

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

***Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada na
*Brachiaria decumbens***

JUCINEI SOUZA FERNANDES

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL

2016

***Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada na
*Brachiaria decumbens***

JUCINEI SOUZA FERNANDES

Engenheiro Agrônomo

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. ALESSANDRA MAYUMI TOKURA ALOVISI

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

DOURADOS

MATO GROSSO DO SUL

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

F363a Fernandes, Jucinei Souza.

Azospirillum brasilense e adubação nitrogenada na *Brachiaria decumbens*. / Jucinei Souza Fernandes. – Dourados, MS : UFGD, 2016.

49f.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Mayumi Tokura Alovisei.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Bactérias diazotróficas. 2. Nitrogênio. 3. Forrageira. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

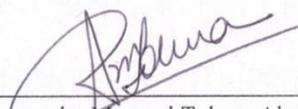
Azospirillum brasilense e adubação nitrogenada na *Brachiaria decumbens*

por

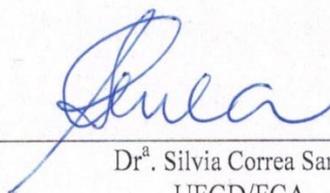
JUCINEI SOUZA FERNANDES

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
MESTRE EM AGRONOMIA

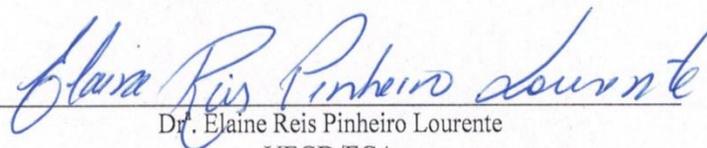
Aprovada em: 13/07/2016



Dr.^a Alessandra Mayumi Tokura Alovise
Orientadora – UFGD/FCA



Dr.^a Silvia Correa Santos
UFGD/FCA



Dr.^a Elaine Reis Pinheiro Lourente
UFGD/FCA

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me dar força a cada dia de trabalho.

A professora Alessandra por me orientar e sempre me apoiar em todos os momentos de trabalho.

A minha namorada Carol, por me ajudar em várias etapas do meu experimento, e sempre estar me apoiando e me dando força.

Aos meus pais, por disponibilizarem tempo e por estar sempre ao meu lado me ajudando.

Aos meus irmãos, cunhado, cunhada e sobrinhos, por me dar apoio sempre.
Ao amigo Robervaldo por contribuir com o meu trabalho, me ajudando a fazer algumas análises químicas.

As professoras Alzira e Elisângela, por tirarem um tempo de seus trabalhos e me auxiliarem na minha qualificação.

As professoras Elaine e Silvia, por participarem da minha defesa e me darem ótimas contribuições.

A todos que direto ou indiretamente participaram do meu trabalho.

Ao Cnpq, pela bolsa concedida.

A UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS, pelo fornecimento do curso.

RESUMO

SOUZA, JUCINEI FERNANDES. Universidade Federal da Grande Dourados, Junho de 2015. *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada na *Brachiaria decumbens*. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Mayumi Tokura Alovise.

A atividade pecuária a pasto continua sendo a técnica mais utilizada, viável e econômica no Brasil, no entanto, a forma extrativista de exploração pecuária vem aumentando as áreas degradadas de pastagem ou em processo de degradação. O esgotamento da fertilidade do solo, em falta de adubação, tem sido apontado como uma das principais causas da degradação de pastagens cultivadas. A fixação biológica de nitrogênio, nesse contexto, pode ser utilizada como alternativa para aumentar a produtividade da forrageira, além de reduzir os gastos com fertilizantes nitrogenados. Diante do exposto, a realização dessa pesquisa teve como objetivo determinar a altura de plantas, número de perfilhos, massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), teor de clorofila, eficiência de nitrogênio, relação MSPA/MSR da *Brachiaria decumbens*, teor de nutrientes na parte aérea da forrageira e os atributos químicos do solo em função da adubação nitrogenada associada ou não com *Azospirillum brasilense*. O experimento foi realizado em casa de vegetação da Universidade Federal da Grande Dourados, no município de Dourados – MS, utilizando solo classificado como Neossolo Quartzarênico. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, arranjado num fatorial 2x5, com quatro repetições. Os tratamentos adotados foram constituídos pela combinação de dois fatores: inoculação com *Azospirillum brasilense* (presença ou ausência) e doses de nitrogênio (0, 50, 100, 150 e 200 kg ha⁻¹). A inoculação das sementes de *Brachiaria decumbens* com *Azospirillum brasilense* contribuiu de forma positiva no desenvolvimento e produção da forrageira, com aumento na altura de plantas, número de perfilhos, produção de matéria seca da parte aérea e matéria seca de raiz quando associado com nitrogênio até a dose de 100 kg ha⁻¹. O *Azospirillum brasilense* com a adubação nitrogenada ocasionou interação em relação aos teores de nutrientes na planta e nos atributos químicos do solo. A inoculação com *Azospirillum brasiliense*, em geral, contribuem de forma positiva para a nutrição da *Brachiaria decumbens*.

Palavra-chave: bactérias diazotróficas, nitrogênio, forrageira.

SOUZA, JUCINEI FERNANDES. Universidade Federal da Grande Dourados, Junho de 2015. *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada na *Brachiaria decumbens*.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Mayumi Tokura Alovise.

Livestock grazing activity remains the most widely used technique, feasible and cheap in Brazil, however, the extractive form of livestock is increasing the degraded pasture areas or in the degradation process. Depletion of soil fertility as a result of fertilization, has been touted as one of the main causes of degradation of cultivated pastures. Biological nitrogen fixation in this context can be used as an alternative to increase forage productivity and reduce spending on nitrogen fertilizers. Given the above, the realization of this research was to determine the height of plants, number of tillers, dry matter (MSPA), root dry weight (MSR), chlorophyll content, nitrogen efficiency ratio MSPA / MSR *Brachiaria decumbens*, nutrient content in the shoot of forage and soil chemical properties due to the nitrogen fertilization associated or not with *Azospirillum brasilense*. The experiment was conducted in a greenhouse at the Federal University of Grande Dourados, in the municipality of Dourados - MS, using a completely randomized Quartzarenic. The experimental design was completely randomized in a factorial 2x5, with four replications. The treatments were constituted by the combination of two factors: inoculation with *Azospirillum brasilense* (presence or absence) and nitrogen (0, 50, 100, 150 and 200 kg ha⁻¹). Inoculation of *Brachiaria decumbens* seeds with *Azospirillum brasilense* contribute positively in the development and production of forage, with an increase in plant height, number of tillers, dry matter production of the part and root dry matter when combined with nitrogen to the dose 100 kg ha⁻¹ of nitrogen. The *Azospirillum brasilense* with nitrogen fertilization caused interaction in relation to nutrient content in plant and soil chemical properties. Inoculation with *Azospirillum brasilense* generally contribute positively to the nutrition of *Brachiaria decumbens*.

Keyword : diazotrophs , nitrogen, forage.

Sumário

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2.1. <i>Brachiaria decumbens</i>	8
2.2. Adubação nitrogenada nas pastagens.....	9
2.3. Fixação biológica de nitrogênio.....	11
2.4. Inoculação com bactéria <i>Azospirillum brasilense</i>	12
2.5. Relação da bactéria com o nitrogênio.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Preparo do solo e tratamentos.....	15
3.2. Caracterização química e física do solo.....	16
3.3. Condução do experimento.....	16
3.4. Análise estatística.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1. Altura de plantas.....	19
4.2. Número de perfilho.....	20
4.3. Massa seca da parte aérea.....	22
4.4. Massa seca de raiz.....	23
4.5. Relação massa seca de parte aérea e raiz.....	25
4.6. Índice SPAD.....	26
4.7. Eficiência da utilização de nitrogênio.....	28
4.8. Teores de nutriente na planta.....	29
4.9. Atributos químicos no solo.....	33
5. CONCLUSÃO.....	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

1. INTRODUÇÃO

No Brasil existem aproximadamente 180 milhões de hectares cultivados com pastagens principalmente gramíneas do gênero *Brachiaria* (BODDEY et al., 2006; DIAS, 2011). No entanto, aproximadamente 70 milhões de hectares dessas pastagens estão em processo de degradação ou já degradadas (DIAS, 2011).

A conquista do Cerrado foi um marco na área agrícola dos trópicos no século XX e a introdução do gênero *Brachiaria* foi fundamental na expansão da pecuária no Centro-Oeste, que representa 34% dos 212 milhões de bovinos do rebanho nacional (BELING, 2013) e 38% da produção de carne 2013.

Mesmo as espécies do gênero *Brachiaria* sendo tolerantes às condições edafoclimáticas do Cerrado, o manejo inadequado e a falta de adubação corretiva no estabelecimento e da adubação de manutenção para a reposição dos nutrientes no solo contribuem para a degradação das áreas de pastagens cultivadas, que passam a apresentar menor tolerância ao estresse hídrico, tornando mais evidente os efeitos dos extremos climáticos sobre seu desenvolvimento. Ao contrário, pastagens bem manejadas proporcionam maior cobertura vegetal do solo favorecendo a retenção de água no sistema e minimizando os efeitos dos extremos climáticos no seu próprio desenvolvimento (SILVA et al., 2011).

Solos de baixa fertilidade ou não corrigidos geram baixos rendimentos das pastagens, sendo o nitrogênio um dos nutrientes mais limitantes ao crescimento e manutenção das plantas forrageiras (BATISTA, 2002), uma vez que é extraído em grande quantidade do solo pelas plantas forrageiras e faz parte de inúmeras moléculas fundamentais como proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, adenosina trifosfato, enzimas, aminas e amidas, clorofila, entre outros (MALAVOLTA, 2006).

A principal forma de absorção de nitrogênio pelas plantas é através do fluxo de massa, nas formas nítricas e/ou amoniacal, sendo a forma nítrica predominante em condições naturais. No entanto absorção do nitrogênio proporciona aumento na quantidade e tamanho de células ou a expansão das células, no entanto, só ocorrerá quando houver disponibilidade de água numa resposta compensatória da planta (CAMARGO e NOVO, 2009).

Grande quantidade de nitrogênio é perdida por lixiviação, desnitrificação, erosão ou, principalmente, por volatilização, resultando em redução na concentração deste elemento no solo e, conseqüentemente, reduzindo a produção de pastagem e a capacidade de suporte, resultante da menor oferta de forragem (BENNETT et al., 2008).

Em função das perdas de nitrogênio, a eficiência média da forrageira é de 50% do total do nitrogênio aplicado, assim, a utilização de fertilizantes nitrogenados acaba sendo considerada, apesar de prática comum para manter a produtividade, técnica de custo financeiro e ecológico elevado (MELLO et al., 2008). Por isso, é crescente a necessidade de maior uso do potencial da fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) através da associação de microrganismos com gramíneas tropicais, como alternativa sustentável para a adubação nitrogenada.

Os microrganismos diazotróficos endofíticos podem desempenhar importante papel na recuperação e sustentabilidade de ecossistemas uma vez que são capazes de incorporar ao solo o nitrogênio atmosférico (N_2), por meio da fixação biológica em quantidades que podem variar de 25 a 50 kg N ha¹ano⁻¹, e ainda, produzirem e liberarem substâncias reguladoras do crescimento vegetal, como auxinas, giberelinas e citocininas, que proporcionam aumento do sistema radicular e, assim, contribuindo para a melhoria da nutrição mineral e a utilização da água pelas plantas (BAZZICALUPO e OKON, 2007).

Assim objetivou-se avaliar o efeito da inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* e da adubação nitrogenada sobre as componentes de produção da *Brachiaria decumbens* e dos atributos químicos na planta e no solo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Brachiaria decumbens*

O estabelecimento de pastagem do gênero *Brachiaria* ocorre devido a sua maior tolerância as condições de solos ácidos e de baixa fertilidade, aliada ao seu valor forrageiro, sendo as espécies de maior importância a *B. decumbens*, *B. brizantha*, *B. ruziziensis* e *B. humidicola* (SOBRINHO et al., 2005).

A forma extrativista de exploração pecuária vem aumentando as áreas degradadas de pastagem ou em processo de degradação (SOUZA e PEDREIRA, 2004). Na degradação das pastagens, a produtividade e a composição botânica podem ser substancialmente alteradas ao longo do tempo, devido ao declínio da fertilidade do solo e ao manejo inadequado das plantas forrageiras.

Os capins do gênero *Brachiaria*, que possui aproximadamente 90 espécies, comumente chamados de braquiária, têm distribuição marcadamente tropical, tendo como centro de origem primário a África Equatorial (GHISI, 1991). No Brasil, a forrageira é conhecida desde a década de 1950 (ALCANTARA, 1986). As *Brachiarias* entraram no Brasil juntamente com os escravos, pois serviam de colchão nos navios negreiros.

As gramíneas do gênero *Brachiaria* são largamente utilizadas em pastagens na América Tropical. As braquiárias são as pastagens mais plantados no país, sendo utilizados nas fases de cria, recria e engorda dos animais. Adaptam-se às mais variadas condições de solo e clima, ocupando espaço cada vez maior em todo o território brasileiro, por proporcionar produções satisfatórias de forragem em solos com baixa e média fertilidade (SOARES, 1994). Desde que sejam bem manejados, apresentam alta produção de matéria seca e eficiência na cobertura do solo (GHISI, 1991).

