

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA**

LUIZ OCTAVIO SILVA MUNDIM

**INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* EM DIFERENTES DOSES DE
NITROGÊNIO NO CULTIVO DA *Brachiaria brizantha* cv. Marandu**

**UBERLÂNDIA, MG
SETEMBRO 2016**

LUIZ OCTAVIO SILVA MUNDIM

**INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* EM DIFERENTES DOSES DE
NITROGÊNIO NO CULTIVO DA *Brachiaria brizantha* cv. Marandu**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Profa. Dra. Regina Maria Quintão Lana

**UBERLÂNDIA, MG
SETEMBRO 2016**

LUIZ OCTAVIO SILVA MUNDIM

**INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* EM DIFERENTES DOSES DE
NITROGÊNIO NO CULTIVO DA *Brachiaria brizantha* cv. Marandu**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Aprovado pela Banca Examinadora em

Membro da Banca

Membro da Banca

Profa. Dra. Regina Maria Quintão Lana
Orientadora

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a produtividade de massa seca, massa verde e os teores de nutrientes foliar da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, submetida a diferentes doses de adubo nitrogenado utilizando Nitrato de Amônio e inoculante (*Azospirillum brasilense*). O experimento foi conduzido na fazenda Bonsucesso, Uberlândia – MG. O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados com os tratamentos distribuídos em esquema fatorial 3 x 2, com 4 repetições. As parcelas constituíam 25 m² cada. O primeiro fator correspondeu a doses de nitrogênio (0, 100 e 200 kg ha⁻¹), e o segundo, à concentração do inoculante líquido à base de *Azospirillum* (0 e 300 mL ha⁻¹) e a aplicação foi realizada em pastagem estabelecida a mais de três anos com a forrageira *B. brizantha*. O experimento foi realizado em pastagem e manteve-se uma altura média de 20 cm. Foram avaliadas a massa verde e a massa seca da braquiária. O uso de *Azospirillum* promove incremento de produção de massa seca e massa verde quando utilizado em conjunto com o nitrogênio. As melhores respostas foram obtidas quando a aplicação de *Azospirillum* ocorreu em conjunto com a dose de nitrogênio suplementar, com ganhos significativos quando comparado ao tratamento com a adubação nitrogenada somente. O uso de *Azospirillum* associados à dose intermediária de nitrogênio (100 kg/ha) trouxe respostas significativamente iguais a maior dose nitrogênio aplicada isoladamente. A forma de aplicação de *Azospirillum* em superfície em pastagens estabelecidas propiciou o aumento de massa seca e massa verde quando em consórcio com doses de nitrogênio suplementar.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio, bactéria diazotrófica, *Urochloa*.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the dry matter yield, green mass and leaf nutrient content of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, under different doses of nitrogen fertilizer using Nitrate and Ammonium inoculant (*Azospirillum brasilense*). The experiment was conducted at the Bonsucesso farm, Uberlândia - MG. The experimental design was a randomized block with treatments distributed in a factorial 3 x 2, with four repetitions. The plots constituted 25 m² each. The first factor corresponded to nitrogen rates (0, 100 and 200 kg ha⁻¹), and second, the concentration of inoculant based on *Azospirillum* (0 and 300 mL ha⁻¹) and the application was performed on established pasture more than three years with *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. The experiment was carried out on pasture and remained an average height of 20 cm. Green mass and dry matter of *Brachiaria* were evaluated. The use of *Azospirillum* promotes dry matter production and increased green mass when used in conjunction with nitrogen. The best responses were obtained when the application of *Azospirillum* occurred together with the additional nitrogen dose, significant gains when compared to treatment with nitrogenous fertilizer only. The use of *Azospirillum* associated with the intermediate dose of nitrogen (100 kg/ha) brought significantly greater responses to the same nitrogen dose applied alone. The form of application of *Azospirillum* surface in established pastures provided the dry mass and increase green mass in consortium with additional nitrogen doses.

