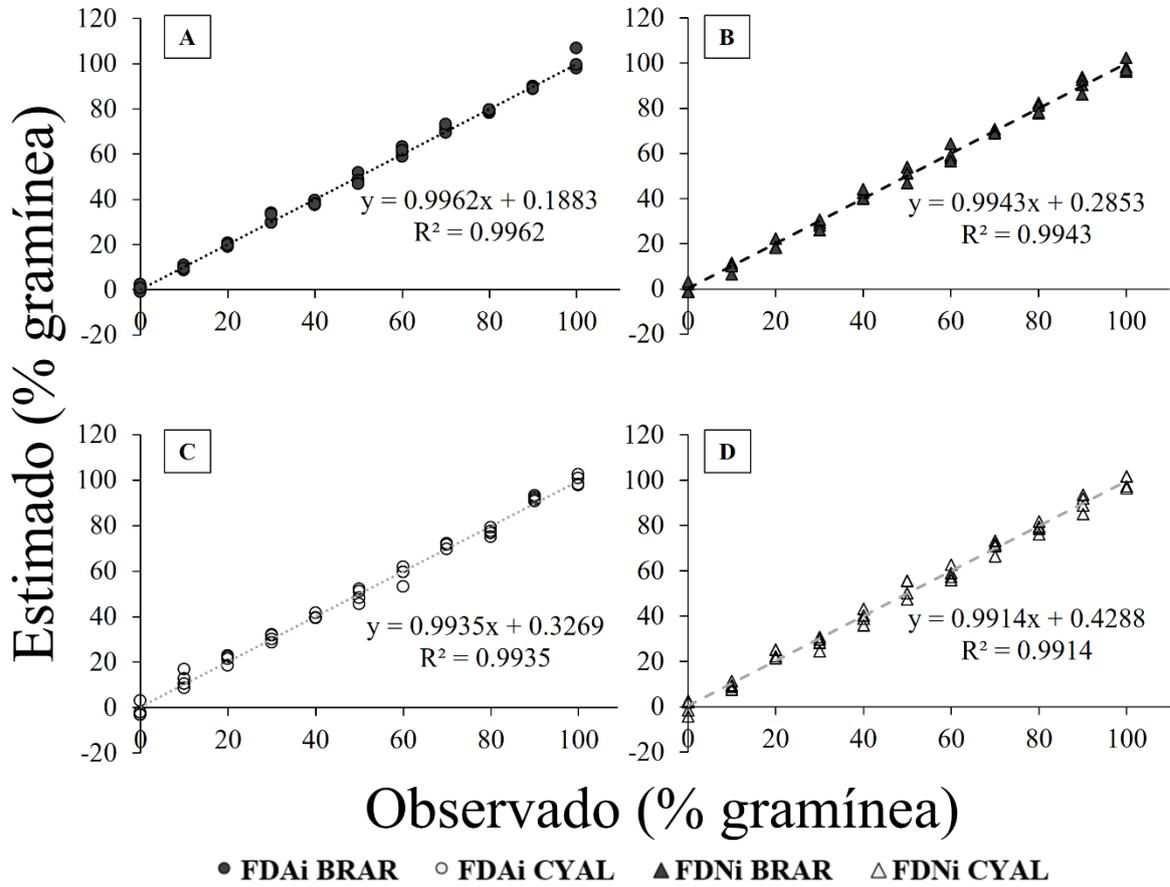


Figura 8. Calibração do modelo com base nos espectros NIR tratados com suavização em proporções de gramíneas e leguminosas nas fezes de bovinos em resíduos da (A) FDAi BRAR; (B) FDNi BRAR; (C) FDAi CYAL; (D) FDNi CYAL.

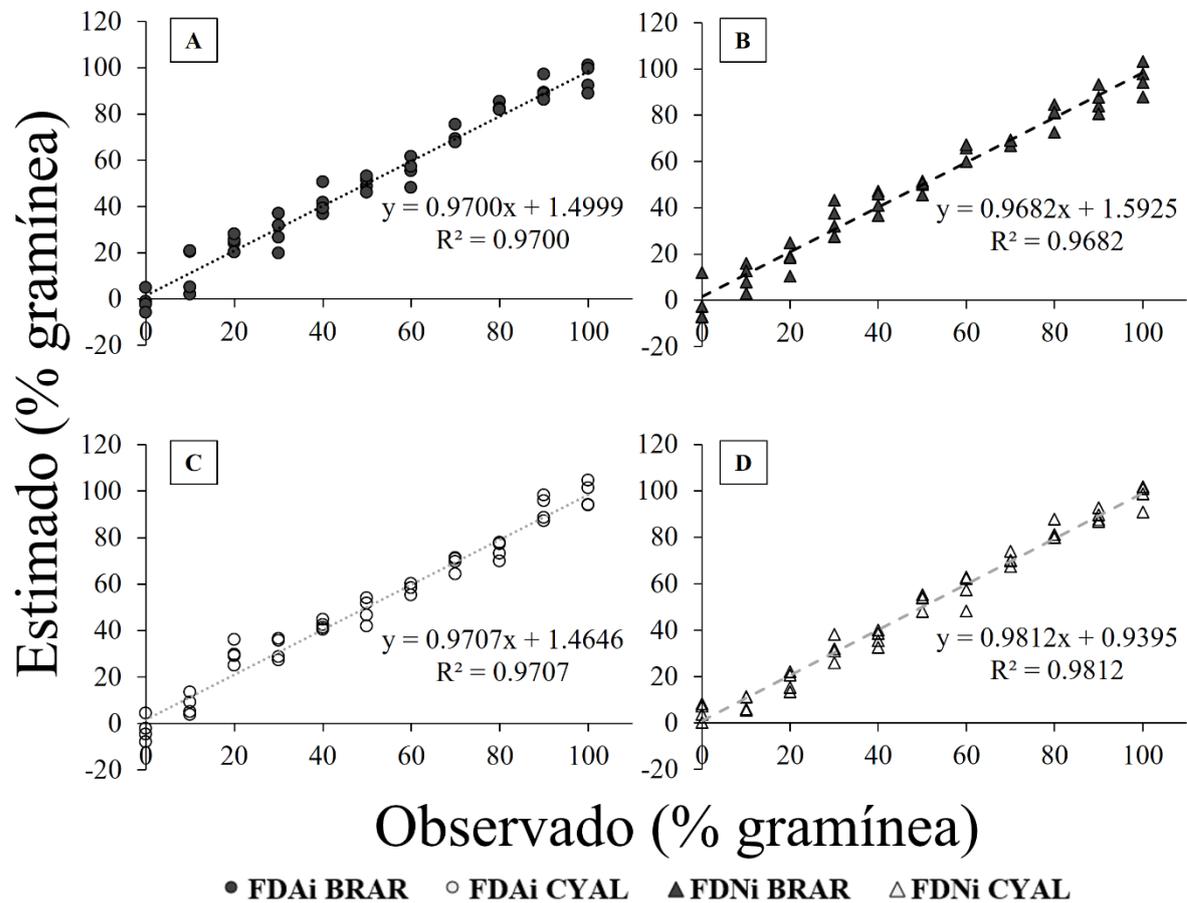
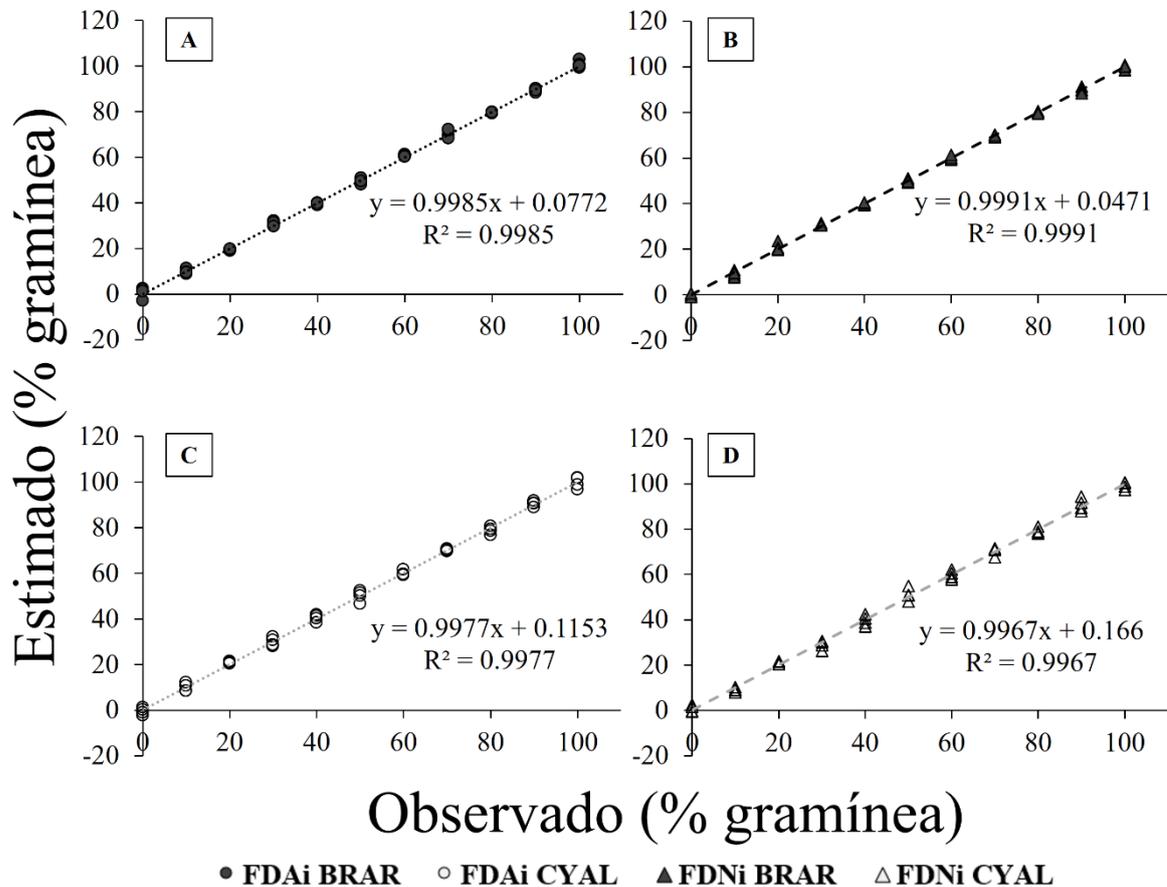


Figura 9. Calibração do modelo com base nos espectros NIR tratados com autoscale em proporções de gramíneas e leguminosas nas fezes de bovinos em resíduos da (A) FDAi BRAR; (B) FDNi BRAR; (C) FDAi CYAL; (D) FDNi CYAL.



Na validação independente, o tratamento matemático dos espectros foi importante, uma vez que aumentou o  $R^2$  de todas estimativas realizadas, e a suavização resultou nos maiores incrementos. As equações que estimaram a composição botânica pelo espectro NIR da FDNi das fezes da dieta com Brachiaria e Arachis nos dados originais não se ajustaram em modelos lineares ( $P > 0,05$ ) (Tabela 6). A FDAi das fezes oriundas das dietas com Brachiaria e amendoim forrageiro ou Cynodon e alfafa não foi capaz de prever a proporção de cada espécie ingerida, pois o coeficiente angular ( $\beta_1$ ) diferiu de 1 em todas regressões, independente do tratamento matemático ( $P < 0,05$ ) (Figuras 10, 11 e 12). Pelo mesmo motivo, as regressões geradas pela FDNi das fezes oriundas de dietas com Cynodon e alfafa com os espectros originais ou tratados com suavização não foram validadas. Outro parâmetro avaliado para validação da regressão é o intercepto ( $\beta_0$ ), que não deve ser diferente de zero. A FDNi das fezes oriundas das dietas com Brachiaria e Arachis e tratados com autoscale tiveram intercepto da

regressão diferente de zero ( $P < 0,05$ ). Dois modelos gerados pela FDNi das fezes, um tratado com suavização proveniente de dieta com Brachiaria e amendoim forrageiro e outro tratado com autoscale proveniente de dieta com Cynodon e alfafa foram eficientes em prever a composição botânica das fezes por meio do espectro NIR, no qual foram validados. Ou seja, apenas um modelo foi capaz de prever a composição botânica das fezes para dietas com Brachiaria e amendoim forrageiro e mais um para dietas com Cynodon e alfafa, em função do intercepto da regressão não diferir de ( $\beta_0 = 0$ ) e coeficiente linear da regressão não diferir de um ( $\beta_1 = 1$ ). O  $R^2$  gerado por essas regressões foram maiores que 80%, indicando que os modelos de validação proposto tem uma alta correlação entre os valores observados e estimados.

Tabela 6. Validação independente dos dados espectrais originais ou tratados matematicamente

Tratamento dos dados	Processamento das fezes	$P \beta_0=0$	$P \beta_1=1$	EPM	$R^2$	Modelo
Originais	FDAi ARBR	0,212	0,049	11,8402	0,4327	0,006
	FDAi CYAL	0,070	<,0001	8,2405	0,6623	<0,001
	FDNi BRAR	0,002	0,124	9,9142	0,2073	0,076
	FDNi CYAL	0,020	0,020	11,0756	0,3528	0,015
Suavização	FDAi ARBR	0,275	0,010	9,8880	0,7569	<0,001
	FDAi CYAL	0,016	<,0001	9,8523	0,8299	<0,001
	FDNi BRAR	0,820	0,548	6,4886	0,8477	<0,001
	FDNi CYAL	0,114	0,036	7,5985	0,8647	<0,001
Autoscale	FDAi ARBR	0,500	0,014	8,6193	0,7099	<0,001
	FDAi CYAL	0,991	<,0001	8,6921	0,7551	<0,001
	FDNi BRAR	0,011	0,609	8,1487	0,5983	<0,001
	FDNi CYAL	0,402	0,859	6,8062	0,8272	<0,001

Figura 10. Validação do modelo com base nos espectros NIR originais em proporções de gramíneas e leguminosas nas fezes de bovinos em resíduos da (A) FDAi BRAR; (B) FDNi BRAR; (C) FDAi CYAL; (D) FDNi CYAL.