A *B. decumbens* é originária da Região dos Grandes Lagos em Uganda (África). Essa gramínea foi introduzida no Brasil em 1960, onde se adaptou muito bem, principalmente nas áreas dos cerrados. A espécie é vigorosa e perene. É resistente à seca, adaptando-se bem em regiões tropicais úmidas. É pouco tolerante ao frio e cresce bem em diversos tipos de solo, porém, requer boa drenagem e condições de média fertilidade, vegetando bem em terrenos arenosos e argilosos. Os melhores resultados são obtidos quando se usam 2 a 5 kg de sementes puras e viáveis (1 kg de sementes tem cerca de 220.000 a 225.000 sementes ha⁻¹) (VILELA, 2008).

A *B. decumbens* é caracterizada como gramínea perene, estolonífera, de hábito de crescimento de semi-ereto a prostrado. Pode alcançar de 30 a 100 cm de altura. Suas raízes são fortes e duras, com presença de pequenos rizomas. Os colmos são de formato cilíndrico a ovalados, podendo ser eretos ou decumbentes de coloração verde escura, glabros ou pilosos, com a presença de seis a 18 entrenós medindo em média 20 centímetros. Os nós são verdes, glabros ou pouco pilosos. As folhas medem entre 20 a 40 centímetros de comprimento e de 10 a 20 milímetros de largura, fortemente pilosas. Suas bordas são ásperas e duras. Estas são de coloração verde escura, principalmente durante o seu primeiro ano de implantação, devido ao seu alto conteúdo de clorofila. A inflorescência é em forma de panícula racemosa, de 25 a 47 centímetros de altura. É formada de dois a cinco racimos de 4 a 10 centímetros de comprimento. As sementes são de tamanho médio, arredondadas e férteis, o que facilita a sua disseminação. É uma espécie tetraploide com 36 cromossomos (OLIVERA et al, 2006).

2.2 Adubação nitrogenada nas Pastagens

A adubação de pastagens é prática agrícola que consiste na aplicação de adubos ao solo para recuperar ou conservar a sua fertilidade. Com a adubação, é possível suprir a deficiência de nutrientes do solo e, assim, proporcionar adequado desenvolvimento das plantas forrageiras. A adubação é fundamental para manter a sustentabilidade e, ou, incrementar a produtividade da pastagem (SANTOS et al., 2010).

O nitrogênio é um dos elementos necessários em maior quantidade para o desempenho adequado das plantas, fazendo parte de nucleotídeos de fosfato e aminoácidos, que compõe a estrutura dos ácidos nucléicos e das proteínas, respectivamente. É considerado um dos nutrientes mais exigido pelas plantas (DOBBELAERE e OKON, 2007).

O uso de fertilizante nitrogenado é uma prática comum e responsável por elevar os custos da produção agrícola, além de poder gerar danos ao ambiente, uma vez que parte do total aplicado é geralmente perdido. A eficiência de utilização dos fertilizantes nitrogenados é em média 50%, devido às perdas por lixiviação do NO_3^- , volatilização de amônia, desnitrificação, erosão e imobilização microbiana (REIS et al., 2011).

O nitrogênio proporciona aumento imediato e visível na produção de forragem, isso ocorre porque a quantidade disponibilizada pelo solo, a partir da MO, não tem sido

suficiente para suprir adequadamente a necessidade das plantas forrageiras (KLUTHCOUSKI e AIDAR, 2003).

A deficiência de N é apontada como a principal causa de redução na produtividade e degradação das áreas cultivadas com gramíneas forrageiras (VASCONCELOS, 2006), porém, parte do N introduzido no sistema de produção agrícola é perdida, reduzindo a sua eficácia e diminuindo os lucros oriundos dos empreendimentos na pecuária, fundamentados na alimentação do gado com plantas forrageiras (PRIMAVESI et al., 2004).

Corsi (1994) relata que o nitrogênio promove diversas alterações fisiológicas em gramíneas forrageiras, como no número, tamanho, peso e taxa de aparecimento de perfilhos e folhas, e alongamento do colmo, que são fatores importantes na produção de massa seca e valor nutritivo da planta forrageira, resultando na elevação de índices zootécnicos. Segundo Pedreira et al. (2001), quando o teor de nitrogênio na planta é baixo, o perfilhamento é inibido, mas, com o suprimento de N há um acréscimo no número de perfilhos por planta.

A magnitude de resposta da planta ao N varia com a espécie forrageira, a dose, a fonte, o modo de aplicação do fertilizante, a forma de utilização de pastagem (corte ou pastejo), o tipo e a textura do solo e com as condições de clima (temperatura e umidade), antes, durante e depois da aplicação do adubo. Nesse caso, verifica-se que diversos componentes (planta, animal, solo e atmosfera), bem como, a interação entre eles, determinarão a quantidade de forragem produzida. Assim, a variação em qualquer um desses componentes, num determinado momento, estabelece, potencialmente respostas diferenciadas na produção de forragem (MARTHA et al., 2002).

Os sintomas de deficiência de N são caracterizados pelo amarelecimento das folhas mais velhas, reduzindo a taxa fotossintética, proporcionando o crescimento reduzido das plantas. O N fornecido adequadamente em condições favoráveis para o crescimento das plantas, proporciona aumento na produção de matéria seca e do teor de proteína, a partir da produção de carboidratos (HAVLIN et al., 2005).

A falta de conhecimento sobre o manejo do N (dose, fonte e forma de parcelamento do N aplicado), em geral, faz com que o N fertilizante seja utilizado de maneira menos eficiente do que é possível, o que estabelece perdas significativas desse nutriente no ambiente (MARTHA JUNIOR et al., 2004).

Alexandrino et al. (2005) estudando o crescimento e características químicas e morfológicas da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu submetido a cortes e a doses de N, verificaram grande diferença de perfilhamento ao longo do tempo de rebrotação em relação ao suprimento de N, observando que as plantas não adubadas com N quase não perfilharam ao longo do tempo. Para um bom manejo da adubação, principalmente no sistema intensivo, torna-se importante conhecer a necessidade em nutrientes das forrageiras e, conseqüentemente, a sua capacidade de extração de nutrientes do solo.

Primavesi et al. (2005) verificaram que o capim *B. brizantha* cv. Marandu quando recebe doses elevadas de nitrogênio extrai grandes quantidades de nutrientes do solo, principalmente de potássio. O manejo adequado do N na agricultura é fundamental para que não haja prejuízos na relação custo/benefício, no ambiente (acidificação do solo, liberação de gases do efeito estufa, eutrofização de lagoas e açudes), na nutrição de plantas e de animais e à saúde humana através da contaminação de mananciais hídricos por nitratos (COSTA, 2001).

2.3 Fixação biológica de nitrogênio

O processo realizado pelos microrganismos capazes de reduzir o N atmosférico a formas inorgânicas assimiláveis, e garantir a resiliência deste processo, é conhecido como fixação biológica do nitrogênio (FBN). Esse processo possui grande importância no aspecto econômico e ecológico, em sistemas agrícolas e florestais (REIS e TEIXEIRA, 2005).

A FBN atmosférico é realizada por microrganismos procarióticos conhecidos como diazotróficos. Os diazotróficos podem ser de vida livre, estar associados a espécies vegetais ou, ainda, estabelecer simbiose com leguminosas. Portanto os diazotróficos compreendem ampla gama de microrganismos procariotos, incluindo as arqueobactérias, cianobactérias, bactérias Gram positivas e Gram negativas que apresentam grande diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. Essa diversidade garante não só a resiliência dos processos que mediam em determinado ecossistema, como também a ocorrência deste, nos mais diferentes habitats terrestres (MOREIRA et al., 2010).

A FBN é um dos mais importantes processos conhecidos na natureza e, nas associações com gramíneas, e realizado por alguns gêneros de microrganismos tais como: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Burkholderia* (BALDANI et al.,

1999). As bactérias citadas tem demonstrado seu potencial agrícola seja via FBN, seja através da produção de hormônios vegetais, promovendo incremento no crescimento de plantas de diferentes espécies com ênfase no uso das gramíneas forrageiras (SILVA e REIS, 2009).

A contribuição da FBN associativa a nutrição vegetal não é tão significativa como as simbioses, entretanto se for considerada a grande extensão de terras recobertas por gramíneas e cereais, esta se torna importante, em termos globais (MOREIRA et al., 2010).

O N fornecido pelo processo de fixação biológica é menos propenso a lixiviação e volatilização já que ele é utilizado *in situ*, sendo assim, o processo biológico é uma alternativa com menor custo, limpa e sustentável para o fornecimento de N na agricultura comercial (HUERGO, 2006).

2.4 Inoculação com bactéria *Azospirillum brasilense*

Vários estudos têm sido realizados buscando identificar microrganismos que tenham simbiose com gramíneas, como acontece na cultura da soja com a bactéria *Bradyrhizobium japonicum*. Pesquisadores do estado do Paraná testaram e selecionaram estirpes de *Azospirillum* que melhor sobreviviam no solo, se adaptavam as tecnologias empregadas em milho e promoviam maior crescimento de planta. Estes estudos foram promissores para a autorização pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) das estirpes de *A. brasilense* Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 na a produção de inoculantes comerciais para a cultura do milho. Trabalhos realizados por essas entidades demonstraram que há incremento médio de 24% a 30% no rendimento de grãos de milho quando inoculados com *A. brasilense* (HUNGRIA, 2011).

Bactérias do gênero *Azospirillum* podem atuar no crescimento vegetal por meio da redução do nitrato até amônia, podendo essa energia ser disponibilizada a outros processos vitais do metabolismo, no entanto, este processo de fixação biológica também necessita de energia na forma de adenosina-tri-fosfato (ATP) para acontecer (FERREIRA et al. 1997).

O gênero *Azospirillum* apresenta grande distribuição ecológica, podendo ser encontrado em raízes de plantas de clima tropical e temperado, neste grupo são encontradas espécies como *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. irakense*, *A. halopraeferans*, *A. largimobile* e *A. dobereinera* (PATRIQUIN et al., 1983; REIS et al., 2002).

Dentre as bactérias fixadoras de nitrogênio presentes na rizosfera das gramíneas, o gênero *Azospirillum*, em especial a espécie *Azospirillum brasilense*, constitui uma gama de estudos devido a sua ampla distribuição nos solos tropicais e subtropicais, tais estudos vem demonstrando que o uso desta bactéria tem estimulado o crescimento vegetal, aumentando a produtividade e concentrações de nitrogênio em diversas plantas de interesse agropecuário (REIS et al., 2000; HARTMANN e BALDINI, 2006).

Dentre as contribuições do uso da *Azospirillum brasilense* destacam-se o aumento na taxa de acúmulo de matéria seca, aumento na biomassa e altura, aceleração na taxa de germinação e benefícios no sistema radicular, proporcionando consequente aumento na produtividade final (HUNGRIA, 2010; DALLA SANTA et al., 2004; VOGEL et al., 2013).

Apesar de nas últimas décadas os estudos se voltarem ao uso desta espécie de bactéria, estes ocorrem principalmente sobre plantas de interesse agrícola, poucos foram realizados em poáceas forrageiras. A principal contribuição do uso desta bactéria é relacionada à alta capacidade da mesma em fixar N₂ em forma assimilável pela planta, de preferência em amônia. (FRANCHE et al., 2009).

Segundo Reis Júnior et al. (2008) o uso de bactérias promotoras de crescimento além beneficiar no mecanismo de fixação biológica de nitrogênio, auxiliam na produção de hormônios que estimulam o crescimento vegetal, dentre eles auxina, citocinica e giberilina. A *Azospirillum brasilense* especificamente apresenta uma elevada produção de auxinas, sendo este hormônio responsável por modificações morfológicas nas raízes como, comprimento, ramificações e aumento de pêlos radiculares (DOBBELAERE et al., 1999; MIYAUCHI, et al., 2008).

A *Azospirillum brasilense* via FBN em pastagens forneceu um incremento de aproximadamente 40 kg N ha⁻¹ ano⁻¹, em estudos realizados nas espécies *Pennisetum americanum* e *Panicum maximum* (LABANDERA, 1994). Franche et al. (2009) observaram que a FBN contribui de 7 a 10 kg ha⁻¹ mês⁻¹ durante a época de verão, o que varia conforme o genótipo, sendo que 39% do N necessário poderia ser obtido via fixação biológica.

A FBN é um processo que depende de vários fatores. Para que a bactéria estabeleça uma interação positiva com a planta é indispensável a utilização de estipes de *Azospirillum brasilense* selecionadas (HUNGRIA, 2011) capazes de competir com os

microrganismos já presentes no solo. Outro fator a ser levado em consideração é a escolha do genótipo a ser inoculado, pois a relação benéfica de simbiose entre o híbrido e a bactéria é determinada pela qualidade dos exsudatos liberados pelas raízes da planta (NEHL et al., 1996).

Esse fenômeno é conhecido por quimiotaxia, onde cada genótipo libera uma quantidade de exsudato diferente, com composição química distinta, que pode ou não ser atrativo e servir de fonte de carbono (malato, piruvato, succinato e frutose) para as bactérias inoculadas (QUADROS, 2009). Quanto à sobrevivência deste microrganismo, sabe-se que a *A. brasilense* tem baixa capacidade de sobreviver por períodos prolongados de tempo na maioria dos solos.