Key-words: Biological nitrogen fixation, diazotrophic bacteria, *Urochloa*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Doses de nitrato de amônio utilizadas. Uberlândia – MG, 2016.....	14
Tabela 2 - Produtividade de massa verde – MV ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) nos três cortes realizados, na Fazenda Bonsucesso, Uberlândia, MG.....	17
Tabela 3 – Produtividade de massa seca MS ($\text{kg}\ \text{ha}^{-1}$) nos três cortes realizados, na Fazenda Bonsucesso - Uberlândia, MG... ..	19
Tabela 4 – Contrastes ortogonais significativos a 5% de probabilidade - Uberlândia – MG, 2016.....	22
Tabela 5 – Produtividade total (somatório dos três cortes) da massa seca de <i>B. brizantha</i> com e sem aplicação de inoculante e nitrogênio. Uberlândia – MG, 2016.....	22

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2.1	Adubação nitrogenada e sua importância	9
2.2	<i>O gênero Azospirillum e a fixação biológica de nitrogênio</i>	9
2.3	Sobrevivência e efeito residual do <i>Azospirillum</i>	10
2.4	<i>Azospirillum</i> em associação com <i>Brachiaria</i> e outras gramíneas.....	11
3	MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1	Delineamento experimental	13
3.2	Implantação do experimento.....	13
3.3	Variáveis analisadas	14
3.4	Análise estatística	14
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
5	CONCLUSÕES	15
6	REFERÊNCIAS.....	21

1 INTRODUÇÃO

A degradação das pastagens tem afetado diretamente a sustentabilidade da pecuária brasileira, além de diminuir o valor das terras e atrasar a idade de abate dos animais. Essa degradação é consequência de diversos fatores que atuam isoladamente ou em conjunto, como preparo incorreto do solo, escolha errada da espécie forrageira, uso de sementes de baixa qualidade, má formação inicial, manejo inadequado e, principalmente, em razão da não-reposição dos nutrientes retirados no processo produtivo, por exportação pelos animais, erosão, lixiviação e volatilização ao longo dos anos. A persistência desse processo termina com a degradação do solo e dos recursos naturais, com prejuízos irrecuperáveis para toda a sociedade (PERON e EVANGELISTA, 2004). É notório, nos dias atuais, a necessidade de se desenvolver estratégias para garantir a nutrição adequada à planta forrageira e ao animal em pastejo ao mesmo tempo em que se confere proteção aos recursos/qualidade do solo, água e atmosfera (JARVIS, 1998).

A genética das forragens determina o potencial relativo ao que podem produzir, entretanto, para chegar ao potencial, existem condições ideais como temperatura, quantidade de água, luz e nutrientes, além de um manejo correto. Observado essas condições, em regiões tropicais, a pequena quantidade de nutrientes disponíveis é o principal responsável pela interferência na produtividade e qualidade das forrageiras. Dessa forma, a adubação com nutrientes em quantidade adequada, principalmente o N, é muito importante para elevar a quantidade de forragem produzida. A quantidade encontrada no solo de N, que é resultado da mineralização da matéria orgânica, não consegue atender a nutrição das forragens que possuem elevado potencial para produzir (GUILHERME *et al.*, 1995). A perda de N no sistema solo-planta ocorre principalmente pela exportação que vai para a carne, lixiviação, desnitrificação e na excreção dos bovinos onde ocorre a volatilização (FERREIRA *et al.*, 2000).