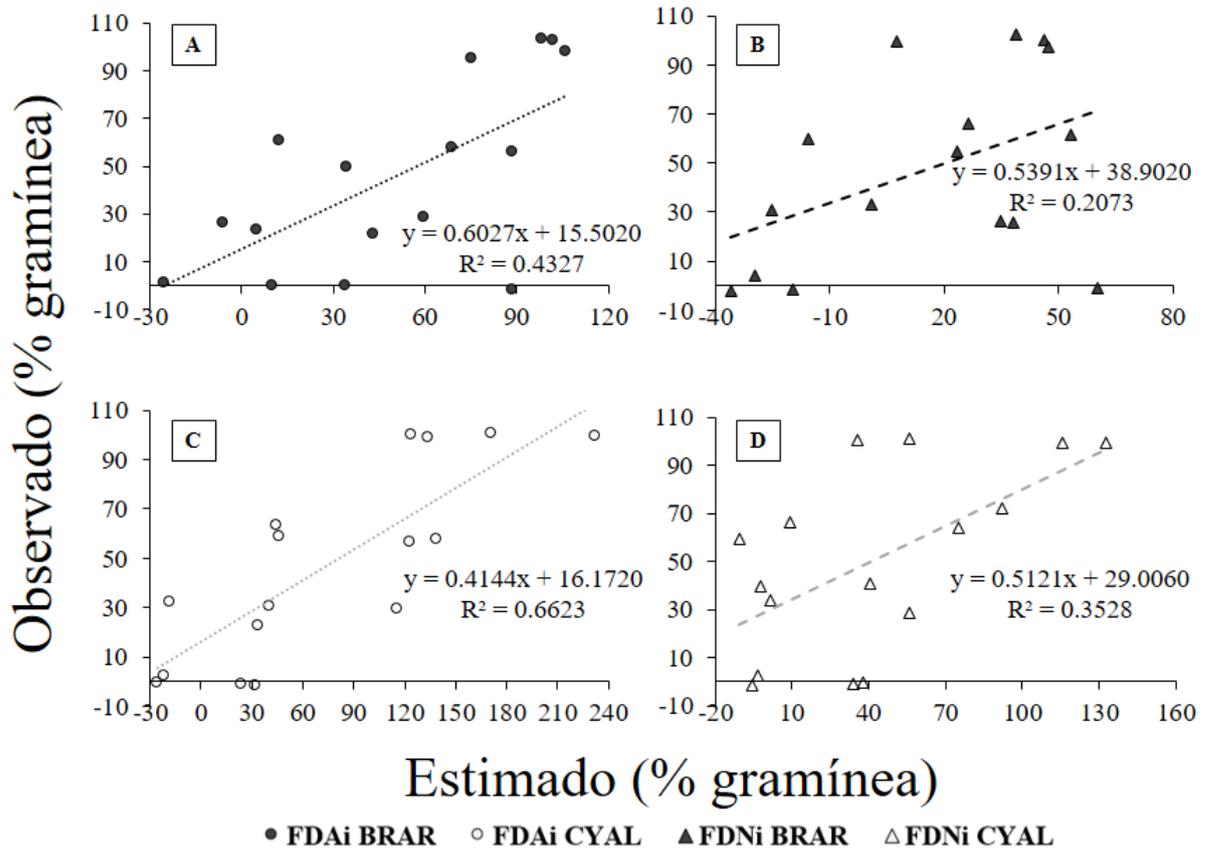


Figura 11. Validação do modelo com base nos espectros NIR tratados com suavização em proporções de gramíneas e leguminosas nas fezes de bovinos em resíduos da (A) FDAi BRAR; (B) FDNi BRAR; (C) FDAi CYAL; (D) FDNi CYAL.

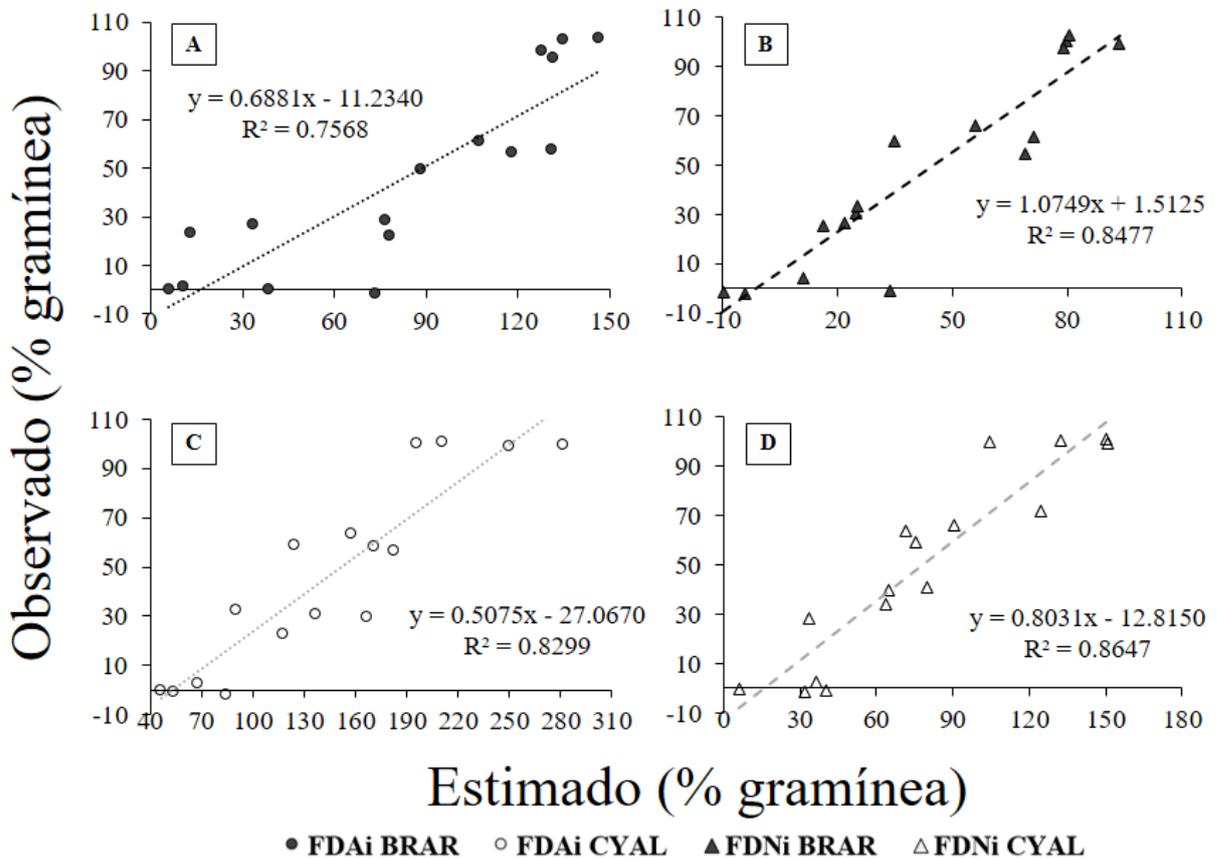
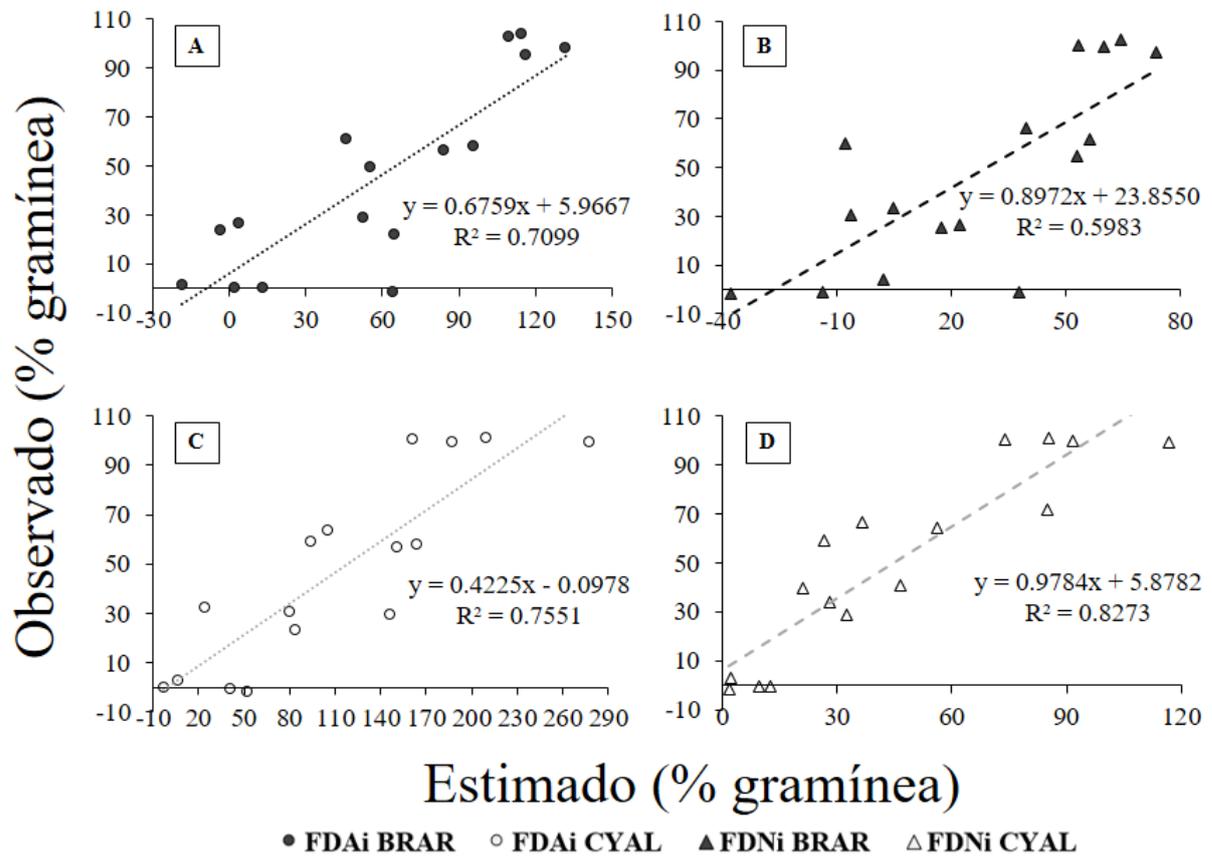


Figura 12. Validação do modelo com base nos espectros NIR tratados com autoscale em proporções de gramíneas e leguminosas nas fezes de bovinos em resíduos da (A) FDAi BRAR; (B) FDNi BRAR; (C) FDAi CYAL; (D) FDNi CYAL.



## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 INGESTÃO E EXCREÇÃO DE INDICADORES INTERNOS

Predições acuradas e precisas sobre a ingestão e excreção de fibras indigestíveis são o primeiro passo para predizer o CMS. Nesse estudo, a coleta total de fezes foi importante, pois indicou que os marcadores, FDAi e FDNi dos fenos, tiveram um grande potencial de recuperação fecal. Utilizando pequenos ruminantes, Rodrigues et al. (2010) encontraram recuperação fecal igual a 93,7 e 90,9% para FDAi e FDNi, respectivamente, e ambos indicadores apresentaram o menor erro de predição da digestibilidade aparente. Em bovinos, Zeoula et al. (2002) conseguiram recuperação fecal de 89,8 e 101,6 para FDAi e FDNi, respectivamente. Por outro lado, Carvalho et al. (2013) analisaram a regressão linear de consumo e excreção de FDAi e FDNi em ovelhas e cabras, e somente para a FDNi o  $\beta_0$  não diferiu de 0 e o  $\beta_1$  não diferiu de 1. A FDAi, apesar do intercepto não diferir de 0, o coeficiente

angular foi diferente de 1. Detmann et al. (2007) utilizaram bovinos para incubação e, também, tiveram uma recuperação completa para FDNi, porém a regressão linear gerada para FDAi apresentou intercepto diferente de 0.

Segundo Berchielli et al. (2005), as estimativas de produção fecal utilizando marcadores internos diferiram da coleta total para a dieta a base de cana-de-açúcar, enquanto o marcador externo não apresentou diferença. Portanto, os marcadores apresentam comportamento diferenciado de acordo com cada volumoso estudado. Entre as razões para essa diferença, possivelmente, a constituição da fibra de cada volumoso desempenha papel importante, podendo afetar sua taxa e extensão de degradação. Em virtude da grande variabilidade de resultados encontrados na literatura, são necessários cuidados na preparação de amostras e nas técnicas de análise (FERREIRA et al., 2009). Em estudos com ruminantes em pastejo, os indicadores internos constituem estimadores indiretos da digestibilidade dietética, cujas estimativas são obtidas a partir de valores de excreção fecal com base na utilização de indicadores externos (HELLWING et al., 2015). Os métodos utilizados com a incubação ruminal por 288 horas é a mais consolidada e tem permitido os resultados mais consistentes da fração não degradável (KRIZSAN et al., 2015), sendo a técnica utilizada no presente trabalho.

## **6.2 CMS OBSERVADO E PREDITO POR MARCADORES INTERNOS**

Em situações onde não é possível realizar a coleta total de fezes, como em pastagens, o uso de tais indicadores pode mostrar-se útil e adequado para estimar o CMS em ruminantes. Todas técnicas para estimar o CMS total foram consideradas adequadas para as duas espécies de gramíneas e leguminosas testadas. É importante considerar que haviam gramíneas (*Brachiaria* e *Cynodon*) de clima tropical e ciclo fotossintético C4 e leguminosas de clima tropical (amendoim forrageiro) e temperado (alfafa) e ciclo C3. Utilizando a FDAi como marcador interno, foi possível estimar o CMS total das novilhas. Berchielli et al. (2005) comentaram que a recuperação da FDAi (incubada *in situ*) em feno Tifton 85 não diferiu de 100%, sendo um fator que explicou o CMS predito por esse método não diferir do CMS real. Utilizando marcadores internos em dietas a base de cana de açúcar e silagem de milho, Ferreira et al. (2009) conclui que a FDAi pode ser o parâmetro para estimativas em estudos de digestibilidade. Apesar disso, Detmann et al. (2001) estudaram marcadores internos e obtiveram respostas variáveis utilizando a FDAi como indicador, relatando que este possuiu os maiores índices de dispersão em relação a FDNi e MSi. Os autores comentam que o erro pode ocorrer em função das análises para FDAi ocorrerem de forma sequencial, existindo um acúmulo do erro e refletindo em estimativas inexatas.

A FDNi foi outro marcador interno eficiente para prever o CMS total, sendo que, o coeficiente de correlação obtido por esse método foi mais alto que os demais. Segundo Ferreira et al. (2009), a FDNi foi um estimador eficiente da digestibilidade, e não diferiu significativamente daquela determinada por coleta total de fezes. Em experimento com bovinos com dieta a base de silagem de milho, capim elefante e Tifton 85, Cabral et al. (2006) concluíram que a FDNi pode ser utilizada na estimativa da digestibilidade de gramíneas tropicais. No presente estudo, com exceção da *Medicago sativa* (alfafa), as demais espécies forrageiras estudadas são de clima tropical e os resultados obtidos, também, comprovaram a eficácia da FDNi como marcador interno. Em pequenos ruminantes estabulados ingerindo cana de açúcar como fonte forrageira, a FDNi foi capaz de estimar o CMS e a excreção fecal (CARVALHO et al., 2013). Itavo et al. (2002) obtiveram estimativas capazes de prever a digestibilidade aparente por meio da FDNi do feno de coast-cross. Em estudo conduzido por Hellwing et al. (2015) a técnica da FDNi (marcador interno) combinado com o TiO<sub>2</sub> (marcador externo), o CMS de vacas em pastejo foi subestimado em 1 kg, em média. Segundo Lippke et al. (1986), boa parte da variabilidade dos resultados obtidos pode ser atribuída à falta de padronização no método de determinação.

Detmann et al. (2001) concluíram que a FDNi e matéria seca indigestível (MSi) constituíram a melhor alternativa para determinação indireta da digestibilidade da dieta e do CMS. Alguns autores tem sugerido o uso da MSi como marcador interno em pesquisas com ruminantes (HUHTANEN et al., 1994; DETMANN et al., 2001), que pode ser vantajoso devido ao baixo custo analítico comparado com fibras indigestíveis. Entretanto a presença de contaminantes nas amostras da MSi pode comprometer os resultados (HUHTANEN et al., 1994; CASALI et al., 2009). Além disso, o uso dos detergentes pode ser útil para limpar os resíduos microbianos e não microbianos (partículas da digesta aderidas) pós incubação ruminal.

Uma das técnicas mais frequentemente utilizadas para estimar o consumo em pastejo é baseada no princípio de que a excreção fecal por um animal é inversamente proporcional à digestibilidade, mas diretamente relacionada à quantidade de alimento ingerido (CARVALHO et al., 2007). O método da DIVMS dos alimentos é um dos métodos capazes de prever o CMS, desde que seja conhecida a produção fecal, por coleta total ou indicador externo. Gonçalves et al. (2003) estudando feno de Tifton 85 cortado com diferentes dias de crescimento fornecido para ovinos tiveram valores de DIVMS semelhantes à digestibilidade aparente. Detmann et al. (2001) testaram o cromo, como marcador externo, aliado a vários marcadores internos, sendo um deles a DIVMS, no qual apresentou predições do CMS maiores que os demais métodos. Da mesma maneira, Soares et al. (1999), ao avaliarem o consumo de vacas estabuladas por

intermédio da aplicação de óxido crômico e do emprego da DIVMS, afirmaram que houve superestimação do consumo, quando comparado aos valores obtidos por pesagem direta. O CMS de nove forrageiras em novilhos foi avaliado por Holechek et al. (1986), e em seis espécies o CMS não foi estimado corretamente, o que foi atribuído por esses autores à ineficácia da DIVMS.