As condições físico-químicas do solo e a ausência da planta hospedeira podem afetar diretamente a população da bactéria (BASHAN et al., 1995). A inoculação com *Azospirillum* é realizada de maneira similar a inoculação de sementes de soja com *Bradyrhizobium*. O produto, contendo estirpes de *Azospirillum*, pode ser aplicado na forma sólida (como turfa) ou na forma líquida. Também, é necessário ser cauteloso às condições de temperatura, não deixando exposto ao sol e sem aplicação conjunta com agroquímicos, já que trata-se de microrganismos vivos (HUNGRIA et al., 2010; JORNAL COOPERCAMPOS, 2009).

O método de aplicação do inoculante mais comum é via sementes. Devido a necessidade do tratamento de sementes e da comodidade quando este é feito industrialmente, a inoculação via sulco de semeadura vêm sendo estudada como uma forma de evitar toxidez dos produtos utilizados no tratamento de sementes sobre a bactéria, já que alguns produtos químicos podem desestruturar o flagelo usado pela *A. brasilense* na associação com a planta (CROES et al., 1993). Conforme Basi et al. (2011) a aplicação de *A. brasilense* (estirpes Abv5 e Abv6) proporcionou incremento na produtividade do milho, sendo que a inoculação via sulco de semeadura não diferiu da realizada nas sementes, mostrando-se método de aplicação eficiente.

Os benefícios da inoculação de *Azospirillum brasilense* podem ser verificados em outras culturas. Um exemplo disso, é o trabalho de Sala et al. (2008), que trabalharam com inoculação de sementes de trigo (*Triticum aestivum* hard L. e *Triticum durum* L.) e forneceram 0, 60 e 120 kg ha⁻¹ de ureia (70% na semeadura e 30 % 30 dias após a semeadura), eles observaram que houve interação da resposta das bactérias endofíticas

com a adubação nitrogenada. Como resultado da pesquisa, obteve-se a maior quantidade acumulada de N com a inoculação da estirpe IAC-AT-8 de *A. brasiliense* e com a adição de 60 kg ha⁻¹ de N, quando comparado a testemunha. Também observaram que quando a dose de N passou de 60 para 120 kg ha⁻¹, houve decréscimo linear no índice de eficiência de utilização do nutriente. Isto demonstrou que o incremento na produção de MS da parte aérea diminuiu conforme foi aumentada a dose de N.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo do solo e tratamentos

O solo utilizado, classificado como Neossolo Quartzarênico (SANTOS, 2013), textura arenosa, foi coletado no município de Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. O solo foi coletado na camada de 0-20 cm, em área sob vegetação de cerrado. Com o auxílio de uma enxada, as primeiras camadas foram removidas e limpas para que não houvesse a mistura da parte superior com o solo utilizado para o experimento. O material foi coletado e armazenado em sacos de plásticos para assim evitar a mistura de impurezas.

Após destorroadas, a amostra do solo foi tamisado em peneira de 5 mm de abertura de malha e secas ao ar. Subamostra foi passada em peneira de 2 mm de abertura de malha, constituindo a terra fina seca ao ar para a caracterização química (Tabela 1) e física.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, arranjado num fatorial 2x5, com quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos pela combinação de dois fatores: inoculação com *Azospirillum brasilense* (presença ou ausência) e doses de nitrogênio (0, 50, 100, 150 e 200 kg ha⁻¹) em cobertura. Cada parcela foi constituída por um vaso de 5 dm³, totalizando 40 parcelas experimentais.

Tabela 1. Análise química do solo coletado para o experimento.

pH	P	MO	K	Ca	Mg	Ca+Mg	Al	H	H+Al	S	T	V	
CaCl ₂	Água	mg/dm ³	mg/dm ³	-----cmol/dm ³ -----								%	
4,47	5,10	3,84	1,78	0,01	0,1	0,4	0,50	0,20	0,53	0,73	0,51	1,24	41,13

3.2 Caracterização física e química do solo

A análise física envolveu a determinação da composição granulométrica da TFSA, pelo método da pipeta (DAY, 1965), com quatro replicatas. O resultado encontrado foi de 870, 30 e 100 g kg⁻¹, respectivamente de argila, silte e areia.

Os atributos químicos determinados foram: pH, complexo sortivo, C orgânico e micronutrientes, com quatro replicatas por determinação, de acordo com Claessen (1997).

3.3 Condução do experimento

O experimento foi realizado em casa de vegetação da Universidade Federal da Grande Dourados, localizado nas coordenadas (22°11'43.7"S e 54°56'08.5"W, altitude de 452 m), no município de Dourados – MS, no período de setembro de 2014 a junho de 2015. O clima da região é classificado de acordo com a classificação de Köppen (1948), do tipo Cwa – mesotérmico úmido.

As amostras de solo contidas nos vasos foram submetidas a duas incubações sequenciais por um período de 30 dias cada uma, sob condições de umidade equivalente a 60% do volume total de poros (VTP) ocupados por água (FREIRE et al., 1980), controlada por pesagem diária.

A primeira incubação do solo foi após a aplicação do corretivo para a correção da acidez do solo para elevar a saturação por bases do solo para 50%, utilizando o calcário dolomítico, na dosagem de 3,5 t ha⁻¹ (86% de PRNT, 31% de CaO e 21% MgO). Após 30 dias, o solo de cada vaso foi seco e peneirado e recebeu a aplicação da adubação de implantação, sendo feita com aplicação de fósforo, potássio, enxofre e micronutrientes, correspondente aos seguintes teores de nutrientes na forma de sais p.a. em mg dm⁻³ de solo: 150 de K; 150 de P; 62 de S; 0,81 de B; 1, 3 de Cu; 5,0 de Zn; 3, 6 de Mn; 1,6 de Fe e 0,15 de Mo, cujas fontes foram K₂SO₄, (NH₄)₂HPO₄, NH₄NO₃, KH₂PO₄, H₃PO₄, H₃BO₃, MnSO₄.2H₂O, CuSO₄.5H₂O, (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, FeSO₄.7H₂O, ZnSO₄.7H₂O.

Após as incubações procedeu-se a semeadura. Foram semeadas 15 sementes diretamente nos vasos. As sementes foram inoculadas com *Azospirillum brasilense* na dosagem de 30 g de inoculante turfoso para cada kg de sementes e deixado por 15 minutos até a aderência do material. Utilizou-se para o experimento um inoculante comercial @Qualy fix gramíneas. A dose utilizada foi a de 30 g kg⁻¹ de sementes recomendada pelo produto, em gramíneas. Dez dias após a semeadura, foram efetuados desbastes deixando-se três plantas de *Brachiaria decumbens* por vaso. Os vasos foram mantidos com umidade em 60% VTP (FREIRE et al., 1980).

As adubações em cobertura com nitrogênio foram parceladas em quatro vezes, sendo que, a primeira aplicação foi feita no momento da semeadura, as demais foram feitas aos 10, 20 e 30 dias após a semeadura (DAS), conforme os tratamentos.

Foram realizados dois cortes da parte aérea das plantas, com intervalo de 30 dias. O primeiro corte foi realizado 30 dias após a semeadura, a 5 cm do colo da planta, para uniformização da pastagem. O segundo corte foi realizado aos 60 dias após a semeadura, esse sendo para avaliação da forrageira.

Os parâmetros avaliados foram à altura das plantas, número de folhas, número de perfilho, massa seca de raízes e da parte aérea das plantas, teor de clorofila e eficiência de uso do nitrogênio. A altura das plantas foi medida com régua graduada, do solo até a curvatura do dossel da planta. A determinação do teor de clorofila foi realizada de forma indireta pela leitura SPAD - 502 (Soil Plant Analysis Development), com o emprego de um clorofilômetro. Após o corte da parte aérea, as raízes foram peneiradas em malha de 2 mm e lavadas. Todo o matéria coletado, parte aérea e raiz, foi seco em estufa de circulação de ar, a 65°C por 72 horas, até atingir massa seca constante (MALAVOLTA, 1997), e pesado posteriormente, para determinar massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR). Determinou também a relação MSPA/MSR.

A estimativa da eficiência de uso do N foi obtida dividindo-se a massa seca da parte aérea por vaso pela quantidade de nitrogênio aplicada por vaso, valores expressos em g de massa seca por g de N adicionado (CASTAGNARA, 2005).

Após a coleta da parte aérea, separou o sistema radicular mediante lavagem de todo o solo restante do vaso, após a amostragem, sob água corrente e com auxílio de peneiras com malha de 2 mm. Após coleta e lavagem, todo o material coletado foi seco em estufa de circulação de ar, a 65°C por 72 horas. Após a secagem e pesagem as amostras foram moídas em moinho tipo Willey, com peneiras de diâmetro de 1 mm, para determinação dos teores de N, P, K, Ca e Mg, descritos por Malavolta et al. (1997).

3.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e a comparação de médias ao teste Tukey a 5%, utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT (SILVA e AZEVEDO, 2006). Para as doses de N, empregou-se a análise de regressão, quando constatado a significância das doses.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados da análise de variância (Tabela 2), foram observados efeitos significativos ($P < 0,05$ e $P < 0,01$) para inoculação e doses nos caracteres avaliados: altura de planta, número de perfilho, massa seca da parte aérea (MSPA), matéria seca de raiz (MSR) e eficiência de nitrogênio. Observa-se que a inoculação de sementes da forrageira proporcionou as maiores alturas de planta, número de perfilhos, massa seca da parte aérea, massa seca de raiz e maior eficiência no uso de nitrogênio (Tabela 2)

Tabela 2. Resumo da análise de variância conjunta com fontes de variação e médias de altura de plantas, número de perfilho, massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR) e eficiência de nitrogênio (Efic. N). Dourados – MS, 2015.

F. V	Quadrados médios (parâmetros produtivos)						
	Altura	NºPerfilho	MSPA	MSR	MSPA/MSR	SPAD	Efic.N
Inoculação	126,02**	205,66**	25,63*	108,07**	0,0196 ns	76,17*	65,00**
Doses	670,27**	1439,81**	867,66**	1528,86**	0,3154**	524,21**	39,40**
Inocxdoses	10,77**	33,39**	12,55*	9,79**	0,0058 ns	20,76 ns	4,98**
Resíduo	1,92	5,30	3,54	2,18	0,0072	11,19	0,50
CV%	5,36	6,67	6,42	4,78	8,43	8,03	3,38
Médias							
Com inoc	60,75 a	36,79 a	30,11 a	32,58 a	0,98 a	43,05 a	22,55 a
Sem inoc	57,20 b	32,25 b	28,51 b	29,29 b	1,03 a	40,29 a	19,70 b

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV = coeficiente de variação; * = diferença significativa ($P < 0,05$); ** = diferença significativa ($P < 0,01$); ns = não significativo ($P > 0,05$).

4.1 Altura de plantas

Houve ajuste linear entre as alturas e as doses de N. A dose de 200 kg ha⁻¹ proporcionou as maiores alturas de plantas (Figura 1). Nas doses máximas de N, foram verificadas alturas de 70 cm, com e sem inoculação, mostrando aumento em relação a não aplicação de N de 46 e 76%, respectivamente. Isto devido a maior disponibilidade de N no solo e sua consequente absorção pelas plantas, com reflexos no crescimento da planta.

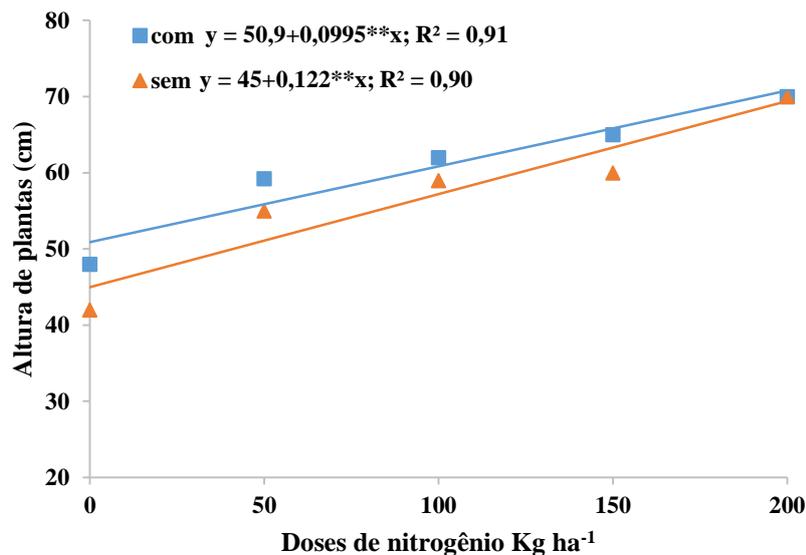


Figura 1. Altura de plantas de *Brachiaria decumbens* em função das doses de nitrogênio com inoculação e sem inoculação com *Azospirillum brasilense*, Dourados-MS, 2015. ** - significativo a 1% de probabilidade.

Esse resultado é decorrente das funções desempenhadas pelo nitrogênio, como componente estrutural de macromoléculas e enzimas, envolvidas no processo de desenvolvimento vegetativo das plantas (MALAVOLTA, 2006). Resultados semelhantes foram encontrados por Guimarães et al. (2011), que trabalhando com *B. brizantha* cv. Marandu inoculadas com *Azospirillum* sp. observaram para a variável altura de plantas, maiores valores para as plantas inoculadas com a estirpe AZ02, quando comparado com as plantas que não receberam nitrogênio nem a inoculação.