Um grande número de plantas cultivadas mantém em suas raízes uma população ativa de microrganismos diazotróficos (fixadores de N atmosférico), sendo que, ao longo do processo evolutivo, muitas dessas associações sofreram especializações, resultando em relações muito estreitas entre plantas e bactérias (MARCHIORO, 2005)

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a produtividade de massa seca, massa verde e os teores de nutrientes foliar da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, submetida a diferentes doses de adubo nitrogenado utilizando nitrato de amônio e inoculante (*Azospirillum brasilense*).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Adubação nitrogenada e sua importância

O nitrogênio é um nutriente muito importante no metabolismo das plantas, sendo constituinte da clorofila, citocromos, ácidos nucleicos e proteínas (HARPER, 1994), seu balanço tem influência direta na fotossíntese, formação de raízes, taxa de crescimento entre folhas e raízes e a produção e transporte de fotoassimilados, sendo o crescimento foliar substancialmente afetado (RYLE *et al.*, 1979; TAIZ e ZEIGER, 2004). A fertilização elevando a quantidade de nitrogênio no solo é umas das formas de aumentar a produtividade em pastagens, principalmente quando a forragem responde a utilização de adubação nitrogenada (PEARSE e WILMAN, 1984).

Cerca de 50% dos fertilizantes nitrogenados são perdidos no sistema solo-planta. Ocorrem perdas por volatilização de amônia, desnitrificação, escoamento superficial, lixiviação e imobilização microbiana (SAIKA e JAIN, 2007). O melhor uso do adubo nitrogenado pode ser feito através de algumas práticas de manejo, como localização do fertilizante nas áreas mais ativas do sistema radicular e sua aplicação no estágio fenológico da cultura de maior demanda pelo nutriente, junto a um teor de umidade adequado (OLSON e KURTZ, 1982).

Com uso da calagem, a nitrificação e a mineralização aumentam, disponibilizado maior quantidade de nitrogênio às plantas e ocasiona maior lixiviação de nitrato no perfil do solo. A nitrificação se limita em camadas do solo com pH em torno de 4,0. Mesmo a incorporação de calcário aumentando a distribuição do nitrato no perfil, em níveis mais profundos, 40-60 cm, não existe diferença se o calcário for aplicado na superfície ou incorporado. Grande parte do nitrogênio aplicado é imobilizada, não importando a forma de aplicação do corretivo. A absorção do nitrogênio por plantas, mais a junção a massa de microrganismos no solo, neutraliza os efeitos do adubo nitrogenado amoniacal sobre o pH do solo.

2.2 O gênero *Azospirillum* e a fixação biológica de nitrogênio

Azospirillum brasilense representa uma das possibilidades para viabilizar uma produção com menores custos, sem prejudicar o ambiente, uma vez que se trata de um recurso biológico do solo que deve ser considerado. Pode promover associações vantajosas entre raízes de gramíneas e bactérias presentes no solo pertencentes à grupos fixadores de nitrogênio e/ou promotores de crescimento.

Entre as possibilidades da inoculação de pastagens com o uso dessa bactéria é o fato das bactérias promotoras do crescimento vegetal, que fixam nitrogênio (N₂) para a planta e produzem hormônios de crescimento, como auxinas e giberelinas, estimulam o desenvolvimento do vegetal (DOBBELAERE e CROONENBORGHES, 2002). Os efeitos da inoculação dependem de uma série de fatores pois, de acordo com Cantarella (2007) existe uma relação bastante específica entre a estirpe da bactéria utilizada com a cultivar do vegetal que se deseja produzir; a este evento se denomina especificidade planta-bactéria e, é uma das principais causas de inconsistência de ganhos produtivos com a utilização de bactérias promotoras do crescimento vegetal.

Demonstrando a eficiência de bactérias diazotróficas em associação com gramíneas, Cavallet *et al.* (2000) propõem o uso de um produto comercial à base de *Azospirillum spp.* para aumentar a produtividade de grãos de milho. De acordo com Hungria (2009), o uso de *A. brasiliense* e mostraram incremento médio de 25% a 30% no rendimento do milho. Oliveira *et al.* (2002) verificaram que a inoculação de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar com uma mistura de cinco estirpes de diferentes espécies de bactérias diazotróficas resultou em contribuições ao redor de 30% do N total absorvido.