Dove & Mayes (1991), citado por Carvalho et al. (2007), afirmaram que o uso da técnica de Tilley & Terry (1963) para DIVMS pressupõe digestibilidade única para todos os animais, desprezando a interação entre nível de consumo e efeitos interativos da forragem, omitindo as taxas de passagem (kp) e degradação (kd). Outra dificuldade ocorre quando a dieta é composta por diferentes espécies forrageiras, como em pastagens consorciadas, tornando essas interações ainda mais complexas e sujeitas a variações. Os componentes ingeridos podem possuir diferentes kp e kd, fazendo que o fluxo da digesta no trato gastrointestinal seja variável durante o dia ou conforme a seleção do animal no pasto, formando um sistema constantemente dinâmico.

### **6.3 COMPOSIÇÃO BOTÂNICA DA DIETA**

A composição botânica da dieta pode ser estimada por meio da análise de isótopos estáveis de  $^{13}\text{C}$  nas fezes (JONES et al., 1979; GARCIA et al., 2000; MACEDO et al., 2010, MARTINS et al., 2012, HELWING et al., 2015). Porém não foram encontrados estudos sobre a aplicabilidade dessa técnica por meio de testes de não rejeição das hipóteses matemáticas de nulidade entre dados observados e preditos pelos parâmetros do coeficiente angular ( $\beta_1 = 1$ ) e intercepto ( $\beta_0 = 0$ ) em regressões lineares.

Um dos estudos pioneiros com isótopos foi Jones et al. (1979), que estudou o potencial dessas análises nas fezes de diferentes espécies animais. A abundância de  $^{13}\text{C}$  nas fezes foi diretamente correlacionada com a mensurada no seu respectivo alimento, sendo ele originado de plantas C3 ou C4. As abundâncias de  $^{13}\text{C}$  nas fezes dos bovinos que consumiram 100% gramínea (*Sorghum bicolor*) e 100% leguminosas (*Leucaena leucocephala*) foram, respectivamente, -13‰ e -28‰, sendo semelhantes aos obtidos no presente experimento nas mesmas dietas. Além das fezes, o sangue, também, pode ser usado para prever a dieta, porém as amostras fecais respondem mais rapidamente a alterações na composição botânica ingerida, sendo considerado um melhor estimador (MARTINS et al., 2012). De acordo com Jones et al. (1979) e Macedo et al. (2010), seis dias foram o suficiente para proporcionar uma estabilidade na abundância do  $^{13}\text{C}$  nas fezes, mesmo quando as dietas foram alteradas de 100% leguminosas para 100% gramíneas. Segundo Garcia et al. (2000), foi possível estimar a proporção de

pastagem ou silagem de milho em dietas para vacas leiteiras por meio do isótopo de C13 nas fezes associado a técnica da digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica.

Em estudo conduzido por Macedo et al. (2010) foram oferecidos *Brachiaria dictyoneura* e *Desmodium ovalifolium* para bovinos de origem zebuína. As dietas consistiram em 5 diferentes proporções da gramínea e leguminosa, utilizando a técnica dos isótopos de C13 nas fezes associado a DIVMS das forrageiras para estimar a ingestão. Os autores concluíram que a proporção de leguminosas na dieta pode ser predita de forma confiável a partir da análise da abundância isotópica de 13C. Porém, Macedo et al. (2010) somente descreve a variação na abundância de 13C nas fezes em função de sucessivas dietas experimentais e apresenta uma regressão linear de primeiro grau dos dados de abundância do 13C entre os dados das fezes e da dieta, considerando somente o coeficiente de determinação como parâmetro estatístico. As FSM foram utilizadas para análise de abundância isotópica do 13C, e por meio da análise de partição do EMQP, apresentou os maiores erros de média e os menores erros aleatórios, sendo a fração preterida para realizar predições. O erro aleatório é produto das variações nas medições que não seguem uma tendência fixa (erro não *viesado*) e deve ser o mais próximo de 100%. Segundo Minson et al. (1975) a análise de isótopos de carbono diretamente nas fezes pode resultar em contaminação devido a produção de componentes endógenos ou alimentos com menor tempo de degradação e maior permanência no rúmen.

Este trabalho propõe realizar análise da abundância do 13C na FDNi das forrageiras para prever a composição botânica ingerida em dietas de gramíneas e leguminosas. Uma vez que o processo de degradação ruminal e posterior lavagem em solução de detergente neutro, eliminaria a possibilidade de elementos contaminantes das fezes. Apesar das análises de FDAi, FDNi e DIVMS não diferirem no coeficiente angular e intercepto para os dados preditos e observados, o uso da FDNi deve ser preconizado, em função dos menores erros de predição.

#### **6.4 ESPECTROS NIR**

A aplicação de pré-tratamentos nos espectros no NIR pode auxiliar na informação e refinamento dos dados (DELWICHE e REEVES, 2004). A assinatura espectral é resultado da interação da luz com as moléculas constituintes do material, assim cada material apresenta uma resposta peculiar a radiação incidida (PASQUINI, 2003). Por isso, cada processamento da amostra resultou em padrões de espectros peculiares, isso ocorreu em função das diferenças na constituição química dos constituintes.

Os espectros NIR foram capazes de discriminar grupos amostrais nas análises de PCA, independente do tratamento matemático. Fanchone et al. (2009) utilizaram espectrometria no NIR nas fezes de ovelha alimentadas com *Digitaria decumbens* e conseguiram fazer boas

predições da composição química da forragem e digestibilidade, no intervalo de comprimento de onda entre 1100 e 2500 nm. De modo geral, o uso dessa técnica é bastante promissor, pois permitem resultados rápidos, não destrutivos e podem fornecer vários atributos de interesse nutricional.

O tratamento matemático dos dados foi eficiente, tanto na etapa de calibração quanto na etapa de validação cruzada. Na calibração, os tratamentos incrementaram os  $R^2_{cv}$  e reduziram  $RMSE_{cv}$ . Na validação independente dos dados espectrais, somente dois modelos gerados pela FDNi das fezes, um com *Brachiaria* e amendoim forrageiro, tratado com suavização e o outro tratado com autoscale oriundo de dieta com *Cynodon* e alfafa foram eficientes em prever a composição botânica. Como são poucos estudos onde o conjunto de dados de validação é independente, normalmente, as predições envolvem grandes erros e a precisão é baixa (WALKER et al., 1998; WALKER et al., 2002).

Nesse estudo, os dados foram validados com um conjunto independente e pode-se perceber que os modelos gerados estimaram com boa precisão os dados observados. Uma vez que, as hipóteses geradas obedeceram os princípios da equação de primeiro grau do tipo  $Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x$ , com  $H_0: \beta_0 = 0$  e  $H_0: \beta_1 = 1$ . Segundo Dixon & Coates (2009) a abundância dos isótopos de  $^{13}C$  deve ser o método de referência para desenvolver e validar as informações da composição botânica fezes de bovinos ingerindo plantas  $C_3$  e  $C_4$ .

## 7. CONCLUSÃO

A FDAi, FDNi e a DIVMS são marcadores internos capazes de estimar o CMS total em bovinos.

Por meio da análise do isótopo  $^{13}C$  na FDNi das fezes, é possível estimar a composição botânica da dieta ingerida em pastagens consorciadas entre gramíneas e leguminosas.

A proporção de *B. brizantha* e *A. pintoi* na FDNi das fezes pode ser estimada por meio dos espectros NIR com tratamento matemático suavização.

A proporção de *C. dactylon* e *M. sativa* na FDNi das fezes pode ser estimada por meio dos espectros NIR com tratamento matemático de autoscale.

## REFERÊNCIAS

- ARNOLD, S.L.; SCHEPERS, J.S. A simple roller-mill grinding procedure for plant and soil samples. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 35: 537-545, 2004.
- ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington, 1990. 1074 p.
- AROEIRA, L.J.M.; PACIULLO, D.S.C.; LOPES, F.C.F.; MORENZ, M.J.F.; SALIBA, E.S.; SILVA, J.J.; DUCATTI, C. Disponibilidade, composição bromatológica e consumo de matéria

seca em pastagem consorciada de *Brachiaria decumbens* com *Stylosanthes guianensis*. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.40, n.4, p.413-418, abr. 2005.

BERCHIELLI, T.T.; OLIVEIRA, S.G.; CARRILHO, E.N.V.M.; FEITOSA, J.V.; LOPES, A.D. Comparação de Marcadores para Estimativas de Produção Fecal e de Fluxo de Digesta em Bovinos. **R. Bras. Zootec.**, v.34, n.3, p.987-996, 2005.

BIBBY, J., & TOUTENBURG, H. **Prediction and improved estimation in linear models**. Berlin, Germany: John Wiley & Sons, p. 188, 1977.

BODDEY, R.M.; MACEDO, R.; TARRÉ, R.M.; FERREIRA, E.; DE OLIVEIRA, O.C.; REZENDE, C.P.; CANTARUTTI, R.B.; PEREIRA, J.M.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Nitrogen cycling in Brachiaria pastures: the key to understanding the process of pasture decline. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, 103: 389-403, 2004.

CABRAL, L.S.; VALADARES FILHO, S.C.; DETMANN, E.; MALAFAIA, P.A.M.; ZERVOUDAKIS, J.T.; SOUZA, A.L.; VELOSO, R.G.; NUNES, P.M.M. Consumo e digestibilidade dos nutrientes em bovinos alimentados com dietas à base de volumosos tropicais. **R. Bras. Zootec.**, v.35, n.6, p.2406-2412, 2006.

CARVALHO, P.C.F.; KOZLOSKI, G.V.; RIBEIRO FILHO, H.M.N.; REFFATTI, M.V.; GENRO, T.C.M.; EUCLIDES, V.P.B. Avanços metodológicos na determinação do consumo de ruminantes em pastejo. **R. Bras. Zootec.**, v.36, suplemento especial, p.151-170, 2007.

CARVALHO, G.G.P.; GARCIA, R.; PIRES, A.J.V.; SILVA, R.R.; DETMANN, E.; OLIVEIRA, R.L.; RIBEIRO, L.S.O. Long-term Bias of Internal Markers in Sheep and Goat Digestion Trials. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.**, Vol. 26, No. 1: 65-71 January 2013. <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.2011.11408>

CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PEREIRA, J.C.; HENRIQUES, L.T.; FREITAS, S.G.; PAULINO, M.F. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos *in situ*. **R. Bras. Zootec.**, v.37, n.2, p.335-342, 2008.

CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PEREIRA, J.C.; CUNHA, M.; DETMANN, K.S.C.; PAULINO, M.F. Estimação de teores de componentes fibrosos em alimentos para ruminantes em sacos de diferentes tecidos. **R. Bras. Zootec.**, v.38, n.1, p.130-138, 2009.

CASASÚS, I.; ALBANELL, E. Prediction of faecal output and hay intake by cattle from NIRS estimates of faecal concentrations of orally-dosed polyethyleneglycol. **Animal Feed Science and Technology**, 192, 48–61, 2014.

DELWICHE, S. R.; REEVES, J. B., III. The effect of spectral pre-treatments on the partial least squares modeling of agricultural products. **J. Near Infrared Spectrosc.**, 12, 177–182, 2004.

DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T.; VALADARES FILHO, S.C.; EUCLIDES, R.F.; LANA, R.P. QUEIROZ, D.S. Cromo e Indicadores Internos na Determinação do Consumo de Novilhos Mestiços, Suplementados, a Pasto. **Rev. bras. zootec.**, 30(5):1600-1609, 2001.

DETMANN, E.; SOUZA, A.L.; GARCIA, R.; VALADARES FILHO, S.C.; CABRAL, L.S.; ZERVOUDAKIS, J.T. Avaliação do vício de “tempo longo” de indicadores internos em ensaio de digestão com ruminantes. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.1, p.182-188, 2007.

- DIXON, R. M.; COATES, D. B. Application of faecal near infrared spectroscopy to manage the nutrition and productivity of grazing ruminant. In.: BERNARDES, T.F., et al. (Org) **International Conference on Forages in Warm Climates**. Proceedings of the 1st International Conference on Forages in Warm Climates. SUPREMA Gráfica e Editora Ltda, p. 207-230, 2015. ISBN: 978.85.8179.089-3
- DIXON, R.; COATES, D. Review: Near infrared spectroscopy of faeces to evaluate the nutrition and physiology of herbivores. **J. Near Infrared Spectrosc.**, 17, 1–31, 2009.
- DOVE, H.; MAYES, R.W. The use of plant wax alkanes as marker substances in studies of the nutrition of herbivores: a review. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.42, p.913-952, 1991.
- FANCHONE, A.; ARCHIMÈDE, H.; BOVAL, M. Comparison of fecal crude protein and fecal near-infrared reflectance spectroscopy to predict digestibility of fresh grass consumed by sheep. *J. Animal Science*. 87:236-243, 2009. doi: 10.2527/jas.2007-0817
- FERREIRA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; MARCONDES, M.I.; PAIXÃO, M.L.; PAULINO, M.F.; VALADARES, R.F.D. Avaliação de indicadores em estudos com ruminantes: digestibilidade. **R. Bras. Zootec.**, v.38, n.8, p.1568-1573, 2009.
- GARCIA, S.C.; HOLMES, C.W.; HODGSON, J. MACDONALD, A. The combination of the n-alkanes and <sup>13</sup>C techniques to estimate individual dry matter intakes of herbage and maize silage by grazing dairy cows. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, 135, 47-55, 2000.
- GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. **Forage fiber analyses: Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications**. Agriculture Handbook No. 379. 1970.
- GONÇALVES, G.D.; SANTOS, G.T.; JOBIM, C.C.; DAMASCENO, J.C.; CECATO, U.; BRANCO, A.F. Determinação do Consumo, Digestibilidade e Frações Protéicas e de Carboidratos do Feno de Tifton 85 em Diferentes Idades de Corte. **R. Bras. Zootec.**, v.32, n.4, p.804-813, 2003.
- HELLWING, A.L.F.; LUND, P.; WEISBJERG, M.R.; OUDSHOORN, F.W.; MUNKSGAARD, L.; Kristensen, T. Comparison of methods for estimating herbage intake in grazing dairy cows. **Livestock Science**, 176, 61–74, 2015.
- HOLDEN, L. A. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 8, p. 1791-1794, Aug. 1999.
- HOLECHEK, J.L., WOFFORD, H., ARTHUN, D. et al. Evaluation of total fecal collection for measuring cattle forage intake. **J. Range Manag.**, 39 (1):2-4, 1986.
- HUHTANEN, P., K. KAUSTELL; S. JAAKKOLA. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. **Anim. Feed Sci. Technol.**, 48:211–227, 1994.
- ÍTAVO, L.C.V.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, F.F.; VALADARES, R.F.D.; CECON, P.R.; ÍTAVO, C.C.B.F.; MORAES, E.H.B.K.; PAULINO; P.V.R. Consumo, Degradabilidade Ruminal e Digestibilidade Aparente de Fenos de Gramíneas do Gênero *Cynodon* e Rações Concentradas Utilizando Indicadores Internos. **R. Bras. Zootec.**, v.31, n.2, p.1024-1032, 2002 (suplemento).
- JONES, R., LUDLOW, M., TROUGHTON, J. Estimation of the proportion of C3 and C4 plant species in diet of animals from the ratio of natural <sup>12</sup>C and <sup>13</sup>C isotopes in the faeces. **J. Agric. Sci.**, 18:91–100, 1979.