Segundo Alvim et al. (2000), a adubação nitrogenada acelera o ritmo de crescimento das plantas, interferindo na qualidade da forragem produzida. Essa alteração da velocidade de crescimento das plantas também foi observada por Sarmiento et al. (2005) quando da aplicação de N em *Panicum maximum* Jacq. cv. IPR- 86 Milênio, sob pastejo. Assim, segundo Nicácio (2012), de forma geral, gramíneas que não recebem adubação nitrogenada tornam-se ineficientes no crescimento e diminuem drasticamente o seu desenvolvimento.

De acordo com Silva et al. (2004), as alturas mais elevadas facilitam o pastejo e, conseqüentemente, o desempenho animal, e que, para uma mesma densidade de plantas, quanto maior a altura do pasto maior a produção de massa seca do mesmo. Entretanto, deve-se ressaltar que essa altura do pasto deve estar associada à idade da planta e a qualidade da forragem disponível para os animais (SILVA et al., 2010).

A inoculação propiciou um maior incremento na altura em relação a testemunha inoculada e não inoculada, pois, o crescimento foi de 47 e 42 cm, respectivamente. Observa-se que a maior eficiência da bactéria *A. brasilense* é onde as doses de nitrogênio são menores, justificando os resultados encontrado no presente trabalho, onde em altas doses de nitrogênio, a inoculação é praticamente nula.

4.2 Número de perfilho

Houve ajuste linear entre os números de perfilhos e as doses de N. A dose de 200 kg ha⁻¹ proporcionou os maiores números de perfilhos (Figura 2). Nas doses máximas de N, foram verificados número de perfilhos de 52,55 e 52, com e sem inoculação, mostrando aumento em relação a não aplicação de N de 104 e 242%, respectivamente, justificando a importância da adubação nitrogenada para a *B. decumbens*.

Levando-se em consideração que o número máximo de perfilhos (52 perfilhos) encontrados corresponderam aos tratamentos com a dose de 200 kg ha⁻¹, independente da inoculação, mostra que o nitrogênio tem capacidade para estimular os pontos de crescimento da forrageira permitindo maior perfilhamento, uma vez que, gramíneas forrageiras sob condição vegetativa apresentam alta taxa de aparecimento foliar, resultando em alta densidade de perfilhamento, pois em cada inserção de folha, existe uma gema que, em função das condições disponíveis, pode se transformar em um perfilho (ALEXANDRINO et al., 1999).

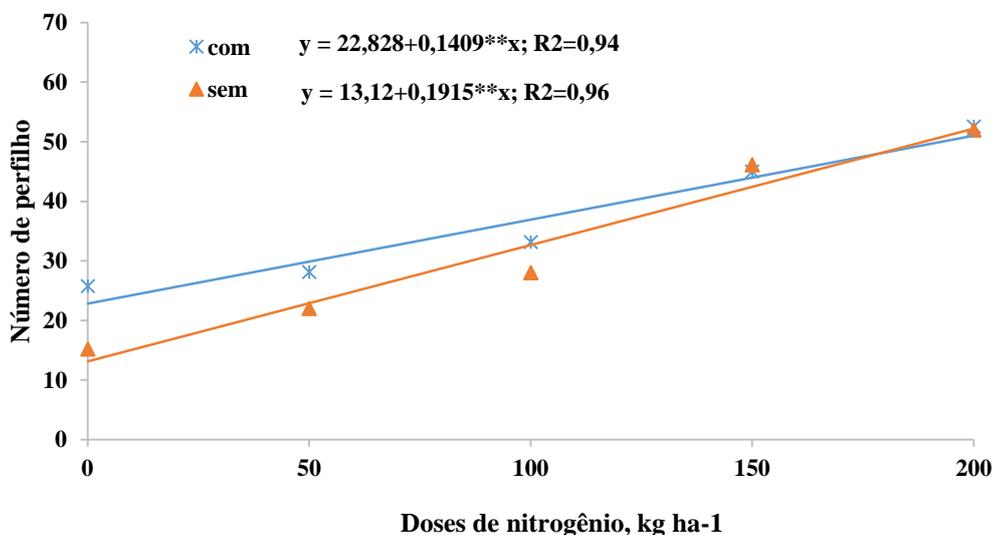


Figura 2. Número de perfilho da *Brachiaria decumbens* em função das doses de N e inoculação com *Azospirillum brasiliense*, Dourados-MS, 2015. ** - significativo a 1% de probabilidade.

Segundo Nabinger (1996), a baixa disponibilidade de N aumentam o número de gemas dormentes, o que influencia negativamente o perfilhamento, enquanto, o suprimento adequado do N permite produção máxima de perfilho. Entretanto, observa-se que essa gramínea sem aplicação de nitrogênio e com inoculação de bactérias diazotróficas produziu mais perfilhos do que o controle (sem aplicação de N e sem inoculação) (Figura 2). Esses resultados apontam que a inoculação é uma alternativa sustentável para aumento do perfilhamento e produção de forragem, em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio.

Alexandrino et al. (2005) estudando as características morfológicas e estruturais do capim-Marandu submetido a doses de N, observaram grande diferença de perfilhamento ao longo do tempo de rebrota em relação ao suprimento de nitrogênio, indicando que as plantas não adubadas com N quase não perfilharam ao longo do tempo.

4.3 Massa seca da parte aérea

Houve ajuste linear entre as massas secas da parte aérea da forrageira e as doses de N. A dose de 200 kg ha⁻¹ proporcionou as maiores massas secas (Figura 3). Nas doses máximas de N, foram verificadas massas secas de 45 e 44 g, com e sem inoculação, mostrando aumento em relação a não aplicação de N de 148 e 193%, respectivamente. Esse fato demonstra que a absorção de N da solução do solo, reflete no crescimento das gramíneas, e conseqüentemente na produção de massa seca da parte aérea.

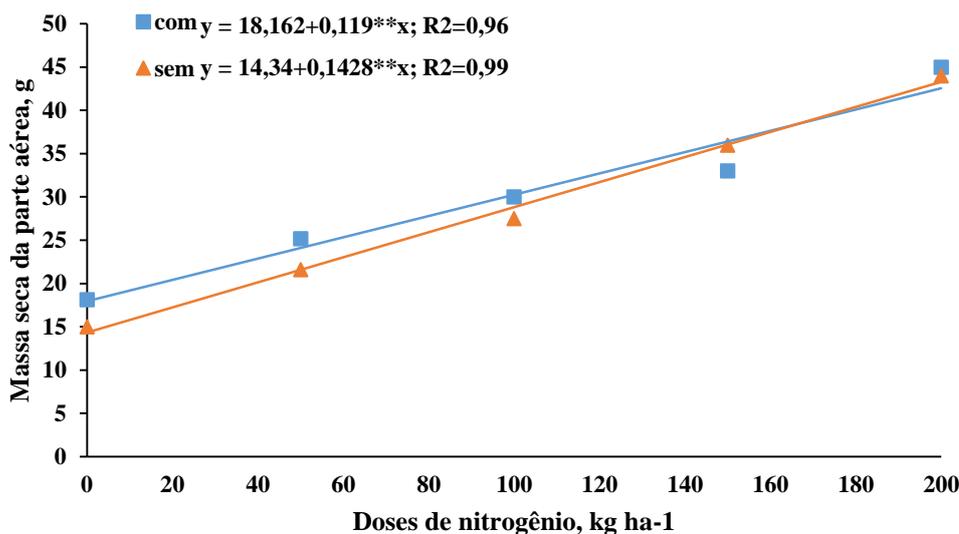


Figura 3. Massa seca da parte aérea da *Brachiaria decumbens* em função das doses de N e inoculação com *Azospirillum brasilense*, Dourados-MS, 2015. ** - significativo a 1% de probabilidade.

Nos tratamentos onde foi aplicado as menores doses de nitrogênio houve uma menor produção de massa seca (Figura 3). Esse incremento na produção de massa seca ocorre devido o N fazer parte de muitos compostos da planta, incluindo todas as proteínas (formadas de aminoácidos) e ácidos nucléicos (TAIZ e ZEIGER, 2004). Após a avaliação do estado nutricional das plantas, utilizando a diagnose visual, verificou-se deficiência de N nos tratamentos que não receberam adubação nitrogenada, independente da inoculação, enquanto, as plantas que receberam nitrogênio eram sempre mais vigorosas e verdes. Através de diagnose visual observou-se que essas plantas não adubadas com nitrogênio apresentaram clorose generalizada. Essas observações reforçam a importância da adubação nitrogenada na *Brachiaria decumbens*.

Fagundes et al. (2006) afirmam que o suprimento de nitrogênio no solo, normalmente, não atende à demanda das gramíneas, por isso, quando é realizada a adubação nitrogenada, são observadas alterações relevantes na massa seca do capim-braquiária. Os autores observaram que houve aumento na produção de massa seca à medida que a adubação nitrogenada foi aumentada até a dose de 300 kg ha⁻¹. Silva et al. (2005) também verificaram aumento na produção ao avaliarem o capim marandu com seis doses de nitrogênio (0, 50, 100, 200, 400 e 800 kg ha⁻¹). Kawatoko et al. (2012) verificaram aumento significativo na produção de matéria seca com o aumento das doses de N, que em relação à ausência de N, as doses 50 e 100 kg de N produziram um acréscimo, respectivamente de 60 e 92% de matéria seca. Corroboram também com os

resultados obtidos no estudo realizado por Martuscello et al. (2009), na qual os autores afirmam que o aumento na produção de forragem com a aplicação de nitrogênio é fato esperado em ensaios dessa natureza, devido ao conhecido efeito do N no acúmulo de matéria seca, pois o suprimento de N é um dos fatores de manejo que controla os diferentes processos de crescimento das plantas.

4.4 Massa seca de raiz

Houve ajuste linear entre as massas secas de raiz e as doses de N. A dose de 200 kg ha⁻¹ proporcionou as maiores massas secas (Figura 4). Nas doses máximas de N, foram verificadas massas secas de 44,45 e 46,45 g, com e sem inoculação, mostrando aumento em relação a não aplicação de N de 182 e 304%, respectivamente. Até a dose de 100 kg ha⁻¹, os tratamentos que foram inoculados apresentaram as maiores médias de massa seca, a partir dessa dose os tratamentos sem inoculação passam a apresentar as maiores médias de massa seca de raiz, sugerindo que a inoculação exerceu influência sobre o crescimento radicular da forrageira até a dose de 100 kg ha⁻¹.

Esse resultado se deve as altas concentrações de amônia (NH₃), e baixas concentrações de oxigênio e carbono que inibem o complexo nitrogenase do *Azospirillum* (KAVADIA et al. 2008). Portanto, a inoculação à base de bactérias do gênero *Azospirillum* deve competir satisfatoriamente com as bactérias diazotróficas nativas e com microflora do solo (DIDONET et al., 2000). A capacidade competitiva das bactérias diazotróficas com outras é alta somente quando as condições do solo são de baixa disponibilidade de N no ambiente (SILVA et al., 2007), conforme observado no presente trabalho, o efeito vinculado a produção da massa seca da parte aérea (Figura 3) e de raiz (Figura 4), somente foi observado nos tratamentos que receberam N até a dose de 100 kg ha⁻¹.

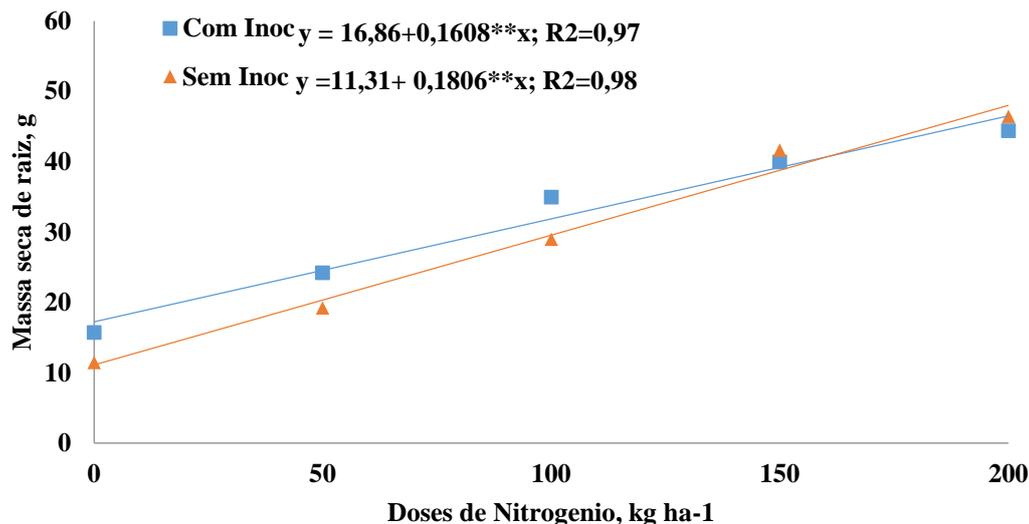


Figura 4. Massa seca da raiz da *Brachiaria decumbens* em função das doses de N e inoculação com *Azospirillum brasiliense*, Dourados-MS, 2015. ** - significativo a 1% de probabilidade.