As bactérias diazotróficas associam-se às plantas podendo promover aumento na produtividade ou até mesmo no vigor e na resistência aos estresses bióticos e abióticos. Estas bactérias podem colonizar partes internas dos tecidos vegetais, sendo consideradas endofíticas ou estarem apenas no ambiente externo das raízes (rizosfera), denominadas então epifíticas (BALDANI *et al.*, 1997; REINHOLD-HUREK e HUREK, 1998).

Os microrganismos endofíticos podem ser simbióticos ou associativos, sendo as bactérias do gênero *Azospirillum*, consideradas associativas, que em geral não provocam alterações visíveis (DIDONET, 2007). Segundo Okon e Labandera-Gonzalez (1994) o efeito de promoção do crescimento é notável visto que esses micro-organismos estimulam a densidade e o comprimento de pelos radiculares assim como a taxa de aparecimento de raízes laterais resultando em aumento na superfície de contato radicular (RADWAN *et al.*, 2004) o que potencializa o aproveitamento de água e nutrientes disponíveis no solo (BALDANI *et al.*, 1997).

2.3 Sobrevivência e efeito residual de *Azospirillum*

As bactérias do gênero *Azospirillum* podem sobreviver por longos períodos de tempo na rizosfera de inúmeras espécies de plantas (BASHAN e LEVANONY, 1990), pois a colonização das raízes é inespecífica e as bactérias migram entre diferentes espécies vegetais (BASHAN e HOLGUIN, 1997). Porém, existem várias dúvidas sobre a sobrevivência desta bactéria no solo próximo a rizosfera. Alguns estudos demonstram a ocorrência de *Azospirillum spp.* na maioria dos solos tropicais (DOBEREINER *et al.*, 1976). Por outro lado, estudos realizados principalmente em zonas temperadas e semi-áridas e nas regiões tropicais (NAYAK *et al.*, 1986), demonstraram que *Azospirillum spp.* apresenta altas taxas de mortalidade nesses solos e dificilmente sobrevive por um período longo de tempo (HARRIS *et al.*, 1994).

Por meio de estudos sobre os fatores que influenciam a sobrevivência de cinco espécies de bactérias promotoras do crescimento, incluindo *Azospirillum*, demonstraram que alguns componentes variáveis de solo influenciam diretamente sua sobrevivência, tais como a textura e os níveis de carbonato. Altas porcentagens de areia e carbonato tinham impacto altamente negativo sobre a sobrevivência destas bactérias no solo (BASHAN e VÁZQUEZ 2000).

OLIVEIRA *et al.*, (2005), em ensaio avaliando a sobrevivência de bactérias diazotróficas endofíticas no solo sob diferentes teores de umidade relataram pouca influência deste fator sobre a sobrevivência de *Azospirillum brasilense*, no entanto, a umidade influencia diretamente a culturabilidade das espécies endofíticas *Azospirillum amazonense* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

2.4 *Azospirillum* em associação com *Brachiaria* e outras gramíneas

Embora os melhores resultados da fixação biológica de nitrogênio (FBN) tenha sido demonstrada na interação entre rizóbios e leguminosas, existe relatos de incrementos expressivos na disponibilidade de nitrogênio por meio da FBN em gramíneas a exemplo do arroz (BODDEY *et al.*, 1995), cana-de-açúcar, milho, sorgo e trigo (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003). Dentre os micro-organismos diazotróficos que apresentam associação com gramíneas, um dos gêneros mais estudados atualmente é o *Azospirillum*, sendo grande o número de trabalhos acerca de sua fisiologia, bioquímica e genética (BALDANI *et al.*, 1997; BASHAN e HOLGUIN, 1997).

Apesar de nas últimas décadas os estudos se voltaram para o uso destes tipos de micro-organismos, os trabalhos são realizados principalmente sobre plantas de interesse agrícola, como o milho, e as poáceas forrageiras ainda são pouco exploradas (FRANCHE *et al.*, 2009).