- KRIZSAN, S. J. & HUHTANEN, P. Effect of diet composition and incubation time on feed indigestible neutral detergent fibre concentration in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, 96: 1715-1726, 2013.
- KRIZSAN, S.J., NYHOLM, L., NOUSIAINEN, J., SÜDEKUM, K.-H., HUHTANEN, P. Comparison of in vitro and in situ methods in evaluation of forage in vivo organic matter digestibility in ruminants. **J. Anim. Sci.**, 90, 3162–3173, 2012.
- KRIZSAN, S.J.; RINNE, M.; NYHOLM, L.; HUHTANEN, P. New recommendations for the ruminal in situ determination of indigestible neutral detergent fibre. **Animal Feed Science and Technology**, 205, 31–41, 2015.
- LIPPKE, H.; ELLIS, W.C.; JACOBS, B.F. Recovery of indigestible fiber from feces of sheep and cattle on forage diets. **Journal of Dairy Science**, v.69, n.2, p.403-412, 1986.
- MACEDO, R.; TARRÉ, R.M.; FERREIRA, E.; REZENDE, C.P.; PEREIRA, J.M.; CADISCH, G.; ROUWS, J.R.C.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Forage intake and botanical composition of feed for cattle fed Brachiaria / legume mixtures. **Sci. Agric.**, (Piracicaba, Braz.), v.67, n.4, p.384-392, July/August 2010
- MARTINS, M.B.; DUCATTI, C.; MARTINS, C.L.; DENADAI, J.C.; NATEL, A.S.; SOUZA-KRULISKI, C.R.; SARTORI, M.M.P. Stable isotopes for determining carbon turnover in sheep feces and blood. **Livestock Science**, 149, 137–142, 2012.
- MAYER, D. G., STUART, M. A., & SWAIN, A. J. Regression of realworld data on model output: An appropriate overall test of validity. **Agricultural Systems**, 45, 93–104, 1994.
- MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International, Arlington**, v. 85, n. 6, p. 1217-1240, Nov./Dec. 2002.
- MINSON, D. J., LTTDLOW, M. M. & TBOTJIGHTON, J. H. Differences in natural carbon isotope ratios of milk and hair from cattle grazing tropical and temperate pastures. **Nature**, 256, 602, 1975.
- NOCEK, J.E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.2051-2069, 1988.
- NUNES, CLEITON A., FREITAS, MATHEUS P., PINHEIRO, ANA CARLA M., & BASTOS, SABRINA C. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 23(11), 2003-2010, 2012. Epub November 30, 2012. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532012005000073>. Available: <http://ufla.br/chemoface/>
- PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 198-219, Mar./Abr. 2003.
- RODRIGUES, P.H.M.; GOMES, R.C.; SIQUEIRA, R.F.; MEYER, P.M.; RODRIGUES, R.R. Acurácia, precisão e robustez das estimativas da digestibilidade aparente da matéria seca determinada com o uso de indicadores em ovinos. **R. Bras. Zootec.**, v.39, n.5, p.1118-1126, 2010.
- SÁ, A. JR, CARVALHO, L. G., SILVA, F. F., & CARVALHO ALVES, M. Application of the Koppen classification for climatic zoning in the state of Minas Gerais, Brazil. **Theoretical and Applied Climatology**, 108, 1–7, 2012.

SAS. **Procedures guide for computers**, v. 9.0. Cary, NC, USA: SAS Institute, 2002.

SENGER, C.C.D.; KOZLOSKI, G.V.; SANCHEZ, L.M.B.; MESQUITA, F.R.; ALVES, T.P.; CASTAGNINO, D.S. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**. 146, 169–174, 2008. doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.12.008.

SOARES, J.P.G., AROEIRA, L.J.M., DERESZ, F. et al. Avaliação do consumo de vacas em lactação, medido em sistema “calangates” e estimado pelo óxido crômico. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36, 1999, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SBZ, 1999. p.275.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

TEDESCHI, L. O. Assessment of the adequacy of mathematical models. *Agricultural Systems*, 89, 225–247, 2006.

THEIL, H. Economic forecasts and policy. In R. STROTZ, J. TINBERGEN, P. J. VERDOORN, & H. J. WITTEVEEN (Eds.). **Contributions to Economic Analysis**. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, p. 6–48, 1961.

TILLEY, J.A.; TERRY, A.R. A two-stage technique for in vitro digestion of forage crops. **Journal British Grassland Society**, v.18, n.1, p.104-111, 1963

VALENTE, T.N.P., DETMANN, E., Sampaio, C.B. Review: recent advances in evaluation of bags made from different textiles used in situ ruminal degradation. **Can. J. Anim. Sci.** 95, 493–498, 2015.

VALENTE, T.N.P., DETMANN, E., VALADARES FILHO, S.C., CUNHA, M., QUEIROZ, A.C., SAMPAIO, C.B. In situ estimation of indigestible compounds contents in cattle feed and feces using bags made from different textiles. **Rev. Bras. Zootec.** 40, 666–675, 2011.

WALKER, J.W.; CLARK, D.H.; MCCOY, S.D. Fecal NIRS for predicting percent leafy spurge in diets. **J. Range Manage.** 51, 450, 1998. doi: 10.2307/4003333

WALKER, J.W.; MCCOY, S.D.; LAUNCHBAUGH, K.L.; FRAKER, M.J.; POWELL, J. Calibrating fecal NIRS equations for prediction botanical composition of diets. **J. Range Manage.** 55, 374 p., 2002. doi: 10.2307/4003474

WESTAD, F.; MARTENS, F. Variable selection in near infrared spectroscopy based on significance testing in partial least square regression. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, West Sussex, v. 8, n. 1, p. 117-124, Jan. 2000.

ZEOULA, L.M.; PRADO, I.N.; DIAN, P.H.M.; GERON, L.J.V.; NETO, S.F.C.; MAEDA, E.M.; PERON, P.P.; MARQUES, J.A.; FALCÃO, A.J.S. Recuperação Fecal de Indicadores Internos Avaliados em Ruminantes. **R. Bras. Zootec.**, v.31, n.4, p.1865-1874, 2002.

## ARTIGO 2 - ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* SÃO MICROSIMBIONTES DE *Arachis pintoii* EM DUAS CONDIÇÕES EDÁFICAS E CLIMÁTICAS

### RESUMO

O uso de gramíneas em consórcio com amendoim forrageiro (*Arachis pintoii*) em pastagens é crescente e promissor, pois essa leguminosa forrageira possui hábito de crescimento estolonífero e tolera maiores intensidades de desfolhação. No entanto, poucos estudos são disponíveis sobre sua simbiose com bactérias fixadoras de N<sub>2</sub>. Objetivou-se avaliar a diversidade fenotípica e genética, e a eficiência de estirpes de bactérias isoladas de nódulos de *Arachis pintoii* estabelecidos em áreas de pastagens consorciadas com gramíneas. Nódulos de raízes da leguminosa forrageira *A. pintoii*, cultivares Mandobi e Belomonte foram coletados em Itabela-BA e Lavras-MG. As áreas de coletas possuíram características físicas e químicas contrastantes. Foram amostradas 10 plantas coletando-se cinco nódulos por planta. Posteriormente, os nódulos foram hidratados por 30 min em água destilada esterilizada, seguido de desinfestação superficial por 30 s em álcool, 3 min em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10%) e lavados seis vezes em água destilada esterilizada. Os nódulos foram macerados em placas com meio 79 e incubadas a 28 °C até o aparecimento das colônias. As colônias foram repicadas até obtenção de cultura pura. Foi realizado a análise das características culturais (tempo de crescimento e alteração do pH do meio de cultura) das estirpes, o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e avaliação da capacidade simbiótica em plantas de *A. pintoii*. A capacidade simbiótica foi avaliada em experimento em casa de vegetação com garrafas long neck (500 mL), preenchidas com solução nutritiva, em condições axênicas, em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Foi realizada avaliação da eficiência simbiótica das estirpes em *A. pintoii* cv. Mandobi em tubetes de polipropileno contendo uma mistura de areia e vermiculita. Os resultados de cada experimento foram submetidos ao teste de normalidade e análise de variância utilizando o software SISVAR. As médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Foram obtidas 76 estirpes bacterianas a partir do isolamento dos nódulos do amendoim forrageiro, sendo 40 de Itabela-BA e 36 de Lavras-MG. No experimento com as estirpes de Itabela-BA, 17 apresentaram nodulação e, no experimento com as estirpes de Lavras-MG, 14. O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foi obtido para 50 estirpes, 31 da Bahia e 19 de Minas Gerais. As estirpes de nódulos de amendoim forrageiro de áreas de pastagem de Itabela-BA foram identificadas nos seguintes gêneros: *Bradyrhizobium* (22), *Rhizobium* (5), *Burkholderia* (2), *Kocuria* (1) e *Paenibacillus* (1). As estirpes oriundas de solos de Lavras-MG foram identificadas nos gêneros: *Bradyrhizobium* (13), *Rhizobium* (2), *Burkholderia* (2), *Mucilaginibacter* (1) e *Enterobacter* (1). Foram identificadas 24 estirpes nativas com capacidade de nodulação no amendoim forrageiro. As estirpes 05-153, 05-163, 05-98 e 05-133 mostraram-se promissoras e com potencial para realizar um processo de simbiose mais eficiente entre a planta e a bactéria. O amendoim forrageiro é capaz de nodular somente em simbiose com algumas estirpes do gênero *Bradyrhizobium* e algumas estirpes nativas isoladas foram mais eficientes em nodular o amendoim forrageiro que as estirpes atualmente aprovadas como inoculante.

**Palavras-chave:** Diversidade. Eficiência simbiótica. Amendoim forrageiro.

## ABSTRACT

The use of grasses mixed with forage peanut (*Arachis pintoii*) in pastures is growing and promising, because this forage legume has a stoloniferous habit of growth and tolerates greater defoliation intensities. However, few studies are available on its symbiosis with N<sub>2</sub>-fixing bacteria. The objective of this study was to evaluate the phenotypic and genetic diversity, and efficiency of strains of bacteria isolated from *Arachis pintoii* nodules established in grassland areas. Root nodules of the forage legume *A. pintoii*, cultivars Mandobi and Belomonte were collected in Itabela-BA and Lavras-MG. Collection areas had contrasting physical and chemical characteristics. Ten plants were sampled collecting five nodules per plant. Subsequently, the nodules were hydrated for 30 min in sterilized distilled water, followed by superficial disinfection for 30 s in alcohol, 3 min in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10%) and washed six times in sterile distilled water. The nodules were macerated plates containing the medium 79 and incubated at 28 ° C until the colonies appeared. The colonies were harvested until obtaining pure culture. Analysis of the cultural characteristics (growth time and pH change of the culture medium) of the strains, partial sequencing of the 16S rRNA gene and evaluation of the symbiotic capacity in plants of *A. pintoii* were performed. The symbiotic capacity was evaluated in a greenhouse experiment with long neck bottles (500 mL), filled with nutrient solution, under axenic conditions, in a completely randomized design with four replications. An evaluation of the symbiotic efficiency of strains in *A. pintoii* cv. Mandobi in polypropylene tubes containing a mixture of sand and vermiculite. The results of each experiment were submitted to normality test and analysis of variance using SISVAR software. The means of the treatments were grouped by the Scott-Knott test, at 5% probability. Seventy-six bacterial strains were obtained from the isolation of forage peanut nodules, 40 from Itabela-BA and 36 from Lavras-MG. In the experiment with the Itabela-BA strains, 17 presented nodulation and, in the experiment with the Lavras-MG strains, 14. Partial sequencing of the 16S rRNA gene was obtained for 50 strains, 31 from Bahia and 19 from Minas Gerais. The strains of forage peanut nodules from pasture areas of Itabela-BA were identified in the following genera: *Bradyrhizobium* (22), *Rhizobium* (5), *Burkholderia* (2), *Kocuria* (1) and *Paenibacillus* (1). The strains from Lavras-MG soils were identified in the genus *Bradyrhizobium* (13), *Rhizobium* (2), *Burkholderia* (2), *Mucilaginibacter* (1) and *Enterobacter* (1). Twenty - four native strains with nodulation capacity were identified in forage peanuts. Strains 05-153, 05-163, 05-98 and 05-133 were promising and with the potential to carry out a more efficient symbiosis process between the plant and the bacteria. The forage peanut is able to nodulate only in symbiosis with some strains of the genus *Bradyrhizobium* and some isolated native strains were more efficient at nodulating the forage peanut than the strains currently approved as inoculant.

**Keywords:** Diversity. Symbiotic efficiency. Forage peanut.

## 1. INTRODUÇÃO

A maior parte das áreas de pastagem no Brasil está em processo de degradação devido à falta de reposição dos nutrientes e manejo inadequado do pastejo. Além disso, a reduzida atividade biológica do solo em função do baixo teor de matéria orgânica limita a manutenção dos processos biológicos realizados pela microbiota, atributos de fertilidade e ciclagem de nutrientes.

A solução para aumentar a longevidade produtiva de pastagens nas regiões tropicais, minimizando o uso de fertilizantes químicos, passa necessariamente pelo plantio de leguminosas forrageiras em consórcio com gramíneas. As leguminosas podem formar simbiose com rizóbio e suprir a carência de nitrogênio (N) do sistema, possibilitando a manutenção da atividade biológica do solo e fornecendo substrato para atividade dos microrganismos, que são, em sua maioria, quimiorganotróficos. Portanto, a fixação biológica de  $N_2$  (FBN) é um dos processos mais importantes realizados em benefício da produção vegetal com potencial de minimizar os efeitos da degradação em áreas de pastagem.

O amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) é uma leguminosa perene da família Fabaceae (antiga Leguminosae) e subfamília Papilionoideae. É uma planta herbácea e hábito de crescimento estolonífero com origem na América do Sul. O uso do amendoim forrageiro em consórcio com gramíneas é uma alternativa promissora devido a FBN, capacidade de propagação vegetativa, adaptação a solos de menor fertilidade, persistência quando submetido à desfolhação, além de melhorar o valor nutritivo da dieta dos animais (GONZALEZ et al., 1996; PURCINO et al., 1997; MIRANDA et al., 2003, TAMELE et al., 2017).

Existe grande diversidade de bactérias fixadoras de  $N_2$  no solo, porém, a relação de simbiose depende da especificidade da espécie vegetal com o microsimbionte. Foi relatado que o *A. pintoi* é uma espécie que pode nodular com estirpes nativas, porém, a simbiose pode ser pouco efetiva em solos de regiões tropicais, incluindo solos de cerrado (PINTO et al., 1999). Percebe-se que nos poucos estudos realizados até o momento, não foram encontrados relatos sobre a diversidade genética das populações nativas de rizóbio nodulando *A. pintoi* em condições naturais (PURCINO et al., 2000). Além disso, são necessários estudos mais amplos para concluir sobre a especificidade e eficiência da FBN das estirpes nativas.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade fenotípica, genética e a eficiência de estirpes de bactérias isoladas de nódulos de *Arachis pintoi* estabelecidos em áreas de pastagens consorciadas com gramíneas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 ORIGEM DAS ESTIRPES

Foram coletadas raízes da leguminosa forrageira *Arachis pintoi*, cultivares Mandobi e Belomonte, contendo nódulos ativos, dos quais foi realizado o isolamento de bactérias presentes em seu interior. As coletas foram realizadas em pastagens estáveis nos municípios de: Itabela-BA e Lavras-MG. Em Itabela, a coleta foi realizada na Estação de Zootecnia do Extremo Sul (ESSUL), da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) (16° 48' S e 39° 30' O), a 150 metros de altitude, em maio/2015. A área está sob o domínio do ecossistema de Mata Atlântica e o clima local é uma transição entre os tipos Af e Am (sistema Köppen), com precipitação anual de 1311 mm e temperatura média de 25 °C, sem estação seca definida. O solo é argissolo vermelho-amarelo, ácido, arenoso (>700 g de areia/kg) nos 20 cm superficiais. Em Lavras-MG, a coleta foi realizada em área pertencente ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (21° 14' S e 44° 58' O), a 918 metros de altitude, em janeiro/2016. O clima da região é classificado como Cwa (sistema Köppen), temperado chuvoso (mesotérmico) com inverno seco e verão chuvoso (SÁ JUNIOR et al., 2012), com precipitação anual de 1530 mm e temperatura média de 19 °C. O solo da área experimental foi classificado como Latossolo Vermelho distrófico típico de textura muito argilosa. Nas duas localidades as pastagens consorciadas entre *Arachis pintoi* e *Brachiaria brizantha* foram estabelecidas há mais de 10 anos e nunca receberam nenhum tipo de inoculação. As características físicas e químicas dos locais de coleta encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Características físicas e químicas dos solos nos locais de coleta de nódulos

Local	M.O.				Argila		Silte		Areia	
	dag kg <sup>-1</sup>									
Itabela-BA	2,5				20		2		78	
Lavras-MG	5,1				55		13		32	

Local	pH	K	P	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	T	T	V	m
Itabela-BA	5,7	70,0	2,0	1,9	0,5	0,2	2,9	2,6	2,8	5,5	47,1	7,2
Lavras-MG	5,8	120,0	2,6	2,7	1,1	0,1	3,2	4,1	4,2	7,4	55,9	2,4

pH em água, KCl e Ca Cl<sub>2</sub> – Relação 1:2,5; K-P = Extrator Mehlich 1; Ca-Mg-Al = Extrator KCl 1 mol L<sup>-1</sup>; H+Al = Extrator SMP; SB = Soma de bases trocáveis; CTC (t) = Capacidade de troca catiônica efetiva; CTC (T) = Capacidade de troca catiônica a pH 7,0; V = Índice de saturação de bases; m = índice de saturação de alumínio; Mat. Org. (M.O.) = Oxidação Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 4N+H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10N.