De acordo com Hungria (2011) a inoculação de *Azospirillum brasilense* proporciona o aumento do sistema radicular e ainda, segundo Bazzicalupo e Okon (2000) este efeito é atribuído à produção e liberação de substâncias reguladoras do crescimento vegetal, como auxinas, giberelinas e citocininas, o que vai além do simples aumento de radículas, mas também proporciona maior diâmetro das raízes laterais e adventícias, que aumentam o tamanho e a superfície radicular podendo contribuir para melhor absorção de nutrientes e água do solo (MOREIRA et al., 2010).

Essas afirmações estão de acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, visto que, os tratamentos que receberam os isolados de *Azospirillum* mostraram maior incremento de massa seca radicular, sendo superior ao controle. Durante a separação das raízes, após o corte da parte aérea, chamou atenção o fato de que todas as plantas que não receberam a inoculação, apresentaram sistema radicular com menor volume, enquanto o sistema radicular das plantas inoculadas era muito extenso e ocupava todo o volume do solo nos vasos. Corroboram também os realizados por Okon e Vanderleyden (1997), no qual os autores afirmam que esses microrganismos contribuem, não só com a FBN, mas principalmente, proporcionando alterações morfológicas e fisiológicas nas raízes de plantas inoculadas. Bactérias promotoras de crescimento vegetal são benéficas as plantas e possuem a capacidade de colonizar as raízes e outros tecidos internos do vegetal, sem causar sintomas de doenças (REIS, 2007).

Esses resultados diferem dos encontrados por Guimarães et al. (2011) que trabalhando com *Brachiaria decumbens* inoculada com *Azospirillum* spp. não

observaram diferença estatística entre os tratamentos de inoculação e o adubado para a massa seca de raiz.

Os valores encontrados no presente trabalho são inferiores aos encontrados por Santos (2001), que verificou que a máxima produção de massa seca de raízes no capim marandu ocorreu na dose de nitrogênio de 303 mg L⁻¹ e por Santos e Monteiro (1999) também relataram que a dose para maximizar a produção de massa seca de raízes da *Brachiaria decumbens* foi de 453 mg L⁻¹. Portanto, para maximizar a produção de massa de raízes, provavelmente, haveria necessidade de adicionar doses maiores de N, visto que, a regressão linear foi a que se ajustou aos dados de massa seca das raízes.

4.5 Relação massa seca da parte aérea e raiz

Houve ajuste quadrático entre as relações massa seca da parte aérea e raiz e as doses de N. As menores relações MSPA/MSR foram estimadas em 0,78 e 0,90, nas doses de 145 e 138,33 kg ha⁻¹ de N, respectivamente, com e sem inoculação. A associação de plantas com *Azospirillum brasilense* é mais relacionada à promoção do desenvolvimento vegetal, principalmente do sistema radicular, do que à FBN, embora haja inúmeros relatos que apontam para a viabilidade desse processo (OLIVEIRA et al., 2007).

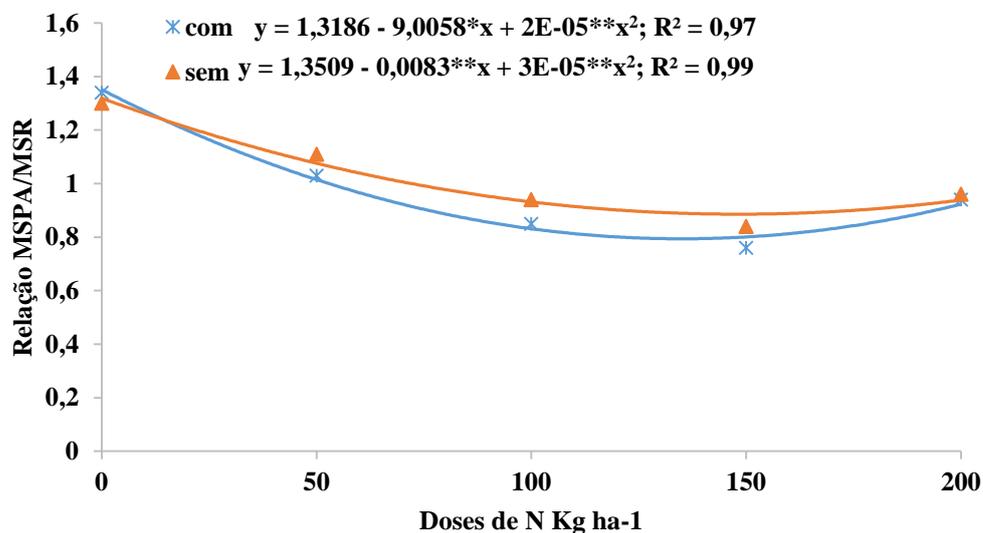


Figura 5. Relação da massa seca da parte aérea e massa seca de raiz da *Brachiaria decumbens* em função das doses de N e inoculação com *Azospirillum brasilense*, Dourados-MS, 2015. * - significativo a 5% de probabilidade; ** - significativo a 1% de probabilidade.

Quanto menor for o valor dessa relação maior será o peso da massa radicular, o que confere uma maior área superficial radicial, e conseqüentemente, a capacidade de absorção de água e nutrientes. Segundo Didonet et al. (2000), o incremento do sistema radicial em plantas inoculadas também pode propiciar maior longevidade aos tecidos verdes, em consequência ocorre um período de atividade fotossintética, o que resulta em quantidades maiores assimilação de N, em relação às plantas não inoculadas.

4.6 Índice SPAD

Houve ajuste linear entre as massas secas de raiz e as doses de N. A dose de 200 kg ha⁻¹ proporcionou as maiores leitura do índice SPAD (Figura 6). As médias ajustadas na maior dose foram de 51,6 e 53,2, com e sem inoculação, mostrando aumento de 55 e 110%, respectivamente. Da mesma forma, Abreu e Monteiro (1999) observaram valor SPAD máximo (32 e 45) no Capim-marandu nas doses de nitrogênio de 205 e 314,5 mg kg⁻¹.

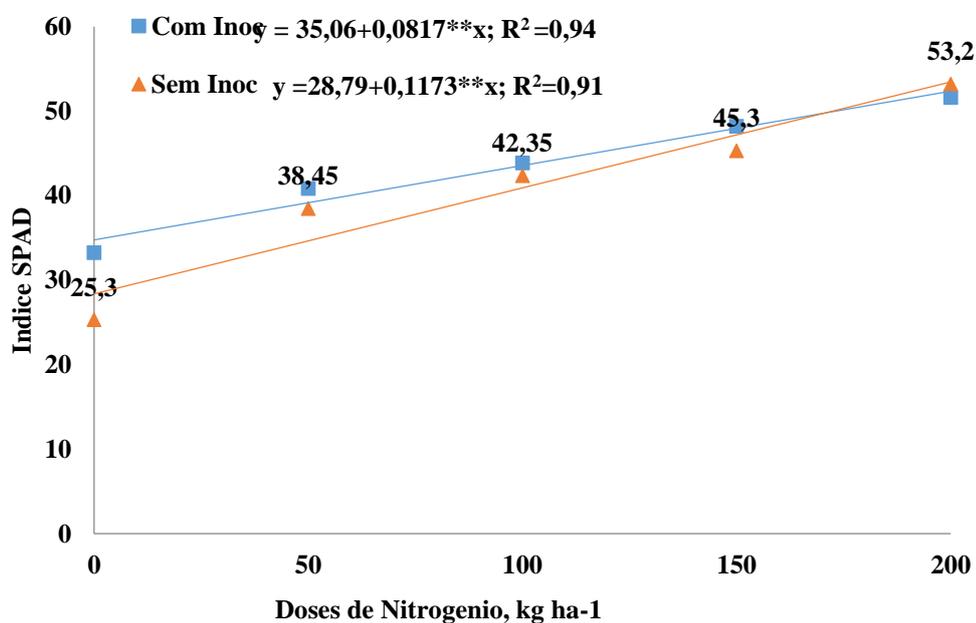


Figura 6. Índice SPAD da *Brachiaria decumbens* em função das doses de nitrogênio e inoculação com *Azospirillum brasiliense*, Dourados-MS, 2015. ** - significativo a 1% de probabilidade.

Bashan et al. (2006) relataram aumento em vários pigmentos fotossintéticos, tais como clorofila a, b e pigmentos foto protetivos auxiliares, em função da presença de *Azospirillum* spp., justificando seu efeito positivo no índice SPAD. Este pigmento está diretamente associada ao potencial de atividade fotossintética, assim como o estado nutricional das plantas está associado, geralmente, a quantidade e qualidade da clorofila (ZORATELI et al., 2002).

Resultados semelhantes foram encontrados por Jordão et al. (2010) em estudos realizados com inoculação em milho e capim, que observaram os valores do índice SPAD foram maiores nos tratamentos inoculados quando comparado ao não inoculado, principalmente nos tratamentos que receberam as menores doses de N comprovando a eficiência desse microrganismo em fixar nitrogênio.

Uma das hipóteses levantadas por diversos pesquisadores para a menor eficiência da inoculação, quando adicionado N, via adubação nitrogenada, seria um decréscimo na proporção de diazotróficos no solo em decorrência de uma supressão competitiva dos microrganismos heterotróficos na presença de formas combinadas de N. Além da influência de fertilizante nitrogenado na associação com os microrganismos causar inibição do processo, visto que o N disponível na forma mineral, inibe o complexo nitrogenase, e as plantas passam a utilizar o N disponível no solo (MUTHUKUMARASAMY et al., 1999; BERGAMASCHI 2006; SILVA et al., 2007). Devido à presença da nitrato redutase, a fixação de N_2 é prejudicada em altas concentrações de nitrato no solo ou na planta, assim, em áreas que receberam doses altas de nitrogênio não se recomenda a inoculação, visto que, inibe a fixação do N_2 (DOBEREINER, 1990).

4.7 Eficiência da utilização de nitrogênio

Houve ajuste quadrático entre as eficiência no uso de N e as doses de N. A dose de nitrogênio mais eficiente a ser aplicado no solo situou-se em torno de 105 kg ha^{-1} , com uma eficiência de 23,91, quando não houve a inoculação das sementes da forrageira com *Azospirillum*, entretanto, quando as sementes foram inoculadas, a eficiência estimada foi de 21,06 na dose de 79 kg ha^{-1} de N (Figura 7), resultando em acúmulos de massa seca com menor investimento em adubação nitrogenada.

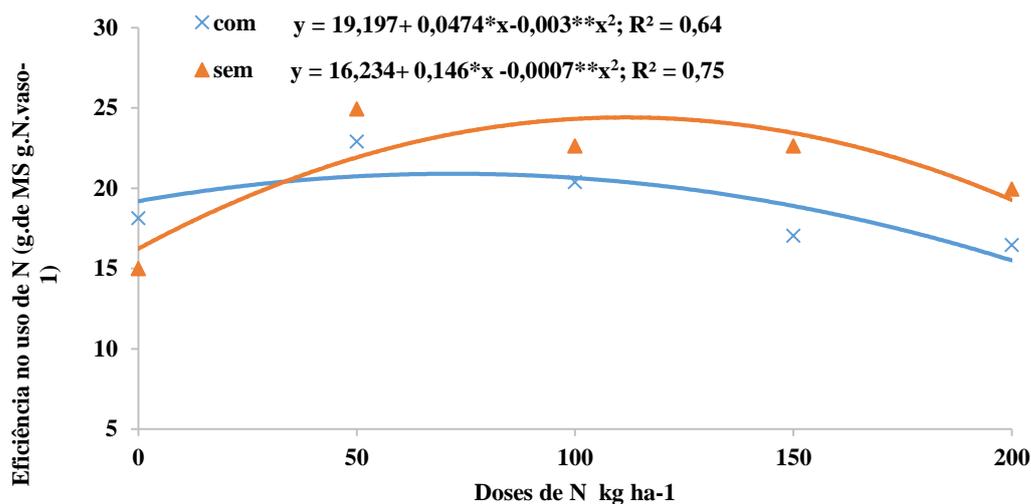


Figura 7. Eficiência do uso de nitrogênio na *Brachiaria decumbens* em função das doses de N e inoculação com *Azospirillum brasiliense*, Dourados-MS, 2015. * - significativo a 5% de probabilidade; ** - significativo a 1% de probabilidade.

A resposta à eficiência de utilização do nitrogênio pelas forrageiras é variável, Fagundes et al. (2005) trabalharam com *Brachiaria decumbens* em doses crescentes de nitrogênio observaram que com o aumento das doses houve redução linear na eficiência de utilização do nitrogênio.

Os benefícios da inoculação de *Azospirillum brasilense* podem ser verificados em outras culturas. Um exemplo disso, é o trabalho de Sala et al. (2008), que trabalharam com inoculação de sementes de trigo (*Triticum aestivum* hard L. e *Triticum durum* L.) e forneceram 0, 60 e 120 kg ha⁻¹ de uréia (70% na semeadura e 30 % 30 dias após a semeadura), eles observaram que houve interação da resposta das bactérias endofíticas com a adubação nitrogenada. Como resultado da pesquisa, obteve-se a maior quantidade acumulada de N com a inoculação da estirpe IAC-AT-8 de *A. brasilense* e com a adição de 60 kg ha⁻¹ de N, quando comparado a testemunha. Também observaram que quando a dose de N passou de 60 para 120 kg ha⁻¹, houve um decréscimo linear no índice de eficiência de utilização do nutriente. Isto demonstrou que o incremento na produção de MS da parte aérea diminuiu conforme foi aumentada a dose de N.