No Brasil, foram feitos vários trabalhos a fim de comprovar a eficiência da inoculação com *Azospirillum* para a cultura do milho, Hungria *et al.*, (2010) observaram que o rendimento dos tratamentos inoculados com *Azospirillum brasilense* foi, em média, 24% superior ao tratamento controle. Este trabalho, juntamente com outros na mesma linha de pesquisa, possibilitou a autorização pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento da produção de inoculantes comerciais de algumas estirpes de *A. brasilense* destinados à cultura do milho, uma vez que resultaram em incrementos na produção de grãos de 662 a 823 kg ha⁻¹.

Sumner (1990), através de um levantamento de dados sobre a aplicação de estirpes de *Azospirillum* em cereais, documentou que 32 ensaios apresentavam resposta positiva à inoculação sobre o rendimento de grãos (dados entre os anos de 1983 a 1985).

Ainda, segundo Dobbela *et al.* (2001), através de um sumário de experimentos envolvendo a inoculação com *Azospirillum* em gramíneas, conduzidos na década de 1990, mostraram resultados satisfatórios em diversos países como Israel, França, Argentina, México e África do Sul.

Em trabalho feito com *B.brizantha* analisando doses de nitrogênio e inoculação com *A. brasiliense*, Oliveira *et al.*, (2007) foi observado um melhor desempenho do tratamento com inoculante sem nitrogênio em relação ao tratamento sem *Azospirillum* e sem o nutriente. De modo que foi observado aumento prolongado no pastoreio e elevado perfilhamento no início do desenvolvimento da forrageira, sem a utilidade de recorrer a altas doses de fertilizantes nitrogenados. Segundo, Steenhoudt *et al.*, (2000) plantas de capim braquiária quando inoculadas com esta bactéria, apresentaram produção de massa seca, principalmente do sistema radicular, superior aos tratamentos sem inoculação durante as coletas de 60 e 90 dias.

Embora exista no mercado, inclusive no Brasil, inoculantes à base de *Azospirillum*, a sua utilização ainda é restrita devido a uma série de fatores, entre eles: limitações e inconsistências no desempenho do processo de colonização da planta hospedeira pela bactéria e valor do produto (MORRISSEY *et al.*, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Fazenda Bonsucesso, localizada no município de Uberlândia, na rodovia Campo Florido Km 20, no Estado de Minas Gerais a 19°05'17" de latitude sul e 48°22'00" de longitude oeste a uma altitude de 820 metros. O solo da área experimental é classificado como Latossolo Vermelho Amarelo (EMBRAPA, 2006). De acordo com o sistema de classificação de Köppen, o clima da região é caracterizado como tropical típico, com média de precipitação em torno de 1600 mm por ano, apresentando moderado déficit hídrico no inverno e excesso de chuvas no verão.

A aplicação foi realizada em pastagem estabelecida a mais de três anos com a forrageira *B. brizantha*. Após o rebaixamento da pastagem, manteve-se um resíduo médio de 20 cm, visando à manutenção de uma altura de corte uniforme.

Os dados da análise de solo, realizada anteriormente a implantação do ensaio, apresentavam os seguintes valores de macronutrientes e de micronutrientes: pH (H₂O) 5,9; Fósforo (P) 9,2 mg dm⁻³; Magnésio (Mg) 0,2 cmol_c dm⁻³; Cálcio (Ca) 0,6 cmol_c dm⁻³; Potássio (K) 0,06 cmol_c dm⁻³; Alumínio (Al) 0 cmol_c dm⁻³; H+AL 1,4 cmol_c dm⁻³; Matéria Orgânica (M.O.) 1,3 dag Kg⁻¹; Soma de Bases (SB) 0,86; CTC efetiva (t) 2,42; CTC Total (T) 2,26 ; Saturação de Base (V%) 38 e Saturação por Alumínio (m) 0, Boro 0,05 mg dm⁻³ ; Cu 0,6 mg dm⁻³ ; Fe 24 mg dm⁻³; Mn 1,5 mg dm⁻³; Zn 1,0 mg dm⁻³ e S-SO⁴ 2 mg dm⁻³.