Os pontos de coleta foram demarcados a partir de caminhamento em linha reta, espaçados 10 metros entre si. Em cada local, foram coletadas 10 plantas, de onde foram retirados 5 nódulos por planta, totalizando 50 nódulos por local. As raízes das plantas com nódulos foram lavadas com água corrente para limpeza e armazenadas em frascos de vidro com sílica gel e algodão. Os recipientes foram transportados para o Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo/UFLA e armazenados em baixa temperatura (4 °C) até a desinfestação superficial dos nódulos e isolamento.

## **2.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO CULTURAL**

Para o isolamento, os nódulos foram lavados e hidratados por 20 minutos em água destilada esterilizada. Posteriormente, foram desinfestados superficialmente com álcool etílico 96% por 30 segundos, seguido por três minutos em peróxido de hidrogênio (10%) e seis lavagens em água destilada esterilizada. Os reagentes e água utilizados para desinfestação dos nódulos foram trocados após o isolamento de nódulos a cada três plantas. Os nódulos foram macerados em placas de Petri contendo meio de cultura 79 sólido (FRED & WAKSMAN, 1928) e o líquido obtido foi espalhado em forma de estrias compostas para a obtenção de colônias isoladas. Os diferentes morfotipos observados foram repicados até a obtenção de colônias puras.

Com as colônias bacterianas purificadas, as seguintes características culturais foram avaliadas: tempo de crescimento, avaliado pelo tempo de formação de colônias isoladas (rápido: 1 a 3 dias; intermediário: 4 a 5 dias; lento: 6 a 10 dias; muito lento: acima de 10 dias), diâmetro médio das colônias isoladas; produção de muco (escassa, pouca, moderada e abundante); absorção de indicador; coloração das colônias e modificação do pH do meio (ácido, alcalino ou neutro), conforme Moreira et al. (1993). Os isolados foram armazenados em glicerol 20% a -80 °C, em água destilada esterilizada em temperatura ambiente, e liofilizados.

## **2.3 AUTENTICAÇÃO DOS ISOLADOS EM CASA DE VEGETAÇÃO**

Foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação para confirmar a capacidade dos isolados em estabelecer simbiose com seu hospedeiro de origem (amendoim forrageiro). Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação no Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo do Departamento de Ciência do Solo (DCS) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras-MG. O primeiro foi conduzido de maio a junho/2016, utilizando os isolados provenientes de Itabela-BA, e o segundo foi conduzido de agosto a setembro/2016 utilizando os isolados provenientes de Lavras-MG. Além dos isolados de cada local, foram

incluídos dois controles positivos inoculados com as estirpes aprovadas pelo MAPA como inoculante para o amendoim forrageiro, MGAP13 (SEMIA 6440) (PINTO et al., 1999) e NC230 (SEMIA 6439) (PURCINO et al., 2000), identificadas como *Bradyrhizobium* sp., e dois controles não inoculados, um com baixa e o outro com alta concentração de N mineral (5,25 mg L<sup>-1</sup> e 52,5 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente), e quatro estirpes aprovadas pelo MAPA como inoculante para a cultura da soja BR29 (SEMIA5019), BR85 (SEMIA5079), BR86 (SEMIA5080) e BR96 (SEMIA587), todas identificadas no gênero *Bradyrhizobium*. Os experimento foram conduzidos com quatro repetições e delineamento inteiramente casualizado.

As plantas de amendoim forrageiro foram cultivadas em garrafas de vidro âmbar tipo *long neck* (500 mL), contendo fitas de papel filtro utilizadas como suporte para o desenvolvimento das raízes, preenchidas com de solução nutritiva (HOAGLAND & ARNON, 1950), e cobertas com papel alumínio. Nos tratamentos inoculados e no controle sem inoculação e com baixa concentração de N mineral foi utilizada solução nutritiva modificada, com um quarto de força e baixa concentração de N (5,25 mg L<sup>-1</sup>). No controle sem inoculação e com alta concentração de N mineral, foi utilizada a solução nutritiva completa, com 52,5 mg L<sup>-1</sup> de N. Após o preparo, as garrafas contendo a solução nutritiva foram autoclavadas por 40 minutos à pressão de 1,5 kg cm<sup>-2</sup> e 121 °C.

Antes da semeadura, a vagem que cobre as sementes foi retirada manualmente. As sementes de amendoim forrageiro cv. Mandobi foram desinfestadas superficialmente utilizando 15 segundos de imersão em álcool etílico 96%, seguida de hipoclorito de sódio (1,5% NaClO) durante 30 segundos e seis lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. Após a desinfestação, as sementes foram colocadas em papel filtro umedecidos com água destilada esterilizada, colocadas em sacos plásticos de polietileno transparentes abertos e não perfurados (COIMBRA et al., 2007), e colocados em BOD a 28 °C por 72 horas ou até emissão de radícula. No plantio, foi utilizado uma semente por garrafa. Antes de colocar as sementes, o papel filtro foi autoclavado à pressão de 1,5 kg cm<sup>-2</sup> e 121 °C por 30 minutos e umedecidos com água destilada esterilizada, conforme Brasil (2009).

Para o preparo dos inoculantes, em ambos experimentos, as estirpes bacterianas foram cultivadas em meio de cultura 79 líquido (FRED & WAKSMAN, 1928), sob agitação de 110 rpm, a 28 °C, por um período de 2 (crescimento rápido) e 5 dias (crescimento intermediário/lento), de acordo com o tempo de crescimento de cada estirpe. Para os tratamentos inoculados cada semente

pré-germinada recebeu 1 mL de cultura bacteriana ( $10^9$  células mL<sup>-1</sup>). Nos controles sem inoculação, foi adicionado 1 mL do meio de cultura 79 líquido sem inóculo por semente pré-germinada.

Ambos experimentos foram conduzidos por 35 dias. Em média, as temperaturas mínimas e máximas foram, respectivamente, 15 e 30 °C para o primeiro experimento (estirpes de Itabela-BA), e 19 e 38 °C para o segundo experimento (estirpes de Lavras-MG).

Ao final do experimento, as plantas foram colhidas para determinação do número de nódulos (NN), produção de matéria seca de nódulos (MSN), produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) e produção de matéria seca de raiz (MSR). Para a determinação do NN, os nódulos foram destacados das raízes e contados. Os nódulos foram colocados em frascos de vidro vedados com algodão, e a parte aérea e raiz acondicionadas em sacos de papel. Para determinar a MSN, MSPA e MSR, as amostras foram colocadas em estufa de circulação forçada à 55 °C até atingir peso constante.

Os resultados de cada experimento foram submetidos ao teste de normalidade e análise de variância utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011). Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. As médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

#### **2.4 EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S RRNA DAS ESTIRPES BACTERIANAS**

As estirpes isoladas foram crescidas em meio 79 sólido à 28 °C, para novamente avaliar a pureza, por meio de estrias compostas e em microscópio estereoscópico. Após a confirmação da pureza, foi realizado a extração de DNA pela metodologia de lise alcalina (NIEMANN et al., 1997), com células crescidas em meio 79 sólido, de acordo com o tempo de crescimento de cada isolado. Foram utilizados dois e cinco dias de cultivo para as estirpes de crescimento rápido e lento, respectivamente.

Para identificação genética das estirpes foi realizado o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada utilizando os pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 27F (GAGTTTGACCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (LANE, 1991). Alíquotas de 5 µL do *template* de DNA foram utilizadas para 50 µL de reação de PCR. O volume final dos reagentes por reação foi de: 5 µL de tampão KCl para PCR (10X), 5 µL dNTP Mix (0,2 mM de cada), 4 µL (2,5 mM) de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL

de cada primer (10  $\mu$ M), 0,4  $\mu$ L (5U) de Taq DNA Polimerase e água estéril ultra pura para completar o volume da reação. Para a reação de amplificação foi utilizado termociclador Eppendorf Mastercycler® (Alemanha) nas seguintes condições: desnaturação inicial (94 °C por 5 minutos), 35 ciclos de desnaturação (94 °C por 40 segundos), anelamento (55 °C por 40 segundos), extensão (72 °C por 1 minuto e 30 segundos) e uma extensão final (72 °C por 7 minutos). Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1%, corado com SYBR Safe (Invitrogen) e visualizado sob luz UV. A eletroforese foi realizada em tampão TAE 1X a 110V durante 40 minutos.

Os produtos de PCR foram encaminhados ao laboratório da Macrogen, na Coréia do Sul, para purificação e sequenciamento. Para avaliar a qualidade das sequências obtidas foi usado o programa BioNumerics 7.6 (AppliedMaths, Austin, TX, EUA) e, após isso, estas foram submetidas ao programa BLASTn (Bethesda, MD, EUA) para comparação com sequências similares já depositadas no GenBank, do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

## **2.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA**

Para a construção da árvore filogenética, foram selecionadas as estirpes identificadas no gênero *Bradyrhizobium*, com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, e que apresentaram número de nucleotídeos superiores a 1000. Após comparação com o banco de dados do Genbank (National Center for Biotechnology Information, NCBI), as sequências foram alinhadas usando o ClustalW Multiple Alignment algoritmo no Bioedit. A árvore filogenética foi construída usando o método Neighbor-Joining usando o modelo parâmetro Kimura 2 (Kimura, 1980) disponível no pacote de software Análise Genética Evolutiva Molecular (MEGA, versão 6) (Tamura et al., 2011). Para comparação, o alinhamento incluiu duas seqüências de estirpes de *Bradyrhizobium* aprovadas pelo MAPA como inoculante para o *A. pintoi*, a MGAP13 (SEMIA 6440) e NC230 (SEMIA 6439).

## **2.6 EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DAS ESTIRPES ISOLADAS**

Para a avaliação da eficiência simbiótica das estirpes em *Arachis pintoi* cv. Mandobi foi instalado um experimento em casa de vegetação no período de maio a julho de 2017. As plantas foram cultivadas em tubetes de polipropileno com capacidade volumétrica de 250 cm<sup>3</sup> contendo uma mistura de areia e vermiculita na proporção de 1:1 (v:v) e adicionada solução (HOAGLAND e ARNON, 1950) esterilizada, de acordo com a necessidade das plantas.

Os tratamentos consistiram na inoculação das estirpes que foram capazes de nodular o amendoim forrageiro nos testes de autenticação. Acrescidos de duas estirpes controles aprovadas como inoculante pelo MAPA para o amendoim forrageiro, MGAP13 (SEMIA 6440) e NC230 (SEMIA 6439) e dois controles não inoculados, um com baixa e o outro com alta concentração de N mineral ( $5,25 \text{ mg L}^{-1}$  e  $52,5 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente), para comprovar a ausência de contaminação e para comparação com as plantas inoculadas.

Para a inoculação, as estirpes selecionadas foram crescidas em meio 79 líquido sob agitação de 110 rpm, a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , por um período de 2 (crescimento rápido) e 5 dias (crescimento intermediário/lento), de acordo com o tempo de crescimento de cada estirpe. Foram plantadas duas sementes de amendoim forrageiro por tubete e inoculado 1 mL da suspensão bacteriana na fase log em cada semente. Após uma semana de plantio foi feito o desbaste restando apenas uma planta por tubete.

Os experimentos foram conduzidos por 50 dias em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições e após esse período foi analisado o NN, MSN, MSPA e MSR, conforme procedimento descrito na autenticação. O índice SPAD foi avaliado utilizando o aparelho medidor de clorofila SPAD-502 Plus Konica.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 ISOLAMENTO**

Foram obtidas 76 estirpes bacterianas a partir do isolamento dos nódulos do amendoim forrageiro, sendo 40 de Itabela-BA e 36 de Lavras-MG.

#### **3.2 AUTENTICAÇÃO DAS ESTIRPES ISOLADAS DOS NÓDULOS**

Nos experimentos para autenticação das estirpes de amendoim forrageiro, os controles negativos (sem inoculação e com solução nutritiva com baixa ou alta concentração de N) não apresentaram nodulação, indicando que não houve nenhum tipo de contaminação em ambos experimentos. As plantas inoculadas com a estirpe NC230 aprovada para o amendoim forrageiro não apresentaram nódulos em nenhum dos experimentos de autenticação, por outro lado, as plantas inoculadas com a estirpe MGAP13 apresentaram nodulação somente no segundo experimento de autenticação. As plantas inoculadas com as quatro estirpes aprovadas como inoculante para a cultura da soja SEMIA 5019 (BR29), SEMIA 5079 (BR85), SEMIA 5080 (BR86), SEMIA 587 (BR96) não apresentaram nódulos em nenhum dos experimentos.

A produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) do tratamento com nitrogênio foi superior ( $P < 0,05$ ) ao dos demais tratamentos nos dois experimentos. No experimento com as estirpes de Itabela-BA (Tabela 2), das 40 estirpes isoladas, 17 apresentaram nodulação. A MSPA variou de 0,35 (controle com alta concentração de N mineral) a 0,09 g por planta. Em média a produção da parte aérea de todos os tratamentos foi 0,140 g, correspondendo a 40% da parte aérea do controle com alta concentração de N mineral. As estirpes 05-133, 05-134 e 05-109 apresentaram matéria seca de nódulos (MSN) superior em 0,006 g por planta ( $P < 0,05$ ) em relação as demais estirpes. Os menores valores de MSN foram para as estirpes 05-86, 05-87, 05-98, 05-111, 05-125 e 05-126.

Tabela 2. Matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e nódulos (MSN) e número de nódulos (NN) das plantas inoculadas com as estirpes coletadas em Itabela-BA no experimento de autenticação.