O gênero *Azospirillum brasilense* se destaca por apresentar maior variedade de estudos, uma vez que está bactéria apresenta resultados satisfatórios quando associados a plantas da família poáceae, estudos mostram que o uso desta bactéria associada a pequenas doses de nitrogênio tem demonstrado alta eficácia tanto em relação a aspectos morfológicos quanto em produtividade (VOGEL et al., 2013). Kuss (2006) relata que o

uso desta bactéria auxilia em um aumento na produção de 12% a 14% quando comparado à ausência desta bactéria.

4.8 Teores de nutrientes na planta

De acordo com os resultados da análise de variância (Tabela 3), foram observados efeitos significativos ($P < 0,05$) para inoculação e doses somente para o teor de K. Observa-se que a inoculação de sementes da forrageira proporcionou os maiores teores de N na parte aérea da planta, mas, menores teores de Ca (Tabela 3). Os resultados deste experimento indicam alta extração de nitrogênio, mesmo no tratamento controle, devido à alta exigência em nitrogênio da forrageira e à capacidade de fornecimento do solo, entretanto, nos tratamentos que receberam o *Azospirillum* observaram-se os maiores teores de N, devido ao microrganismo proporcionar maior longevidade aos tecidos verdes do sistema radicular, em consequência ocorre maior período de atividade fotossintética, o que resulta em quantidades maiores de fotoassimilados para a própria assimilação de N, em relação às plantas não inoculadas (DIDONET et al, 2000).

Tabela 3. Resumo da análise de variância conjunta com fontes de variação e médias dos teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), magnésio (Mg) e cálcio (Ca) na parte aérea da forrageira. Dourados – MS, 2015.

F. V	Quadrados médios (parte aérea)				
	N	P	K	Mg	Ca
Inoculação	41,41**	0,42 ns	1,89 ns	0,16 ns	0,40*
Doses	725,27**	77,97 **	694,03**	11,81 **	19,17**
Inocx doses	2,41 ns	0,17 ns	0,27 *	0,01 ns	0,03 ns
Resíduo	1,57	0,48	4,80	0,05	0,06
CV%	7,45	9,79	8,0	7,29	7,48
Médias					
Com inoc	17,89 a	7,19 a	27,64 a	3,33 a	3,62 b
Sem inoc	15,85 b	6,98 a	27,20 a	3,20 a	6,42 a

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV = coeficiente de variação; * = diferença significativa ($P < 0,05$); ** = diferença significativa ($P < 0,01$); ns = não significativo ($P > 0,05$).

A adição de nitrogênio influenciou positivamente os teores de todos os nutrientes avaliados na parte aérea da *Brachiaria decumbens*, ajustando-se ao modelo linear (Figura 7 A, 7B, 7C, 7D e 7E).

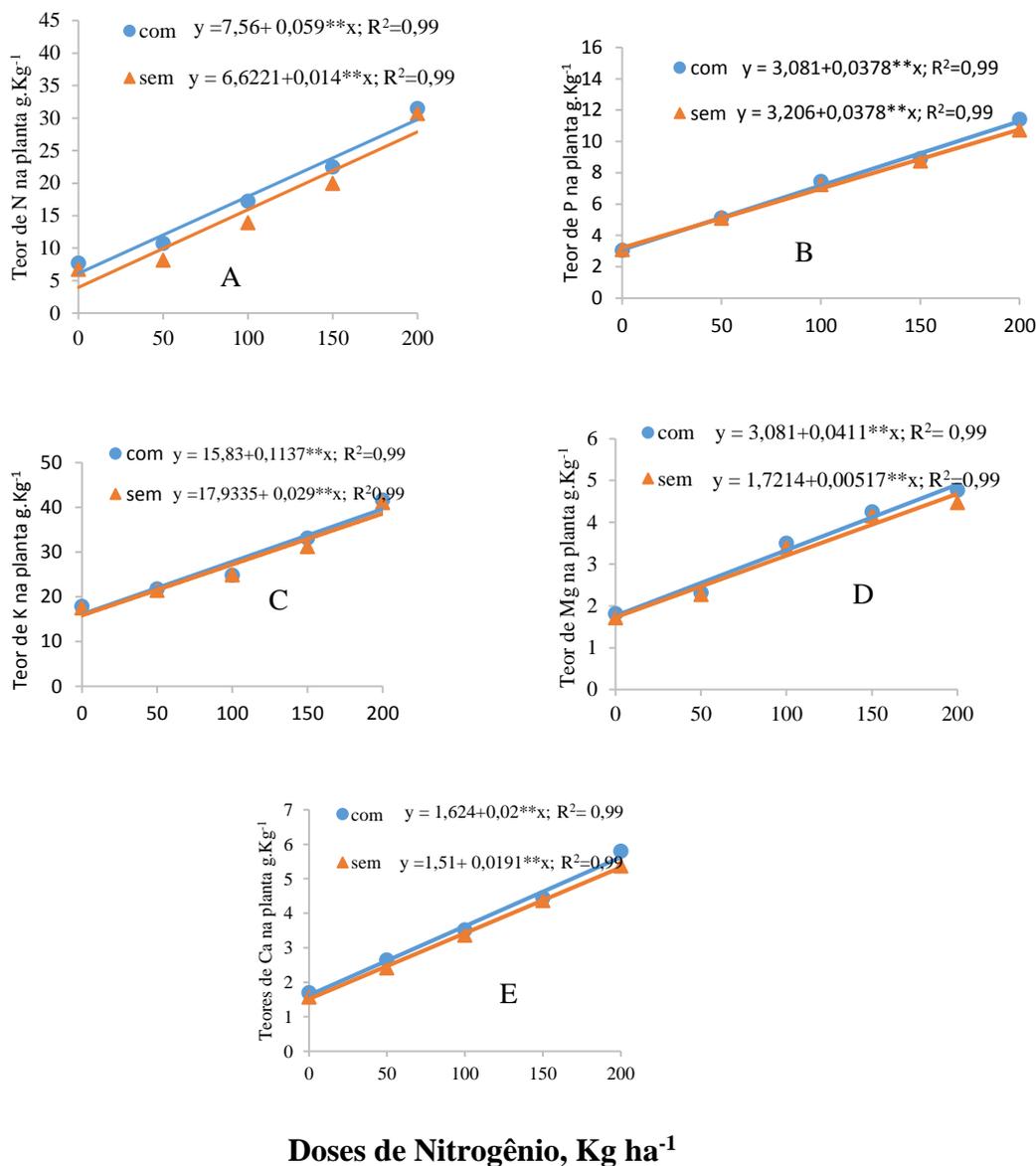


Figura 1. Teor de nitrogênio (A), fósforo (B), potássio (C), magnésio (D) e cálcio (E) na planta de *Brachiaria decumbens* em função das doses de N e inoculação com *Azospirillum brasilense*, Dourados-MS, 2015. ** - significativo a 1% de probabilidade.

O nitrogênio está entre o fator mais importante para determinar a produtividade por área e sua absorção influencia diretamente no teor de proteína bruta da forrageira. Segundo Werner et al. (2001), a faixa de teor de N adequado para o capim-braquiária é de 12-20 g kg⁻¹, o que comparando com os resultados encontrados neste experimento,

observa-se que somente atingiu os valores de referência na dose de 100 kg ha⁻¹ de N (Figura 7A). Segundo Cabral et al. (2013) estudando eficiência de produção e teor de nitrogênio em dois tipos de pastagens, as doses de nitrogênio que propiciaram maior teor de nitrogênio na parte aérea dos capins *Brachiaria brizanta* cv. Marandue *B. decumbens* foram de 289 e 380 kg ha⁻¹, respectivamente, justificando o ajuste linear encontrado neste trabalho, onde a maior dose (200 kg ha⁻¹) propiciou teor de 31,2 g de N na matéria seca. O que corrobora com Campos (2004), Silva et al. (2005) e Oliveira et al. (2005), que também verificaram aumento no teor de N na parte aérea à medida que ocorreu elevação no fornecimento do elemento para as forrageiras.

Para o elemento fósforo quanto ao fator doses, observou-se que foi significativo na planta. A medida que se aumenta a dose de nitrogênio, observa-se o aumento linear na concentração de fósforo, portanto, nota-se a relação entre os dois nutrientes. Para a concentração de fósforo o ajuste foi linear onde, na dose de 200 kg ha⁻¹ a média foi de 11,42 g kg⁻¹ (Figura 7 B). Resultado semelhante observado por Costa et al. (2010), que encontraram também resposta linear do teor de P no tecido foliar em função das doses de nitrogênio aplicadas.

De acordo com Costa et al. (2010), a extração de fósforo em cultivares de *Brachiaria brizantha* tem resposta linear em função das doses de nitrogênio aplicadas, e a dose de 150 mg.dm⁻³ extraiu 48% do fósforo no tecido foliar. Segundo Werner et al. (1996), a faixa de teor de P adequado para o capim-braquiária é de 0,8-3,0 g kg⁻¹, mesmo sem a adição de N (controle) os teores de P na planta foram superiores aos valores de referência. O que demonstra que o P não foi o fator limitante para a forrageira.

Os teores de potássio na biomassa aérea de *Brachiaria decumbens* foram influenciados pelas doses de N (Figura 7 C), mostrando assim, a relação do potássio com o nitrogênio, pois a medida que se aumentou a dose de N, ocorreu um aumento linear na concentração de potássio na parte aérea da forrageira, com valores de 17,5 e 41,4 g.kg⁻¹ de K na MS respectivamente, nas doses 0 e 200 kg de N ha⁻¹.

Essa elevação nos teores de K, se deve à alta correlação entre N e K, onde há existência de sinergismo entre o N aplicado e o K foliar. Primavesi et al. (2006) detectaram aumento nos teores de K foliar, variando de 28 a 35 g kg⁻¹, com as doses de N na *B. brizanta* cv. Marandu. Tal fato também foi verificado em estudos realizados por Costa et al. (2008) e Costa et al. (2009), em Marandu e por Primavesi et al. (2005), em

capim Coast-cross, que obtiveram correlação positiva entre as doses de N aplicadas e as concentrações de K foliar.

A planta bem nutrida com nitrogênio tende a absorver com maior eficiência outros elementos como P e K (THÉLIER e HUCHÉ et al., 1999) desde que esses elementos estejam disponíveis em quantidades satisfatórias. A composição do tecido vegetal de uma planta apresenta equilíbrio entre os elementos N, P e K (THÉLIER e HUCHÉ et al., 1999), este equilíbrio e sua manutenção caracteriza o comportamento de crescimento da planta (THÉLIER e HUCHÉ et al., 1999). Em condições normais de nutrição mineral no solo a absorção de minerais pela planta ajusta-se com a velocidade de crescimento dos novos tecidos do vegetal de forma dinâmica a absorção para uma determinada oferta de P e K no solo, elementos que estão em função da quantidade de nitrogênio disponível à planta (THÉLIER e HUCHÉ et al., 1999). O potássio é considerado o segundo elemento mais necessário a planta, estando após o nitrogênio (Malavolta, 1980).

Segundo Werner et al. (1996), a faixa de teor de K adequado para o capim-braquiária é de 12-25 g kg⁻¹, mesmo sem a adição de N (controle) a concentração de K na planta foram superiores aos valores de referência. O que demonstrou que o K também não foi o fator limitante para o desenvolvimento da forrageira.

Somente o fator doses de N foi significativo quando analisado o magnésio, pois, ao aumentar as doses de nitrogênio, observou-se aumento no teor de magnésio na planta (Figura 7 D). O incremento nas concentrações de Mg pode ser explicado devido ao fato do maior crescimento radicular, e a necessidade de maiores teores de Mg para a produção de compostos, como na produção de clorofila, devido à adubação nitrogenada. A clorofila é responsável por 10% do teor total do Mg nas folhas (VITTI et al., 2006), por sua vez a adubação nitrogenada resulta em maior produção de clorofila, e, portanto, requer maiores quantidades de Mg. Costa et al. (2008) evidenciaram que os teores de clorofila aumentaram com as doses de N. Além da clorofila, o Mg acumulado pode ser utilizado para a ativação enzimática, salientando, que o Mg afeta a síntese de proteínas (VITTI et al., 2006).

A medida que se aumentou as doses de nitrogênio, o teor de cálcio também foi aumentando, sendo que, quando se aumenta os teores de nitrogênio no solo a planta tende a ter maior absorção de cálcio, haja visto, que essa planta vai ter crescimento mais elevado. Esse aumento foi de 5,8 g kg⁻¹ de Ca na maior dose adicionada (200 kg ha⁻¹ de N)

(Figura 1 E). Este incremento nos teores de Ca, pode ser explicado, pelo maior acúmulo de N foliar, visto que, o acúmulo de N demanda maiores quantidades de Ca para a produção de parede celular (apoplasmas), novos compostos, tecidos e organelas (Primavesi et al., 2005). Doses de nitrogênio foram altamente determinantes na concentração de cálcio nas folhas do capim braquiária, em que Primavesi et al. (2005) observaram que doses crescentes de N propiciaram aumentos nos teores de cálcio e Mg nas plantas, além de outros minerais, portanto, esses resultados corroboram com os encontrados nesse estudo.