3.1 Delineamento experimental

O delineamento estatístico adotado foi o de blocos casualizados (DBC) com os tratamentos distribuídos em esquema fatorial 3 x 2, com 4 repetições. As parcelas foram de 5 m de comprimento e 5 metros de largura, totalizando 25 m² cada e a área total do ensaio com 600 m².

3.2 Condução do ensaio

O experimento foi realizado em pastagem estabelecida a mais de três anos. A adubação mineral foi (0, 100 e 200 kg ha⁻¹ de N) feita de acordo com cada tratamento. O adubo nitrogenado utilizado foi o nitrato de amônio (33% de N). As doses de nitrogênio foram distribuídas a lanço em cobertura, sendo a dose total parcelada em 4 aplicações, conforme tabela 1.

Tabela 1. Doses de nitrato de amônio utilizadas:

Dose kg ha ⁻¹	Dose total parcela (25 m ²)	Dose parcelada (4X)
--------------------------	--	---------------------

100 kg de N ou 333 kg de nitrato de amônio	833 gramas de nitrato de amônio	208,25 gramas de nitrato de amônio
200 kg de N ou 666 kg de nitrato de amônio	1.666 gramas de nitrato de amônio	416,50 gramas de nitrato de amônio
0 kg de N	0 kg de N	0 kg de N

Foram realizados três cortes, sendo que em cada um deles, nos tratamentos com inoculante, foi aplicado a dose de 300 mL/ha de Masterfix Gramíneas, o que em cada parcela corresponde a 0,75 mL do produto diluído em 3,0 L de água para melhor uniformização na aplicação. Nas parcelas sem a aplicação dos tratamentos com o inoculante foi aplicada a mesma quantidade de água (3,0 L) utilizada na diluição do *Masterfix Gramíneas*.

A primeira aplicação foi realizada em abril de 2013, sendo efetuado o corte em junho do mesmo ano. Após esse corte, a pastagem foi mantida em pousio devido ao baixo crescimento da forrageira (em função de seu fotoperíodo). Em outubro de 2013 foi realizado um novo corte para uniformização das parcelas, sendo realizada a segunda aplicação em novembro de 2013 e o segundo corte em dezembro do mesmo ano. No período de dezembro de 2013 a janeiro de 2014 foi realizado o rebaixamento da pastagem com a entrada do gado, ocorrendo a terceira aplicação na segunda quinzena de janeiro e o terceiro corte em março de 2014.

3.3 Quantidade de massa verde e massa seca

A produtividade da forrageira foi determinada pela massa seca, através da coleta de amostras a 20 cm do solo, da massa natural da área útil de cada parcela. As amostras foram pesadas para a obtenção da massa natural e levadas à estufa com circulação de ar forçada a 65°C para obtenção da massa seca (SILVA e QUEIROZ, 2002). Esse valor foi, posteriormente, transformado em Kg massa seca ha⁻¹.

Após a realização da amostragem, os materiais foram triturados em moinho tipo Willey e levados ao laboratório, onde foram realizadas as determinações dos teores foliares de nitrogênio, utilizados no método Kjeldahl (SILVA e QUEIROZ, 2002).

3.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 0,05 de significância. As análises foram realizadas com o software Sisvar (FERREIRA, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se na Tabela 4, que houve diferença ($P < 0,05$), entre os tratamentos no primeiro corte a ($P < 0,05$), porém com exceção do tratamento em que não foi aplicado nitrogênio, os demais tratamentos não diferiram entre si. Em todos os cortes com a aplicação do *Azospirillum* (Masterfix Gramínea) e aplicação conjunta de N, observou-se maior produção de massa verde (MV). Deve-se lembrar que como a aplicação de N foi realizada parcelada, o incremento com $\frac{1}{4}$ da dose de N promoveu incrementos de 23 e 25% em relação aos tratamentos em que foi aplicado somente a fonte de N, respectivamente nas doses de 100 e 200 kg N ha⁻¹. Esse comportamento deve-se aos diversos efeitos os quais o N pode influenciar, ou seja, de forma isolada quando o solo não disponibiliza N, o efeito da inoculação com o Masterfix Gramíneas pode não ser tão satisfatório. Porém, onde há aplicação suplementar de N, esse pode influenciar em maior crescimento radicular, o que permite maior absorção de nutrientes (RAO *et al.*, 1992) e outros fatores diretamente ligados ao desenvolvimento da planta, como a constituição de proteínas, enzimas, coenzimas, ácidos nucleicos, fitocromos, pigmentos fotossintéticos etc. (BÜLL, 1993). Assim, o crescimento da planta é favorecido com a aplicação de N e, conseqüentemente, promove aumento da área fotossinteticamente ativa da planta e síntese de fotoassimilados, que são translocados para os grãos (BÜLL, 1993) proporcionando incremento na produtividade.