Tratamento	Cód. UFLA	MSPA (g/planta)	MSR (g/planta)	MSN (g/planta)	NN (planta)
C/N		0.3513 a	0.2048	-	-
S/N		0.1118 b	0.0658	-	-
BR29		0.1655 b	0.0788	-	-
BR85		0.1623 b	0.0813	-	-
BR86		0.1208 b	0.0718	-	-
BR96		0.0891 b	0.0533	-	-
MGAP13		0.1163 b	0.0695	-	-
NC230		0.1380 b	0.0538	-	-
C1R1A	05-86	0.1318 b	0.0638	0.0018 c	26
C1R1C	05-87	0.1278 b	0.0600	0.0019 c	18
C2R5A	05-88	0.1458 b	0.0733	-	-
C3R3A	05-89	0.1045 b	0.0550	0.0027 b	10
C3R3CA	05-91	0.0955 b	0.0348	-	-
C4R3A	05-93	0.1185 b	0.0375	-	-
C4R3B	05-94	0.1250 b	0.0343	-	-
C4R3C	05-95	0.1430 b	0.0785	-	-
C5R1A	05-96	0.1503 b	0.0643	0.0025 b	32
C5R1B	05-97	0.1450 b	0.0888	0.0039 b	28
C5R2A	05-98	0.1418 b	0.0665	0.0014 c	19
C5R2B	05-99	0.1588 b	0.0803	-	-
C5R4A	05-100	0.1243 b	0.0593	-	-
C6R1AA	05-101	0.1258 b	0.0638	-	-
C6R1AB	05-127	0.1143 b	0.0645	-	-
C6R1C	05-102	0.1498 b	0.0848	-	-
C6R2A	05-103	0.1298 b	0.0655	-	-
C6R2BA	05-132	0.1140 b	0.0790	0.0029 b	35
C6R2C	05-105	0.1338 b	0.0930	-	-
C6R3BA	05-133	0.1850 b	0.1070	0.0058 a	54

C6R3BB	05-134	0.1735 b	0.1193	0.0055 a	25
C6R3CB	05-128	0.1237 b	0.0560	-	-
C6R4CA	05-107	0.1485 b	0.0940	-	-
C6R4CB	05-129	0.1778 b	0.1070	0.0029 b	17
C6R4D	05-108	0.1260 b	0.0270	0.0038 b	14
C6R5A	05-109	0.1628 b	0.0918	0.0066 a	45
C6R5B	05-110	0.1140 b	0.0768	0.0027 b	21
C7R2AB	05-111	0.1283 b	0.0608	0.0008 c	12
C7R5BA	05-112	0.1295 b	0.0635	0.0021 b	27
C8R1B	05-114	0.1473 b	0.0750	-	-
C8R1C	05-115	0.1413 b	0.0378	-	-
C8R1D	05-116	0.1310 b	0.0418	-	-
C8R1EA	05-130	0.0930 b	0.0490	-	-
C8R1EB	05-131	0.1767 b	0.0918	-	-
C8R3D	05-118	0.1680 b	0.1050	-	-
C8R4A	05-119	0.1297 b	0.0803	-	-
C8R5C	05-121	0.1470 b	0.0998	-	-
C8R5D	05-122	0.1708 b	0.0765	-	-
C9R2B	05-125	0.1130 b	0.0710	0.0016 c	21
C9R4A	05-126	0.1417 b	0.0590	0.0019 c	10
C10R4A	05-85	0.1778 b	0.0693	-	-

\*As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott à 5% de probabilidade

No experimento de autenticação das estirpes de Lavras-MG (Tabela 3), das 36 estirpes isoladas, 14 apresentaram nodulação em seu hospedeiro de origem. A MSPA variou de 0,58 a 0,10 g por planta para os controles não inoculados com alta e baixa concentração de N mineral, respectivamente. A MSPA do tratamento controle com alta concentração de N mineral foi superior ( $P < 0.05$ ) aos demais tratamentos. A estirpe 05-163 apresentou MSN superior ( $P < 0.05$ ) aos demais tratamentos, seguida pelas estirpes 05-169, 05-150, U6R5AB e 05-162. A estirpe MGAP13 (aprovada como inoculante) apresentou MSN superior ( $P < 0,05$ ) as estirpes 05-158, 05-157, 05-151, 05-153, 05-152 e 05-172, e igual as estirpes 05-170, 05-156 e 05-171. As estirpes 05-150, 05-163 e 05-162 apresentaram número de nódulos por planta superior ( $P < 0,05$ ) as demais estirpes.

Tabela 3. Matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e nódulos (MSN) e número de nódulos (NN) das plantas inoculadas com estirpes coletadas em Lavras-MG no experimento de autenticação

Tratamento	Cód. UFLA	MSPA (g/planta)	MSR (g/planta)	MSN (g/planta)	NN (planta)
C/N		0.5802 a	0.3065	-	-
S/N		0.1025 b	0.0761	-	-
BR29		0.2936 b	0.2340	-	-
BR85		0.2505 b	0.1653	-	-
BR86		0.1958 b	0.1466	-	-
BR96		0.2242 b	0.1672	-	-
MGAP13		0.2865 b	0.1591	0.0045 c	10 b
NC230		0.2494 b	0.1450	-	-
U1R1A	05-169	0.1905 b	0.0905	0.0079 b	24 a
U1R1B		0.1186 b	0.0792	-	-
U1R2A	05-150	0.1986 b	0.0936	0.0084 b	16 b
U1R2B	05-143	0.2196 b	0.1384	-	-
U1R3A	05-146	0.2022 b	0.1067	-	-
U1R4A	05-145	0.1264 b	0.0878	-	-
U2R1A	05-136	0.1938 b	0.1287	-	-
U2R5AA	05-137	0.3334 b	0.1695	-	-
U3R1AA	05-158	0.1877 b	0.0987	0.0029 d	13 b
U3R1AB	05-170	0.2246 b	0.1677	0.0066 c	14 b
U3R1CA	05-156	0.1815 b	0.1213	0.0066 c	17 b
U3R1CB	05-154	0.2257 b	0.1386	0.0026 d	5 b
U3R2AA	05-171	0.1983 b	0.1323	0.0045 c	7 b
U3R2AAC	05-151	0.1481 b	0.1163	0.0028 d	12 b
U3R2AAD	05-153	0.1999 b	0.1528	0.0017 d	3 b
U3R2AB	05-152	0.2234 b	0.1584	0.0014 d	2 b
U3R2AC	05-172	0.1728 b	0.1150	0.0034 d	14 b
U3R2B	05-155	0.2412 b	0.1954	-	-
U3R3A	05-140	0.1774 b	0.1381	-	-
U3R4A	05-141	0.1714 b	0.1407	-	-
U3R4B	05-144	0.1802 b	0.1586	-	-
U3R5A	05-142	0.2043 b	0.1443	-	-
U4R1A	05-138	0.1558 b	0.1069	-	-
U6R2A	05-149	0.1895 b	0.1333	-	-
U6R5AA	05-163	0.2380 b	0.1520	0.0140 a	30 a
U6R5AB		0.1728 b	0.1327	0.0084 b	16 b
U7R4A	05-159	0.2054 b	0.1528	-	-
U8R1A	05-164	0.2487 b	0.1374	-	-
U8R2A	05-160	0.1631 b	0.0903	-	-
U8R2B	05-166	0.1805 b	0.1314	-	-
U8R2C	05-173	0.2566 b	0.1795	-	-
U9R1B	05-147	0.1706 b	0.1108	-	-
U9R4A	05-165	0.2615 b	0.1427	-	-
U9R5A	05-161	0.2139 b	0.1755	-	-
U10R4A	05-148	0.1362 b	0.0835	-	-
U10R5A	05-162	0.2783 b	0.1670	0.0096 b	26 a

\*As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott à 5% de probabilidade

### 3.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE 16S rRNA

O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foi obtido para 50 estirpes, 31 da Bahia e 19 de Minas Gerais. As estirpes de nódulos de amendoim forrageiro de áreas de pastagem de Itabela-BA foram identificadas nos seguintes gêneros: *Bradyrhizobium* (22), *Rhizobium* (5), *Burkholderia* (2), *Kocuria* e *Paenibacillus*, com uma estirpe cada (Tabela 4). Os gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Burkholderia*, são conhecidos pela sua capacidade de nodular leguminosas. Os gêneros *Kocuria* e *Paenibacillus*, são considerados endofíticos em nódulos. Bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> nodulíferas ou bactérias endofíticas em nódulos podem atuar em outros processos promotores do crescimento vegetal, como na produção de ácido-3-indolacético, solubilização de fosfatos, dentre outros.

O *Arachis pintoi* apresentou, em sua maioria, estirpes de crescimento intermediário a lento que alcalinizam o meio de cultura, com maior ocorrência para o gênero *Bradyrhizobium*. Das 31 estirpes analisadas, constatou-se que apenas o gênero *Bradyrhizobium* foi capaz de nodular *Arachis pintoi*.

Tabela 4. Características culturais, identificação com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de estirpes bacterianas isoladas de nódulos radiculares de *Arachis pintoi* coletados em áreas da de pastagem em Itabela-BA. As sequências das estirpes foram comparadas com base nas sequências mais similares encontradas no GenBank.

Estirpes	Cód. UFLA	Nod.	Caract. Culturais	pb	Sequência mais similar encontrada no GenBank		
					Espécie	Similaridade (%)	Número de acesso
C1R1C	05-87	+	ML/AL	1249	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KU058251.1
C2R5A	05-88	-	L/AL	1274	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	EF569643.1
C3R3A	05-89	+	L/AL	1266	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KU058260.1
C3R3CA	05-91	-	L/AL	1250	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	EF569643.1
C4R3C	05-95	-	L/AL	1173	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	AF216780.1
C5R1A	05-96	+	L/AL	1282	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KU058260.1
C5R2A	05-98	+	ML/AL	1248	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KU058260.1
C5R2B	05-99	-	L/AL	1271	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	EF569643.1
C5R4A	05-100	-	R/N	1262	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KY548125.1
C6R2BA	05-132	+	I/AL	886	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KU058251.1
C6R4CB	05-129	+	I/AL	716	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KU058260.1
C6R4D	05-108	+	I/AL	1256	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KU058260.1
C6R5A	05-109	+	L/AL	1275	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KU058251.1
C6R5B	05-110	+	L/AL	886	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KU058251.1
C7R2AB	05-111	+	L/AL	1255	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KU058260.1
C7R5BA	05-112	+	L/AL	647	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KU058260.1
C8R1D	05-116	-	L/AL	1236	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KT880637.1
C8R1EB	05-131	-	I/AL	1269	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	AF384139.1
C8R3D	05-118	-	L/AL	1251	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	EF569643.1
C8R5D	05-122	-	L/AL	1265	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	AF384139.1
C9R2B	05-125	+	L/AL	691	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KU058251.1
C9R4A	05-126	+	I/AL	442	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KU058260.1
C6R2B	05-104	-	R/N	1262	<i>Rhizobium</i> sp.	99	KF933541.1
C6R3CB	05-128	-	R/AL	535	<i>Rhizobium</i> sp.	100	KY084449.1
C8R1C	05-115	-	I/AL	633	<i>Rhizobium</i> sp.	100	KU163458.1
C8R1EA	05-130	-	R/AL	1298	<i>Rhizobium</i> sp.	99	KY084449.1
C8R5C	05-121	-	R/AL	1263	<i>Rhizobium</i> sp.	100	KU196723.1
C8R1B	05-114	-	R/AL	1288	<i>Burkholderia</i> sp.	100	JF683697.1
C8R4A	05-119	-	R/N	1257	<i>Burkholderia</i> sp.	99	AB982951.1
C6R1A	05-101	-	I/N	612	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	FJ527679.1
C6R4CA	05-107	-	L/AL	1294	<i>Kocuria</i> sp.	100	KC502897.1

Nod. = nodulação; (+) presença e (-) ausência de nódulos em *Arachis pintoi*. Características culturais em meio 79 sólido: tempo crescimento: R-rápido (1-3 dias); I-intermediário (4-5 dias); L-lento (6-10 dias); ML-muito lento (>10 dias). Reação do pH em meio 79 com azul de bromotimol: AC-ácido; N-neutro; AL-alcalino. pb: pares de bases.

As estirpes oriundas de solos de Lavras-MG foram identificadas nos gêneros: *Bradyrhizobium* (13), *Rhizobium* (2), *Burkholderia* (2), *Mucilaginibacter* (1) e *Enterobacter* (1) (Tabela 5). O amendoim forrageiro apresentou nodulação somente com estirpes de crescimento

intermediário a lento que alcalinizam o meio de cultura, identificadas no gênero *Bradyrhizobium*, e dessas, apenas 46% foram capazes de nodular a espécie hospedeira. Nesse local, novamente, estirpes pertencentes aos gêneros *Rhizobium* e *Burkholderia* foram isoladas de nódulos de *A. pintoii*. Os gêneros *Mucilaginibacter* e *Enterobacter*, são considerados endofíticos em nódulos e, também, foram identificados.

Tabela 5. Características culturais, identificação com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de estirpes bacterianas isoladas de nódulos radiculares de *Arachis pintoi* coletados em áreas de pastagem em Lavras-MG. As sequências das estirpes foram comparadas com base nas sequências mais similares encontradas no GenBank.

Estirpes	Cód. UFLA	Nod.	Caract. Culturais	pb	Sequência mais similar encontrada no GenBank		
					Espécie	Similaridade (%)	Número de acesso
U1R1A	05-169	+	L/AL	839	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KU724142.1
U1R2A	05-150	+	I/AL	778	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KU058260.1
U3R1AA	05-158	+	I/AL	662	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KU058260.1
U3R2AAC	05-151	+	L/AL	606	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KU058260.1
U3R2AAD	05-153	+	I/AL	807	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KU058260.1
U3R2B	05-155	-	I/AL	1258	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	EF569643.1
U7R4A	05-159	-	I/AL	679	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KT826559.1
U8R1A	05-164	-	L/AL	1211	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KU058260.1
U8R2A	05-160	-	I/AL	830	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	FR872443.1
U8R2B	05-166	-	L/AL	1137	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KJ658664.1
U9R4A	05-165	-	L/AL	1228	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KU058260.1
U9R5A	05-161	-	I/AL	912	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KU557385.1
U10R5A	05-162	+	L/AL	637	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KU058260.1
U3R4B	05-144	-	R/AC	536	<i>Rhizobium</i> sp.	100	KU305703.1
U3R5A	05-142	-	R/AC	1228	<i>Rhizobium</i> sp.	100	KU305703.1
U1R1B		-	R/AC	813	<i>Burkholderia</i> sp.	100	KY357354.1
U1R3A	05-146	-	R/AC	659	<i>Burkholderia</i> sp.	99	KY357354.1
U2R1A	05-136	-	R/AC	718	<i>Enterobacter</i> sp.	99	KY084459.1
U6R2A	05-149	-	R/AC	1179	<i>Mucilaginibacter</i> sp.	100	KF596619.1

Nod. = nodulação; (+) presença e (-) ausência de nódulos em *Arachis pintoi*. Características culturais em meio 79 sólido: tempo crescimento: R-rápido (1-3 dias); I-intermediário (4-5 dias); L-lento (6-10 dias); ML-muito lento (acima de 10 dias). Reação do pH em meio 79 com azul de bromotimol: AC-ácido; N-neutro; AL-alcalino. pb: pares de bases.

### 3.4 ÁRVORE FILOGENÉTICA

A árvore filogenética foi construída com 20 estirpes que apresentaram mais de 1000 nucleotídeos no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (Figura 1). As estirpes se agruparam em 3 grupos, sendo 10, 7 e 2 estirpes nos grupos 1, 2 e 3, respectivamente. A estirpe UFLA 05-116 se agrupou com um *B. ganzhouense*.