De modo geral, houve aumento no teor de todos os elementos analisados na planta quando as sementes da forrageira foram inoculadas. Um dos efeitos da inoculação de *Azospirillum* é o aumento da absorção de nutrientes. Segundo Didonet (1993) que trabalhou com trigo, as raízes das plantas inoculadas apresentaram taxa mais elevada de excreção de prótons, resultando na queda de pH da rizosfera, favorecendo a troca de prótons por cátions. Uma outra explicação é a modificação da morfologia do sistema radicular, proporcionado pela inoculação, provavelmente devido à produção de substâncias promotora do crescimento (auxinas), que aumentam o tamanho e a superfície radicular (CAVALLET et al., 2000), de modo que possibilite maior volume de exploração do solo, e por consequência, mais influxo de nutrientes.

4.9 Atributos químicos do solo

Houve interação para inoculação e doses de N ($P < 0,05$ e $P < 0,01$), somente para os teores de P, SB e CTC (Tabela 4). A inoculação contribuiu para Observa-se que a inoculação de sementes da forrageira proporcionou os maiores teores de K no solo

Tabela 4. Resumo da análise de variância conjunta com fontes de variação e médias dos teores de cálcio (Ca), fósforo (P), potássio (K), magnésio (Mg), soma de bases (SB) e capacidade de troca de cátions (CTC) no solo. Dourados – MS, 2015.

F. V	Quadrados médios (solo)					
	Ca	P	K	Mg	SB	CTC
Inoculação	1,22 ns	0,10 ns	0,34 *	0,10 ns	0,80 ns	1,60 ns
Doses	101,53**	1428,47**	9,76**	2,31**	53,40 **	188,27**
Inocx doses	0,41 ns	0,85*	0,10 ns	0,03 ns	4,37 **	18,72**
Resíduo	1,25	13,88	0,05	0,28	0,77	2,46
CV%	9,61	12,44	7,95	26,61	7,06	6,52
Médias						
Com inoc	11,50 a	30,00 a	3,07 a	1,95 a	12,34 a	23,90 a
Sem inoc	11,85 a	29,30 a	2,89 b	2,05 a	12,62 a	24,30 a

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV = coeficiente de variação; * = diferença significativa ($P < 0,05$); ** = diferença significativa ($P < 0,01$); ns = não significativo ($P > 0,05$).

A aplicação de N promoveu diminuição, com ajuste linear, nos teores dos nutrientes no solo, independente da inoculação (Figuras 8A, 8B, 8C e 8D). Por consequência destas alterações, observou-se também diminuição nos valores de soma de bases (SB) (Figura 8E) e capacidade de troca catiônica (CTC) (Figura 8F), expressões estas que são dependentes das bases trocáveis para seus cálculos. Não houve aumento no pH, apresentando média de 6,3 e nem na saturação por bases, apresentando média de 53 %. A diminuição dos nutrientes no solo com aplicação de N, se deve ao maior crescimento da forrageira, que respondeu com aumento de produção de massa até a dose de 200 kg ha⁻¹ de N, o que proporcionou maior absorção de nutrientes e consequentemente diminuição dos teores desses nutrientes no solo. Como o cultivo da forrageira foi realizado em vasos e a própria características das raízes dessa planta ser fasciculada, facilitou a exploração do solo, contribuindo para melhor absorção de nutrientes e água do solo.

A adubação nitrogenada influenciou diretamente o teor de cada nutriente no solo, pois, houve maior necessidade dos mesmos para as funções vitais na planta, à medida que a planta foi se desenvolvendo. Os nutrientes analisados no solo tiveram seu teores decrescente, já que estavam prontamente disponível para a planta, pois, o solo estava

sempre na capacidade de campo, além do solo ser arenosos, com menor tamponamento, facilitando assim a absorção pelas raízes.

As maiores produções de massa seca mediante a aplicação de N, resultaram em maiores extrações de cátions trocáveis tais como cálcio, magnésio e potássio, com consequente redução na CTC (Figura 8E) e SB (Figura 8F).

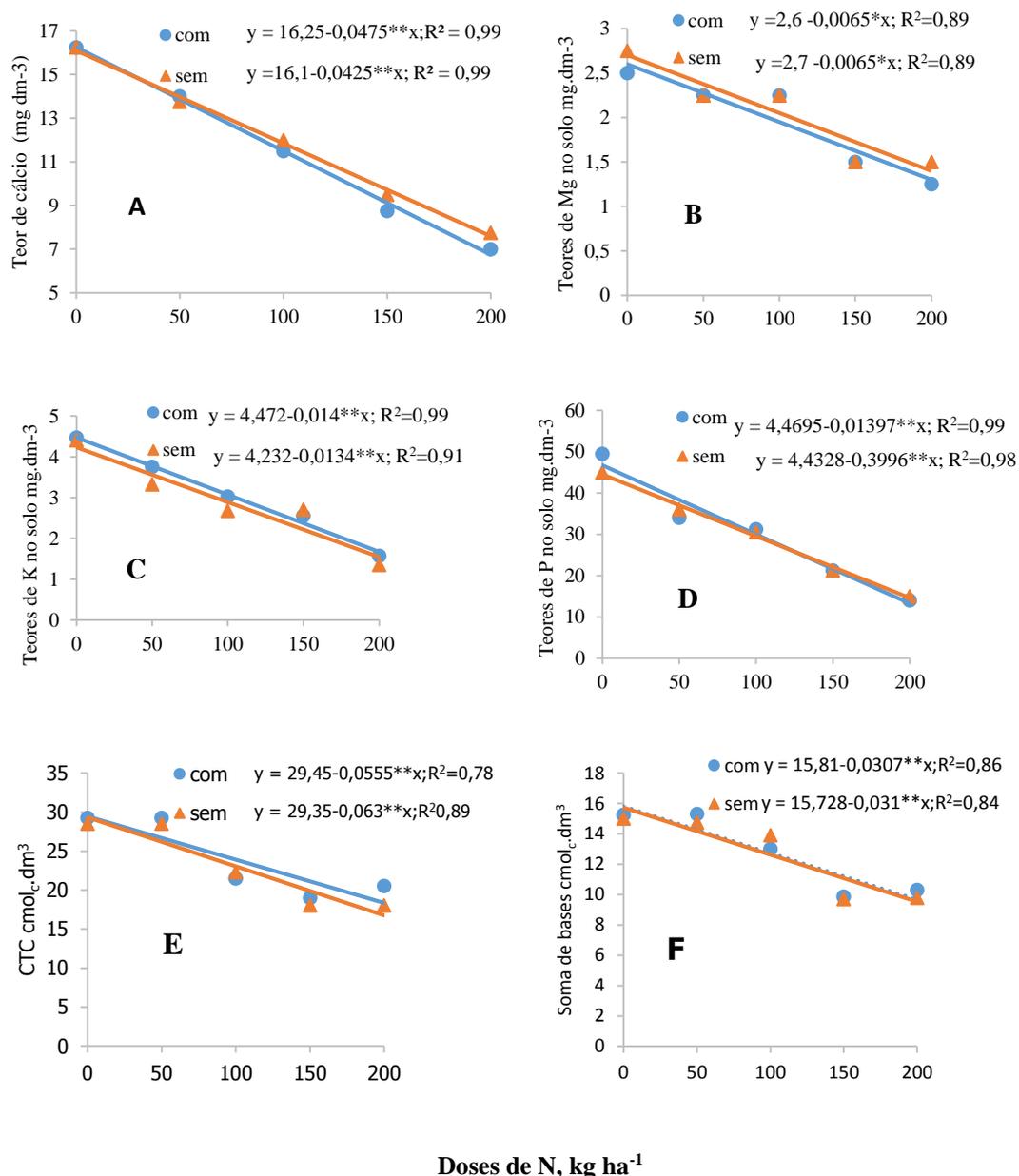


Figura 6. Teores de Cálcio (A), Magnésio (B), Potássio (C) Fósforo (D) e valores da CTC (E) e Soma de bases (F) no solo em função das doses de N e inoculação com *Azospirillum brasiliense*, Dourados-MS, 2015. ** - significativo a 1% de probabilidade.

5. CONCLUSÕES

A inoculação das sementes de *Brachiaria decumbens* com *Azospirillum brasilense* contribuiu de forma positiva no desenvolvimento e produção da forrageira, com aumento na altura de plantas, número de perfilhos, produção de matéria seca da parte aérea e matéria seca de raiz quando associado com nitrogênio até a dose de 100 kg ha⁻¹.

A inoculação com *Azospirillum brasiliense*, em geral, contribuem de forma positiva para a nutrição da *Brachiaria decumbens*.

A adição de N proporcionou incremento nos teores de N, P, K, Ca, Mg na parte aérea da *Brachiaria decumbens*, e redução dos teores de P, K, Ca, Mg, CTC e SB no solo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCANTARA, P.B. Origem das braquiárias e suas características morfológicas de interesse forrageiro. In: ENCONTRO SOBRE CAPINS DO GÊNERO BRACHIARIA, 1986, Nova Odessa, SP. **Anais**. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 1987. p.1-18.
- ALEXANDRINO, E.; NASCIMENTO JUNIOR, D. do; REGAZZI, A. J.; MOSQUIM, P. R.; ROCHA, F. C.; SOUZA, D. de P. Características morfogênicas e estruturais da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu submetida a diferentes doses de nitrogênio e frequências de cortes. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 7-14, jan./mar. 2005.
- ALEXANDRINO, E.; VAZ, R. G. M. V.; SANTOS, A. C. Características da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu durante o seu estabelecimento submetida a diferentes doses de nitrogênio. **Bioscience Journal**, Uberlândia v. 26, n. 6, p. 886-893, 2010.
- ALVIM, M. J.; XAVIER, D. F.; VERNEQUE, R. da S.; BOTREL, M. de A. Resposta do Tifton 68 a doses de nitrogênio e a intervalos de cortes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 9, p.1875-1882, 2000.
- BALDANI, J.L.; AZEVEDO, M.S.; REIS, V.M. et al. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S. et al. (Eds.) **Inter-relações fertilidade, biologia e nutrição de plantas**. Viçosa, MG: SBCS/UFLA/DCS, p.621-666, 1999.
- BASI, S.; LOPES, E.C.P.; KAMINSKI, T.H.; PIVATTO, R.A.D.; CHENG, N.C.; SANDINI, I.E. *Azospirillum brasilense* nas sementes e no sulco de semeadura da cultura do milho. In.: Semana de Integração, Ensino, Pesquisa e Extensão, 2. **Resumos...** Guarapuava: Anais da II SIEPE, 4p. ISSN-2236-7098, 2011.
- BASHAN, Y.; BUSTILLOS, J.J.; LEYVA, L.A. et al. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. **Biology and Fertility of Soils**, v.42, p.279-285, 2006.
- BASHAN, Y., LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**. V. 36: 591-608, 1990.

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

BATISTA, K. **Resposta do capim-marandu a combinações de doses de nitrogênio e enxofre**. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2002.

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

BELING, R.R. (Ed.) **Anuário brasileiro da pecuária. Santa Cruz do Sul**: Editora Gazeta Santa Cruz, 2013. 128p.

BENETT, C.G.S.; BUZETTI, S.; SILVA, K.S Produtividade e composição bromatológica do capim-marandu a fontes e doses de nitrogênio. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v.32, n.5, p.1629-1636, 2008.

BODDEY, R.M., JANTALIA, C.P., MACEDO, M.O., OLIVEIRA, O.C., RESENDE, A. S., ALVES, B.J.R. and Urquiaga, S. Potential of carbono Atlantic forest region Brazil. In: Lal, R.; Cerri, C.C.; Bernoux, M.; Etchevers, J.; Cerri, E. (Eds.). Carbon seques-tration in soil of Latin American. **The Haworth press Bubghamton**. New York. pp. 305- 347, 2006.

BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.108, n. 1, p.53-65, 1988.

CABRAL, W. B.; SOUZA, A. L. S.; ALEXANDRINO, E.; TORAL, F. L. B.; SANTOS, J. N.; CARVALHO, M. V. P. Características estruturais e agronômicas da Brachiaria brizantha cv. Xaraés submetida a doses de nitrogênio. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 41, n. 4, p. 846-855, 2013.

CAMARGO, A.C.; NOVO, A.L.M. **Manejo intensivo de pastagens**. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2009. 85p. (Apostila).

CAMPOS, B.C.; THEISEN, S.; GNATTA, V. **Avaliação do inoculante Graminante na cultura de milho**. Ciência Rural, Santa Maria, v. 30, n. 4, p. 713-715, 2004.

CAVALLET, L.E. et al. **Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* sp.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.4, n.1, p.129-132, 2000.

CORSI, M.; BALSALOBRE, M. A.; SANTOS, P. M. Bases para o estabelecimento do manejo de pastagens de braquiária. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 11. Piracicaba, 1994. **Anais...** Piracicaba: FEALQ. p. 249-266, 1994.

COSTA, K. A. P. et al. **Doses e fontes de nitrogênio na recuperação de pastagens do capim-Marandu**. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.62, n.1, p.192-199, 2010.