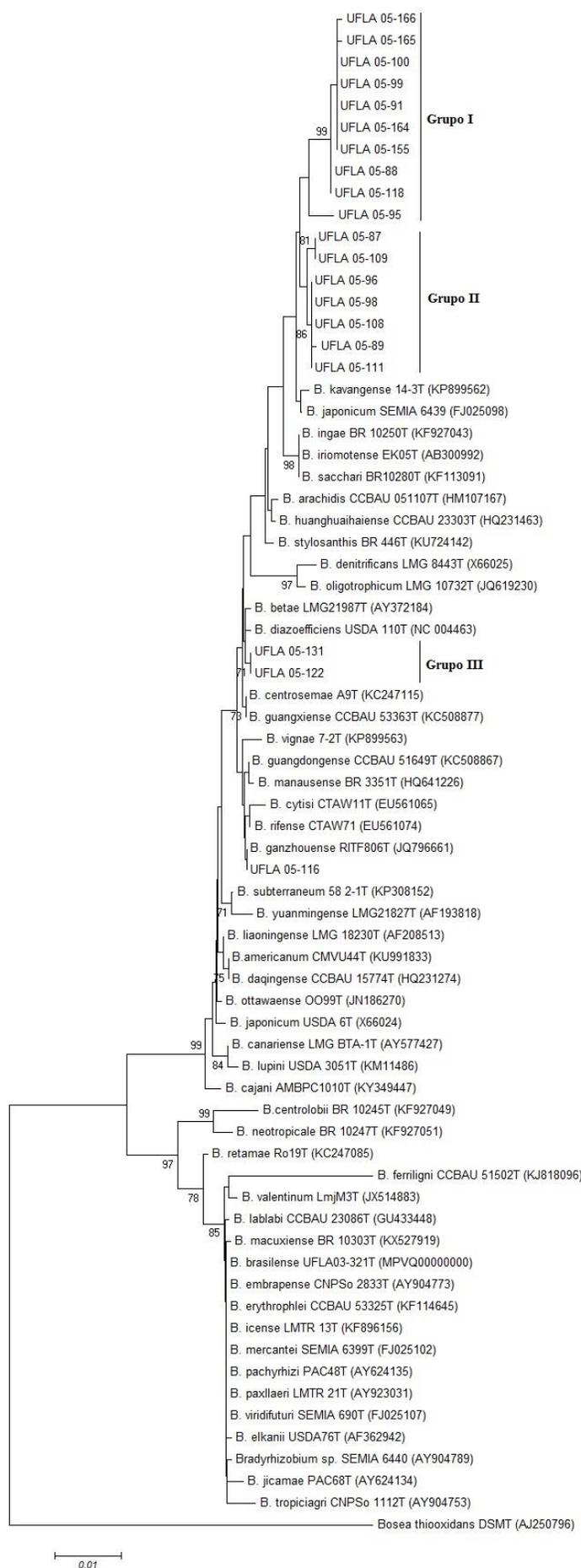


Figura 1. Árvore filogenética Neighbor Joining baseada nas sequências parciais do gene 16S rRNA (1150 bp) de 20 estirpes de *Bradyrhizobium*, as estirpes tipo das espécies de *Bradyrhizobium*, e duas estirpes SEMIA 6439 e 6440, aprovadas como inoculante para *Arachis pintoi* pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Valores de “bootstrap” foram baseados em 1000 testes. Todas posições contêm falhas e perda de dados foram eliminadas do banco de informações. A sequência do gene 16S rRNA *Bosea thiooxidans* DSM9653 foi usada como “outgroup”. Valores de “bootstrap” > 70% são indicativos de nós. O número de acesso ao gene para cada estirpe e SEMIA encontram-se no parênteses. As análises filogenéticas foram conduzidas no Mega 6.

### **3.5 EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DAS ESTIRPES ISOLADAS**

Foram identificadas 24 estirpes nativas com capacidade de nodulação no amendoim forrageiro (Tabela 6). As estirpes controle mostraram-se menos eficientes que diversas estirpes nativas, levando-se em consideração o NN e MSPA. Foram identificadas quatro estirpes que foram superiores as demais estirpes nos cinco parâmetros considerados. As estirpes 05-153, 05-163, 05-98 e 05-133 mostraram-se promissoras e com potencial para realizar um processo de simbiose mais eficiente entre a planta e a bactéria.

Tabela 6. Matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e nódulos (MSN), número de nódulos (NN) e índice SPAD das plantas inoculadas com as estirpes nodulíferas de *A. pintoi* no experimento de eficiência.

Tratamento	Cód. UFLA	MSPA (g/planta)	MSR (g/planta)	MSN (g/planta)	NN (planta)	SPAD
C/N		0,4497 b	0,3585 a	0,0000 c	0 d	46,11 a
S/N		0,3459 b	0,2030 b	0,0000 c	0 d	22,10 c
MGAP13		0,4543 b	0,3125 b	0,0063 b	39 c	25,33 c
NC230		0,4279 b	0,3099 b	0,0000 c	0 d	23,86 c
U1R1A	05-169	0,5977 a	0,2883 b	0,0194 a	164 a	39,33 b
U1R2A	05-150	0,5743 a	0,3004 b	0,0179 a	148 a	42,53 a
U3R1AA	05-158	0,6191 a	0,3385 a	0,0140 a	167 a	37,13 b
U3R1AB	05-170	0,4975 b	0,3490 a	0,0163 a	130 a	42,83 a
U3R2AAC	05-151	0,5331 b	0,2712 b	0,0137 a	112 a	39,55 b
U3R2AAD	05-153	0,6284 a	0,3353 a	0,0191 a	140 a	47,53 a
U6R5AA	05-163	0,7196 a	0,4372 a	0,0195 a	137 a	42,66 a
U6R5AB		0,5638 a	0,3179 b	0,0131 a	115 a	42,24 a
U10R5A	05-162	0,5828 a	0,3246 a	0,0143 a	83 b	40,87 b
C1R1C	05-87	0,5593 a	0,3483 a	0,0131 a	97 b	45,39 a
C3R3A	05-89	0,5354 b	0,3370 a	0,0116 a	70 b	43,42 a
C5R1A	05-96	0,5866 a	0,2846 b	0,0077 b	60 b	44,70 a
C5R2A	05-98	0,6342 a	0,3899 a	0,0176 a	131 a	42,44 a
C6R2BA	05-132	0,6885 a	0,4113 a	0,0142 a	94 b	42,38 a
C6R3BA	05-133	0,6013 a	0,4072 a	0,0150 a	133 a	43,64 a
C6R3BB	05-134	0,6724 a	0,4442 a	0,0132 a	107 b	43,68 a
C6R4CB	05-129	0,4509 b	0,1927 b	0,0105 a	110 b	47,20 a
C6R4D	05-135	0,4832 b	0,2269 b	0,0128 a	95 b	40,62 b
C6R5A	05-109	0,3838 b	0,1704 b	0,0104 a	87 b	39,33 b
C6R5B	05-110	0,4851 b	0,2832 b	0,0138 a	118 a	39,32 b
C7R2AB	05-111	0,6092 a	0,3834 a	0,0158 a	105 b	41,41 b
C7R5BA	05-112	0,7365 a	0,5243 a	0,0134 a	103 b	44,00 a
C9R2B	05-125	0,5196 b	0,3301 a	0,0163 a	117 a	44,70 a
C9R4A	05-126	0,5976 a	0,3442 a	0,0169 a	113 a	43,92 a

\*As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott à 5% de probabilidade

#### 4. DISCUSSÃO

Em ambos locais de coleta e também nas plantas dos experimentos de autenticação os nódulos foram muito pequenos (mm), evidenciando que essa parece ser uma característica da simbiose entre rizóbio e *A. pintoi*. Apesar disso, o isolamento e purificação das estirpes foi bem sucedido. Nesse estudo, as características físicas das áreas de coletas foram significativamente

contrastantes, os solos apresentam textura arenosa e argilosa, em Itabela-BA e Lavras-MG, respectivamente, porém não houve diversidade nos gêneros de bactérias isoladas de ambos ambientes.

A baixa diversidade filogenética e simbiótica de bactérias que nodularam amendoim forrageiro neste trabalho indicam que essa planta é altamente específica, uma vez que apresentaram nodulação apenas com estirpes identificadas no gênero *Bradyrhizobium*. Ou seja, independente da textura do solo e origem, somente estirpes identificadas no gênero *Bradyrhizobium* nodularam o amendoim forrageiro, porém em 35 estirpes identificadas nesse gênero, somente 19 formaram nódulos. Em outras palavras, apenas 59% das estirpes pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* foram autenticadas como nodulíferas pois foram capazes de nodular em seu hospedeiro de origem. Como as temperaturas na época da condução dos experimentos de autenticação foram amenas, a ausência de nódulos por estirpes do gênero *Bradyrhizobium* pode indicar que apenas algumas espécies desse gênero nodulam o *A. pintoi*. O mesmo resultado foi apresentado por Turk & Keyser (1992), quando trabalharam com inoculação de estirpes de *Bradyrhizobium* em *Acacia mangium*. Foi observado que, mesmo com a nodulação ocorrendo somente para estirpes de *Bradyrhizobium*, essa simbiose pode não ser efetiva para algumas estirpes desse gênero.

Segundo a árvore filogenética construída, as 20 estirpes se dividiram em três grupos (Figura 1). O grupo I com dez estirpes (UFLA 05-166; 165; 100; 99; 91; 164; 155; 88; 118; e 95), o grupo 2 com sete estirpes (UFLA 05-87; 109; 96; 98; 108; 89; e 111) e o grupo 3 com duas estirpes (UFLA 05-131 e UFLA 05-122). A estirpe UFLA 05-116 se agrupou apenas com a estirpe tipo de *B. ganzhouense* (Figura 1). As estirpes dos grupos I, II e III, não se agruparam com nenhuma das estirpes tipo, entretanto, as estirpes dos grupos I e II ficaram mais próximas da estirpe tipo de *B. kavangense* e da SEMIA 6439, uma das estirpes aprovada pelo MAPA, para uso como inoculante em *A. pintoi*. As duas estirpes do grupo III ficaram mais próximas das estirpes tipos de *B. diazoefficiens* e *B. betae*.

Vale ressaltar que, a SEMIA 6439, identificada como *B. japonicum*, com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (BINDE et al., 2009), e também aprovada pelo MAPA, para uso como inoculante em *A. pintoi*, possivelmente, não faz parte dessa espécie, uma vez que, na árvore filogenética, esta estirpe não se agrupou e nem ficou próxima a estirpe tipo de *B. japonicum*. Nenhuma das 20 estirpes avaliadas, se agruparam com a SEMIA 6440, identificada

como *Bradyrhizobium* sp. e também aprovada pelo MAPA, para uso como inoculante em *A. pintoi*. A estirpe SEMIA 6440 ficou mais próxima das estirpes tipo de *B. elkanii* e *B. jicamae*.

Os grupos I, II e III podem apresentar estirpes com potencial para novas espécies, entretanto, a identificação dessas estirpes a nível de espécie não foi possível devido a região do gene 16S rRNA ser muito conservada, exigindo assim o sequenciamento de outros genes, que apresentem maior poder de discriminação a nível de espécies, a exemplo dos genes housekeeping *atpD*, *dnak*, *glnII*, *recA*, *rpoB* e *gyrB*, e de análises complementares (WILLEMS et al., 2001; DELAMUTA et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2015; RIBEIRO et al., 2015), para confirmar se estas estirpes são novas espécies.

Outro ponto é que não existem estudos sobre a diversidade de bactérias que coabitam endofiticamente o interior do nódulo de *Arachis pintoi* com bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL). Microrganismos endofíticos invadem tecidos de plantas vivas através de infecções não visíveis, sem causar sintomas de doenças, e, aparentemente, o solo parece ser a principal fonte. Apesar de sua interação com plantas não envolver compatibilidade morfológica, bioquímica e fisiológica, como nas simbioses de plantas com BFNNL, os endofíticos podem apresentar relação benéfica com a planta, como FBN, absorção de nutrientes, controle biológico e produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal.

Dessa forma, além das estirpes nodulíferas pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, no isolamento foram encontrados *Rhizobium* sp. e *Burkholderia* sp. que, normalmente, podem formar nódulos em outras espécies de leguminosas. Estirpes de *Rhizobium* não nodulíferas têm sido isolados de uma grande quantidade de famílias de plantas, incluindo nódulos radiculares de algumas leguminosas, e as formas não nodulíferas devem ser a situação predominante em ambientes naturais (SACHS & SIMMS, 2008; TAURIAN et al., 2006; CHEN et al., 2014). Em planta do mesmo gênero que o amendoim forrageiro, o *Arachis hypogaea* L. apresentou capacidade de nodular e realizar fixação biológica de N<sub>2</sub> com estirpes de *Burkholderia* em solos ácidos (GARAU et al., 2009). Estirpes do gênero *Burkholderia* têm sido identificadas comumente como bactérias diazotróficas associadas com arroz, milho e sorgo, enquanto, algumas espécies são capazes de induzir nódulos em *Macroptilium atropurpureum*, em plantas do gênero *Mimosa* e da sub-família Mimosoideae (BARRETT & PARKER, 2005; BARRETT & PARKER, 2006). Em estudo com nódulos radiculares de *Arachis duranensis*, Chen et al. (2014) encontraram isolados endofíticos de *Burkholderia* de alta similaridade com *B. cepacia*, o qual tem sido isolado de

diversos outros nichos ecológicos, tais como solo, rizosfera, água, plantas, fungos, animais e ambientes hospitalares (IBÁÑEZ et al., 2008; MAHENTHIRALINGAM et al., 2005).

A presença de estirpes identificados nos gêneros *Enterobacter*, *Kocuria*, *Mucilaginibacter* e *Paenibacillus*, evidencia a presença de bactérias não nodulíferas endofíticas no interior dos nódulos. Possivelmente, essas bactérias penetram no tecido vegetal juntamente com as nodulíferas durante a infecção e a formação dos nódulos (KAN et al., 2007). Microrganismos do gênero *Kocuria* são gram positivos, pertencem a família Micrococcaceae, seus habitats normais incluem pele de mamíferos (SAVINI et al., 2010; TSAI et al., 2010), solo (LI et al., 2006), a rizosfera (TAKARADA et al., 2008), alimentos fermentados, água doce e sedimentos marinhos. Entretanto, há poucos relatos de *Kocuria* sp. em leguminosas (MAHDHI et al., 2012). Zakhia et al. (2006) identificaram esse gênero, por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA, como endofítico em nódulos de *Hedysarum spinosissimum*, caracterizado como bactéria endofítica oportunista. Alguns trabalhos identificaram a capacidade desse gênero em associar-se com fungos micorrízicos arbusculares (LECOMTE et al., 2011) ou sobreviver como endofíticos na filosfera de plantas (YANG et al., 2013). Segundo Mahdhi et al. (2012), antes de considerar que o gênero *Kocuria* possui características de simbioses nos nódulos, mais estudos precisam ser realizados para auxiliar e compreender como as interações funcionam.

Os gêneros *Paenibacillus* e *Bacillus* geralmente são endofíticos em nódulos, mas não nodulíferos, apesar disso existem relatos da nodulação em feijão-caupi por esses dois gêneros (MARRA et al., 2012; COSTA et al., 2013; JARAMILLO et al., 2013), porém com baixa eficiência simbiótica. Eles também já foram descritos como promotores do crescimento de plantas (PEDRINHO et al., 2010; RODRIGUES et al., 2012) por meio da produção de auxina e solubilização do fósforo (COSTA et al., 2013).

A primeira citação da associação de um isolado de bactéria do gênero *Enterobacter* foi realizado por Ladha et al. (1983) em plantas de arroz, e posteriormente, como bactéria endofítica, em raízes de milho, por Hinton & Bacon (1995). Essas bactérias pertencem ao filo Proteobacterias, classe das Gammaproteobacterias e incluem *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, normalmente, possuem crescimento rápido e acidificam o meio de cultura (COSTA et al., 2013). Diversos estudos atribuem esse gênero como promotores de crescimento (SILVEIRA et al., 2004), fixadores de N (RONKKO et al., 1993) e em coexistência com estirpes nodulíferas em nódulos (GUPTA et al., 1998). Ibañex et al. (2009) isolaram *Enterobacter* de nódulos de *Arachis hypogaea*.

Quando esses isolados foram inoculados simultaneamente ou 20 dias após as estirpes de *Bradyrhizobium*, foi observado que estirpes da classe Gammaproteobacterias podem colonizar os nódulos em diferentes estágios de formação, apesar de não serem capazes de fixar N<sub>2</sub> ou formar nódulos. Foi observado um aumento no número de nódulos por planta quando estirpes de *Enterobacter* foram associadas a *Bradyrhizobium*. Sugere-se que os isolados de bactérias oportunistas são capazes de colonizar nódulos de rizóbios, podendo ser benéfico para o crescimento das plantas.