COSTA, K.A.; OLIVEIRA, I.P.; FAQUIN, V.; FIGUEIREDO, F.C.; RODRIGUES, C.R. & NASCIMENTO, P.P. **Adubação nitrogenada e potássica na concentração de nutrientes do capim-xaraés**. Ci. An. Bras., 9:86-92, 2008.

COSTA, N.L. Curva de crescimento e composição química de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em Rondonia. In: REUNIAO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 32., Brasília, 1995. **Anais**. Brasília: SBZ, p.38-40, 2001.

CASTAGNARA, D. D.; **Produção de forragem, características estruturais e eficiência de utilização do nitrogênio em forrageiras tropicais sob adubação nitrogenada**. Seminário: Ciências Agrárias, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1637-1648, out./dez. 2011.

DIAS, F. M. B. **Degradação de pastagens: processos, causas e estratégias de recuperação**. 4. ed. revisão atual e ampliada. Belém: Ed. do Autor, p 216, 2011.

DIDONET, A.D. et al. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos em trigo submetidos à inoculação de *Azospirillum*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.35, n.2, p.401-411, 2000.

DIDONET, A.D. Aspectos do mecanismo de ação fisiológica associada à promoção do crescimento radicular de trigo (*Triticum aestivum* L.) por bactérias do gênero *Azospirillum*. 1993. Tese (Doutorado Pós-Graduação Instituto de Biologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 80p, 1993.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; BROEK, A.V.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasiliense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant Soil**, v. 212, n. 1, pp. 155-164, 1999.

DOBBELAERE, S.; OKON, Y. **The plant growth-promoting effect and plant responses**. In: ELMERICH, C.; NEWTON, W.E. (Eds.) Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations. Dordrecht, Netherlands: Springer, p.145-170, 2007.

DOBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação de nitrogênio no Brasil. In: CONFERÊNCIA, Universidade Rural do Rio de Janeiro, Artigos Assinados Estudos Avançados, v. 4, n.8, São Paulo, Jan-Abr, p. 144-152, 1990.

FAGUNDES, J. L.; FONSECA, D. M.; MORAIS, R. V.; MISTURA, C.; VITOR, C. M. T.; GOMIDE, J. A.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; SANTOS, M. R. E.; LAMBERTUCCI, D.M. **Avaliação das características estruturais do capim-braquiária em pastagens adubadas com nitrogênio nas quatro estações do ano**. Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v. 35, n. 1, p. 30-37, 2006a.

FAGUNDES, J.L.; FONSECA, D.M.; GOMIDE, J.A. Acúmulo de forragem em pastos de *Brachiaria decumbens* adubados com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.4, p.397-403, 2005.

FERREIRA, A. C. B. **Efeitos da adubação com N, Mo, Zn sobre a Produção, qualidade dos grãos e concentração de nutrientes no milho**. 1997. Tese (Mestrado) Universidade Federal de Vicosa, Vicosa, 1997.

FRANCHE, C.; LINDSTROM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and soil**, v. 321, n. 1-2, p. 35-59, 2009.

GHISI, O.M.A.A. *Brachiaria* na pecuária brasileira: importância e perspectivas. In: ENCONTRO PARA DISCUSSÃO SOBRE CAPINS DO GÊNERO BRACHIARIA, 2, 1991, Nova Odessa. **Anais...** Nova Odessa: Instituto de Zootecnia. 356p, 1991.

GUIMARAES, S.L.; BONFIM-SILVA, E.M.;KROTH, B. E.; MOREIRA, J. C. F.; REZENDE, D. Crescimento e desenvolvimento inicial de *brachiaria decumbens*

inoculada com *azospirillum* spp. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiania, vol.7, N.13, 2011.

HARTMANN, A; BALDAM, J.I. **The genus *Azospirillum***. In: DWORKIN, M. (eds.) *The Prokaryotes*. New York: Springer, 2006. p.115-140.

HAVLIN, J.L.; BEATON, J.D.; TISDALE, S.L.; NELSON, W.L. **Soil fertility and fertilizers: an introduction to nutrient management**. 7.ed. New Jersey: Pearson, 515p, 2005.

HUERGO, L.F. **Regulação do metabolismo do nitrogênio em *Azospirillum brasilense***. 170f. (Tese - Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

HUNGRIA. M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**. v.331, n.1, pp.413-425, 2010.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense***: inovação em rendimento a baixo custo. Embrapa Soja – Documentos 325, 2011.

JORDÃO, L. T.; LIMA, F. F.; LIMA, R. S.; MORETTI, P. A. E. M.; PEREIRA, H. V.; MUNIZ, A. S.; OLIVEIRA, M. C. N.. Teor relativo de clorofila em folhas de milho inoculado com *Azospirillum braziliense* sob diferentes doses de nitrogênio e manejo com braquiária. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 29.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 13.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 11.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 8., , Guarapari. Fontes de nutrientes e produção agrícola: modelando o futuro: anais. Viçosa: SBCS, 2010. 4 p, 2010.

KAVADIA, A. et al. **Dynamics of free-living nitrogen-fixing bacterial populations and nitrogen fixation in a two-prey–one-predator system**. *Ecological Modelling*, v.218, p.323-338, 2008.

KLUTHCOUSKI, J.; AIDAR, H. **Uso da integração lavoura-pecuária na recuperação de pastagens**. In: KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F.; AIDAR, H. (Ed.). *Integração lavoura-pecuária*. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2003. p. 185-223.

KUSS, A. V. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado**. 2006. 109f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2006.

LABANDERA, G. Y.; C.A. Agronomic applications of Azospirillum: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.1591-1601, 1994.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638p .

MARTHA, J. G.B.; VILELA, L. **Pastagens no cerrado: baixa produtividade pelo uso limitado de fertilizantes em pastagens**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 32p. Embrapa Cerrados. Documentos, 50, 2002.

MARTHA, J. G. B.; VILELA, L.; BARIONI, L. G.; SOUSA, D. M. G.; BARCELLOS, A. O. Manejo da adubação nitrogenada em pastagem. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 21, , Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2004. p. 155-215, 2004.

MARTUSCELLO, J. A.; FONSECA, D. M.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; SANTOS, P. M.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I. Características morfogênicas e estruturais do capim-xaraés submetido à adubação nitrogenada e desfolhação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 34, n. 5, p. 1475-1482, 2009.

MELLO, S.Q.S.; FRANÇA, A.F. de S. et al. Adubação nitrogenada em capim mombaça: produção, eficiência de conversão e recuperação aparente do nitrogênio. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.4, p.935-947, Out./Dez., 2008.

MOREIRA, F. M. S; SILVA, K.; NOBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae** 1(2): p 74-99, 2010.

MOREIRA, L.M.; MARTUSCELLO, J.A.; FONSECA, D.M. Perfilhamento, acúmulo de forragem e composição bromatológica do capim-braquiária adubado com nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.9, p.1675-1684, 2009.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G. & LAKSHMINARASIMAHAN, C. **Influence of N fertilization on the isolation of Acetobacter diazotrophicus and**

PRIMAVESI, A.C.; PRIMAVESI, O.; CORRÊA, L.A.; SILVA, A.G. & CANTARELLA, H. Nutrientes na fitomassa de capim-marandu em função de fontes e doses de nitrogênio. *R. Ci.Agrotec.*, 30:562-568, 2006.

PRIMAVESI, A.C.; PRIMAVESI, O.; CORRÊA, L.A.; CANTARELLA, H. & SILVA, A.G. Absorção de cátions e ânions pelo capim-coastcross adubado com ureia e nitrato de amônio. *Pesq. Agropec. Bras.*, 40:247-253, 2005.

PRIMAVESI, A.C. et al. Absorção de cátions e ânions pelo capim-coastcross adubado com uréia e nitrato de amônio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.3, p.247-253, 2005.

REIS, V. M. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas**. Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia. 22p. (Documentos, 232), 2007.

QUADROS, P.D. **Inoculação de Azospirillum spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul**. 2009. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2009

REIS, V. M.; PEDRAZA, R. O. ; TEIXEIRA, K. R. S. Diversidade e relação filogenética de espécies do genero *Azospirillum*. **Embrapa Agrobiologia**, Documentos 273, p. 14. Seropédica, RJ, 2011.

REIS JÚNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 32, n. 3, p. 1139-1146, 2008.

REIS, V. F. B. ; TEIXEIRA, K. R. dos S.; REIS, V. M. **Fixação Biológica de nitrogênio associada a pastagens de braquiária e outras gramíneas forrageiras**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 27 p. (Documentos, 52), 2005.

REIS, V.M; BALDINI, J.I; BALDINI, V.L.D; DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm Trees. **CRC Criticai Review in Plant Science**, v.19, p.227-247, 2000.

SALA, V.M.R.; CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, J.G.; SILVEIRA, A.P.D. da. Novas bactérias diazotróficas endofíticas na cultura do trigo em interação com a adubação nitrogenada, no campo. *Biologia do Solo*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa. v.32, n.3, mai./jun. 2008.

SANTOS, J.D.G.; MONTEIRO, F.A. Nutrição em nitrogênio do capim-marandu submetido a doses de nitrogênio e idades de crescimento. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v.60, n.1, p.139-146, 1999.

SANTOS, J.H.S. **Proporções de nitrato de amônio na nutrição e produção dos capins Aruana e Marandu**. 92f. (Dissertação - Mestrado em Agronomia/Solos e Nutrição de Plantas). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

SANTOS, P.M.; PRIMAVERSI, O.M.; BERNARDI, A.C.C. **Adubação de pastagens**. In: BOVINOCULTURA DE CORTE, v.1, Piracicaba: FEALQ, 2004. p. 459-472, 2010

SILVA, B. E.M.; SILVA, T.J.A.; LUZ, V.S. et al. Capim-Marandu no primeiro ano de recuperação em sistemas de manejo no Cerrado. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.7, n.12, p.1-9, 2011.

SILVA, C. C. F.; BONOMO, P.; PIRES, A.J.V. et al. Morfogênese e produção de braquiárias submetidas a diferentes doses de nitrogênio, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.4, p.657-661, 2009.

SILVA, J. S. O.; HARIDASAN, M. **Acúmulo de biomassa aérea e concentração de nutrientes em *Melinis minutiflora* P.Beauv.** e gramíneas nativas do cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*, Brasília, v. 30, n. 2, p. 337-344, 2007.

SILVA, T. O. et al. Produção do capim Marandu submetido a doses de nitrogênio em um latossolo amarelo. *Agropecuária Técnica*, v.26, n.1, p.29–35, 2005.

SILVA, S. C. Fundamentos para o manejo do pastejo de plantas forrageiras dos gêneros *Brachiaria* e *Panicum*. In: **SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM**, 2, 2004, Viçosa. Anais...Viçosa: UFV; DZO, p. 347-383, 2004.

SOARES, F. C.V. Recomendacoes de especies e variedades de *Brachiaria* para diferentes condicoes. In: **Simpósio sobre manejo da pastagem**, 11, Piracicaba. **Anais**. Piracicaba: FEALQ,. p.25-48, 1994.

SOBRINHO, F.S, CARNEIRO, H., MAGALHÃES, J.R., MIRANDA, J.E.C., PEREIRA, A.V., LÉDO, F.J.S., REIS, M.C., BRUM, S.S., OLIVEIRA, J.S. e BOTREL, M.A. Produtividade e qualidade da forragem de *Brachiaria* na região norte fluminense. Em: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 42, Goiânia. **Anais...** SBZ. Goiânia, 2005.

SOUZA, N. J. M.; PEDREIRA, C. G. S. Caracterização do grau de degradação de pastagem. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 21. Piracicaba, 2004. **Anais...** Piracicaba: FEALQ., p.7-29, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Tradução de E.R. Santarém et al. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

THÉLIER, L.; FARRUGGIA, A.; CASTILLON, P. L'analyse d'herbe: un outil pour phosphate et potassique des prairies naturelles et temporaires. Institut de L'Éevage, Juin, 1999.

TRENTINI, D.B. **Identificação dos alvos celulares das proteínas de transdução de sinal PII do diazotrófico de vida livre *Azospirillum amazonense***. 2010. 122p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

VASCONCELOS, C. N. **Pastagens: implantação e Manejo**. Salvador: EDBA, p 177, 2006.

VILELA, H.; série gramínea tropical - gênero brachiaria (*Brachiaria decumbens* - Capim); Disponível em: www.agronomia.com.br, acessado em 25/04/2016.

VILELA, M. F.; ADUAN, R.E.; REIS JR., F.B.; **Os grandes ciclos biogeoquímicos do planeta**. Planaltina – DF: Embrapa Cerrados, 2004. 16p. (Embrapa Cerrados. Documentos, n. 119), 2008.

VITTI, G. C.; LIMA, E.; CICARONE, F. Cálcio, magnésio e enxofre. In: MANLIO, S. F. (Ed.). Nutrição mineral de plantas. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 299-325, 2006.

VOGEL; G. F.; MARTINKOSKI, L.; MARTINS, P. J.; BICHEL, A. Desempenho agrônômico de azospirillum brasilense na cultura do arroz: uma revisão. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.6, n.3, p. 567-578, 2013.

WERNER, J. C.; COLOZZA, M. T.; MONTEIRO, F. A. Adubação de pastagens. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGENS, 18. 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, p. 129-156, 2001.