As primeiras descrições do gênero *Mucilaginibacter* são recentes (PANKRATOV et al., 2007; URAI et al., 2008; BAIK et al., 2010) e ainda não existem relatos sobre presença no interior de nódulos. Poucos estudos existem acerca da funcionalidade desse gênero nas plantas, mas sua presença indica produção de polissacarídeos extracelulares que promovem o crescimento em plantas (MADHAIYAN et al., 2010). Já foram encontradas como endofíticas na filosfera (AYDOGAN et al., 2016), raízes (AYDOGAN et al., 2017), caule (KAMPFER et al., 2014) ou como decompositores de celulose e hemicelulose na matéria orgânica do solo (MONDÉJAR et al., 2016).

Estirpes de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* foram as únicas capazes de nodular com o amendoim forrageiro (BINDE et al., 2009; MORA & CADISCH, 2010). Segundo Pinto et al. (2004), a alta similaridade encontrada entre as cepas capazes de se associar com essa leguminosa corrobora com os resultados de diversidade genética das populações de *Bradyrhizobium* encontrados nesse trabalho, o qual mostrou uma elevada homogeneidade genética nesse grupo de rizóbio. Porém, apesar da associação específica com diversas estirpes do gênero *Bradyrhizobium*, algumas estirpes desse gênero foram incapazes de estabelecer simbiose com o amendoim forrageiro.

## 5. CONCLUSÕES

O amendoim forrageiro é capaz de nodular somente em simbiose com algumas estirpes do gênero *Bradyrhizobium*, podendo coabitar o nódulo com estirpes de outros gêneros nodulíferos de outras espécies de leguminosas.

A comunidade simbiótica de microrganismos capazes de formar nódulos em *A. pintoi* foi similar em áreas com diferentes características edáficas e climáticas.

Algumas estirpes nativas isoladas foram mais eficientes em nodular o amendoim forrageiro que as estirpes atualmente aprovadas como inoculante.

## REFERÊNCIAS

- AYDOGAN E, BUSSE H, MOSER G, MÜLLER C, KÄMPFER P, GLAESER S. Proposal of *Mucilaginibacter galii* sp nov isolated from leaves of *Galium album*. **Int J Syst Evol Microbiol.**, 67 (5): 1318-1326, 2017. doi: 10.1099/ijsem.0.001808
- AYDOGAN E, BUSSE H, MOSER G, MÜLLER C, KÄMPFER P, GLAESER S. Proposal of *Mucilaginibacter phyllosphaerae* sp nov isolated from the phyllosphere of *Galium album*. **Int J Syst Evol Microbiol.**, 66(10):4138-4147, 2016. doi:10.1099/ijsem.0.001326
- BAHNISCH, G.A.; DATE, R.A.; BRANDON, N.J.; PITTAWAY, P. Growth responses of *Desmanthus virgatus* to inoculation with *Rhizobium* strain CB3126. I. A pot trial with 8 clay soils from central and southern Queensland. **Trop. Grassl.**, 32:13-19, 1998.
- BARRETT, C.F., PARKER, M.A. Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. **Syst.Appl. Microbiol.** 28, 57–65, 2005.
- BARRETT, C.F., PARKER, M.A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. nodule bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. **Appl. Environ.Microbiol.** 72, 1198–1206, 2006.
- BINDE, D. R.; MENNA, P.; BANGEL, E. V.; BARCELLOS, F. G.; HUNGRIA, M. rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. **Appl Microbiol Biotechnol.**, 83:897–908, 2009.
- BOWEN, G.D. Specificity and nitrogen fixation in the *Rhizobium* symbiosis of *Centrosema pubescens* Benth. **Queenslans Journal Agriculture Science**, 16, 267-281, 1959.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária.** Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 398p. <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/regras-para-analise-de-sementes.pdf/view>
- CHEN, J.Y.; GU, J., WANG, T.; MA, X.X.; KANGA, S.T.; HUANG, L.Z.; CAO, X.P.; LI, L.B.; WU, Y.L. Wild peanut *Arachis duranensis* are nodulated by diverse and novel *Bradyrhizobium* species in acid soils. **Systematic and Applied Microbiology.**, 37, 525–532, 2014.
- COIMBRA, R.A.; TOMAZ, C.A.; MARTINS, C.C.; NAKAGAWA, J. Teste de germinação com acondicionamento dos rolos de papel em sacos plásticos. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 29, nº 1, p.92-97, 2007.
- COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (Impressa), v. 48, p. 1275-1284, 2013.
- COSTA, E.M.; NÓBREGA, R.S.A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L.V.M.; MOREIRA, F.M.S.. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.9, p.1275-1284, set. 2013. DOI: 10.1590/S0100-204X2013000900012

SÁ, A. JR, CARVALHO, L. G., SILVA, F. F., & CARVALHO ALVES, M. Application of the Koppen classification for climatic zoning in the state of Minas Gerais, Brazil. **Theoretical and Applied Climatology**, 108, 1–7, 2012.

DELAMUTA, J.R.M.; RIBEIRO, R.A.; MENNA, P.; BANGEL, E.V.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. **Braz. J. Microbiol.** v. 43, p. 698–710, 2012.

DÖBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. **Nature**, 210:850-852, 1966.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; RODRIGUES, L. S. Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 12, p. 1509-1517, dez. 2003.

FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A. **Laboratory manual of general microbiology**, McGraw-Hill, New York, NY. p 33, 1928

GARAU G.; YATES, R.; DEIANA, P.; HOWIESON, J. Novel strains of nodulating *Burkholderia* have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. **Soil Biol Biochem**, 41: 125–134, 2009.

GONZÁLEZ, M.S.; VAN HEURCH, L.M.; ROMERO, F.; PEZO, D.A.; ARGEL, P.J. Producción de leche en pasturas de estrella africana (*Cynodom nlemfuensis*) solo y asociado com *A. pinto* o *Desmodium ovalifolium*. **Pasturas Trop.**, 8(1):2-12, 1996.

GUIMARÃES, A.A.; JARAMILLO, P.M.D.; NÓBREGA, S.R.A.; FLORENTINO, L.A.; DA SILVA, K.B.; MOREIRA, F.S.M. Genetic and Symbiotic diversity of Nitrogen-fixing bacteria isolated agricultural soils in western Amazon by using Cowpea as trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p.6726-6733, 2012.

GUIMARÃES, A.A.; FLORENTINO, L.A.; ALMEIDA, K.A.; LEBBE, L.; SILVA, K.B.; WILLEMS, A.; MOREIRA, F.M.S. High diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from several legume species and land uses in Brazilian tropical ecosystems. **Syst Appl Microbiol**, v. 38, p. 433–441, 2015.

GUPTA, A.; SAXENA, A.K.; GOPAL, M.; TILAK, K.V.B.R. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on competitive ability of introduced *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) for nodulation. **Microbiology Res.**, 153, 113-117, 1998.

HINTON, D. M.; BACON, C. W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 129, n. 2, p. 117-125, June, 1995.

HOAGLAND D.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. California Agricultural Experiment Station circular no. 347. University of California, Berkeley, CA, 1950.

HUANG, H.Q.; HE, F.R.; CHEN, Z. H. Study on the Biological Characteristic of fastgrowing peanut rhizobial strains. **Journal Sichuan Agricultural University**, v. 85, n. 8, p. 188-193, 1990.

- IBÁÑEZ, F., TANIA, T., JORGE, A., MARIA, L.T., ADRIANA, F. Rhizobia phylogenetically related to common bean symbionts *Rhizobium giardinii* and *Rhizobium tropici* isolated from peanut nodules in Central Argentina. **Soil Biol. Biochem.**, 40, 537–539, 2008.
- JARAMILLO, P.M.D.; GUIMARÃES, A.A.; FLORENTINO, L.A.; SILVA, K.B.; NÓBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon. **Scientia Agricola**, v.70, p.397-404, 2013.
- KAMPFER, P.; BUSSE, H.; MCINROY, J.A.; GLAESER, S.P. *Mucilaginibacter auburnensis* sp. nov., isolated from a plant stem. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 64, 1736–1742, 2014. DOI 10.1099/ijs.0.060848-0
- KAN, F.L.; CHEN, Z.Y.; WANG, E.T.; TIAN, C.F.; SUI, X.H; CHEN, W.X. Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. **Archives of Microbiology**, v.188, p.103-115, 2007. DOI: 10.1007/ s00203-007-0211-3.
- LANE, D.J. **16S/23S rRNA sequencing**. In Stackebrandt E, Goodfellow M(ed), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, New York, NY. p 115–148, 1991.
- LECOMTE J, ST-ARNAUD, M.; HIJRI, M. Isolation and identification of soil bacteria growing at the expense of arbuscularmycorrhizal fungi. **Fems Microbiol Lett**, 317:43–51, 2011.
- MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; LEE, J.S.; SENTHILKUMAR, M; LEE, K.C.; SUNDARAM, S. *Mucilaginibacter gossypii* sp. nov. and *Mucilaginibacter gossypicola* sp. nov. plant-growth-promoting bacteria isolated from cotton rhizosphere soils. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, vol. 60:2451 -2457, 2010.
- MAHDHI, M.; FTERICH, A.; REJILI, M.; RODRIGUEZ-LLORENTE, I.D.; MARS, M. Legume-nodulating bacteria (LNB) from three pasture legumes (*Vicia sativa*, *Trigonella maritima* and *Hedysarum spinosissimum*) in Tunisia. **Ann Microbiol.**, 62:61–68, 2012.
- MAHENTHIRALINGAM, E., URBAN, T.A., GOLDBERG, J.B. The multifarious, mul-tireplicon *Burkholderia cepacia* complex. **Nat. Rev. Microbiol.**, 3, 144–156, 2005.
- MARRA, L.M.; SOARES, C.R.F.S.; OLIVEIRA, S.M. de; FERREIRA, P.A.A.; SOARES, B.L.; CARVALHO, R. de F.; LIMA, J.M. de; MOREIRA, F.M. de S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v.357, p.289-307, 2012. DOI: 10.1007/ s11104-012-1157-z.
- MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGELE, E. V.; HESSF, P. N.; MARTINEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, 29 315–332, 2006.
- MIRANDA, C.H.B.; VIEIRA, A.; CADISCH, G. Determinação da fixação biológica de nitrogênio no Amendoim forrageiro (*Arachis pintoii*) por intermédio da abundância natural de 15N. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1859-1865, 2003.
- MONDÉJAR, R.L.; ZÜHLKE, D.; BECHER, D.; RIEDEL, K.; BALDRIAN, P. Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. **Scientific Reports**, 6:252, 2016. DOI: 10.1038/srep25279

- MORA, B. V.; CADISCH, G. Assessment of N<sub>2</sub> fixation by three *Arachis pintoi* ecotypes using the isotope dilution technique. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, 12: 565 -573, 2010.
- MOREIRA FMS, GILLIS M, POT B, KERSTERS K, FRANCO AA. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Syst. Appl. Microbiol.** 16:135–146, 1993.
- NIEMANN, S., PUEHLER, A., TICHY, H. V., SIMON, R., & SELBITSHKA, W. Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. **Journal of Applied Microbiology**, 82(4), 477-484, 1997. doi:10.1046/j.1365-2672.1997.00141.x
- PEDRINHO, E.A.N.; GALDIANO JÚNIOR, R.F.; CAMPANHARO, J.C.; ALVES, L.M.C.; LEMOS, E.G. de M. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, v.69, p.905-911, 2010. DOI: 10.1590/S0006-87052010000400017.
- PINTO, P.P.; CARNEIRO, J.A.; VARGAS, M.A.T.; PURCINO, H.A.; SÁ, N.M.H. Indigenous rhizobia associated with *Arachis pintoi* in Cerrado soils of Brazil. **Pasturas Trop.**, 21(2):25-28, 1999.
- PURCINO H.M.; VIANA M.C.A.; BOTELHO W.; ZÚÑIGA M.C. Introdução e avaliação de ecótipos de gramíneas e leguminosas em área de Cerrado virgem de Minas Gerais, Brasil. **Pasturas Trop.**, 19(1):21-26, 1997.
- RADEMAKER JLW, FRANK JL, BRUJIN FJ. **Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting**, p 1–26. In Akkermans ADL, van Elsas JD, de Bruijn FJ, Molecular microbial ecology manual. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands, 1997.
- RIBEIRO, P.R.A.; SANTOS, J.V.; COSTA, E.M.; LEBBEC, L.; ASSIS, E.S.; LOUZADA, M.O.; GUIMARÃES, A.A.; WILLEMS, A.; MOREIRA, F.M.S. Symbiotic efficiency and genetic diversity of soybean bradyrhizobia in Brazilian soils. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, 212, 85–93, 2015.
- RODRIGUES, A.C.; ANTUNES, J.E.L.; MEDEIROS, V.V. de; BARROS, B.G. de F.; FIGUEIREDO, M. do V.B. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. **Bioscience Journal**, v.28, p.196-202, 2012.
- RONKKO, R.; SMOLANDER, A.; NURMIAHO-LASSILA, E.L.; HAAHTELA, K. *Frankia* in the rhizosphere of nonhost plants: A comparison with root-associated N<sub>2</sub>-fixing *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Pseudomonas*. **Plant and Soil**, 153: 85-95, 1993.
- SACHS, J.L., SIMMS, E.L. The origins of uncooperative rhizobia. **Oikos** 117,961–966, 2008.
- SHEN, B. F.; ZHU, H. R.; LI, J. Response of rice to inoculation with genetic engineered strains of associative diazotrophics. **Chinese Rice Research Newsletter**, Beijing, v. 4, p. 4-5, 1996.
- SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R.; NETO, E. B. S. Caracterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n. 2, p.217-221, abr./jun. 2004.

- TAMELE, O.H., LOPES DE SÁ, O.A.A., BERNARDES, T.F., LARA, M.A.S., CASAGRANDE, D.R. Optimal defoliation management of brachiaria grass–forage peanut for balanced pasture establishment. **Grass Forage Sci.**, 00:1–10, 2017. <https://doi.org/10.1111/gfs.12332>
- TAURIAN, T., FERNANDO, I., FABRA, A., AGUILAR, O.M. Genetic diversity of rhi-zobia nodulating *Arachis hypogaea* L. in Central Argentinean soils. **Plant Soil**, 282, 41–52, 2006.
- THIES, J.E.; BOHLOOL, B.B.; SINGLETON, P.W. Subgroups of de Cawpea miscellany: symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaea* and *Macroptilum atropurpureum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 57, n. 5, p. 1540-1545, 1991.
- THOMAS, R.J. The role of the legume in the nitrogen cycle of productivite and sustainable pastures. **Grass and Forage Science**, 47: 133-142, 1992.
- TSAI, C.Y.; SU, S.H.; CHENG, Y.H.; CHOU, Y.L.; TSAI, T.H.; LIEU, A.S. *Kocuria* varians infection associated with brain abscess: a case report **BMC Infect Disease**, 10:102, 2010.
- VERSALOVIC J, SCHNEIDER M, BRUIJN FJ, LUPSKI JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods Mol. Cell. Biol.**, 5:25– 40, 1994.
- VINCENT JM. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**, p 73–101. International biological programme handbook no. 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom, 1970.
- WILLEMS, A.; DOIGNON-BOURCIER, F.; GORIS, J.; COOPMAN, R.; DE LAJUDIE, P.; DE VOS, P.; GILLIS, M. DNA–DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 51, p. 1315–1322, 2001.
- YANG, T.; DU, W.; ZHOU, J.; WANG, X.; DAI, C. Effects of the symbiosis between fungal endophytes and *Atractylodes lancea* on rhizosphere and phyllosphere microbial communities. **Symbiosis**, 61:23–36, 2013.
- ZAKHIA F, JEDER H, WILLEMS A, GILLIS M, DREYFUS B, DE LAJUDIE P Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for nifH -like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. **Microb Ecol**, 51:375–393, 2006.