Quadros (2009) observou, avaliando o desempenho agrônômico de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum* em associação com a adubação nitrogenada de até 53%, no rendimento da matéria seca da parte aérea para o tratamento inoculado em relação ao tratamento controle. O mesmo comportamento foi observado neste corte, em que o tratamento com maior produção de MV, com 200 kg de N e inoculado com *Azospirillum* teve incremento de 52,28% em relação ao tratamento controle, esse incremento pode evidenciar o efeito benéfico da inoculação em gramíneas (milho e brachiaria).

Na dose de 0 kg de N, no primeiro corte, o tratamento com *Azospirillum* produziu 26% menos de MV do que o observado no tratamento controle. Pode-se atribuir esse fato a necessidade do *Azospirillum* de um aporte, mesmo que menor de N para que sejam observadas diferenciações. Na dose de 100 kg de N a dose de *Azospirillum* produziu 23% a mais, o que pode-se inferir que quando

aplicado de forma conjunta N + Masterfix Gramíneas pode-se observar diferenciação na produção de MV, mesmo comportamento observado quando aplicado o tratamento com 200 kg de N, em que a presença do *Azospirillum* promoveu incrementos de 52% a mais de MV.

Tabela 2. Produtividade de massa verde – MV (kg.ha⁻¹) nos três cortes realizados, na Fazenda Bonsucesso, Uberlândia, MG.

Tratamentos	1º corte	2º corte	3º corte	MV total
T1	9850,00 bc A	5687,50 c B	5101,75 b B	20.712,50 cd
T2	7800,00 c A	4225,00 c B	5119,50 b AB	17.062,50 d
T3	11025,00 abc A	12962,50 b A	6707,50 b B	30.720,00 bc
T4	13600,00 ab A	13125,00 b A	14.437,50 a A	41.252,50 ab
T5	11987,50 abc A	15000,00 ab	8512,50 b B	35.497,50 b
		A		
T6	15000,00 a A	17387,00 a A	14677,50 a A	47.100,00 a
Média cortes	11.543,75 A	11.397,92 A	9.115,13 B	32.057,50
CV%	20,94	30,32	1,18	14,98
Média	10.685,83	11397,00	9092,70	32.057,50
DMS	2.453,57	7942,00	247,43	11.033,00

*Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna divergem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05) – Tratamentos: T1=0 Kg de N ha⁻¹ + 0 mL de inoculante; T2 = 0 Kg de N ha⁻¹ + 300 mL de inoculante ha⁻¹; T3 =100 Kg de N ha⁻¹; T4 =100 Kg de N ha⁻¹ + 300 mL de inoculante ha⁻¹; T5=200 Kg de N ha⁻¹; T6 =200 Kg de N ha⁻¹ + 300 mL de inoculante ha⁻¹;

Já no segundo corte (Tabela 2), observa-se que houve diferença significativa (P<0,05) entre os tratamentos, porém não houve diferença entre as doses de N e presença e ausência de *Azospirillum*, porém em todos os tratamentos em que houve aplicação suplementar de N houve incremento na produção. Na dose 0 kg de N observou-se um comportamento similar ao observado no primeiro corte (Tabela 2), em que a aplicação de *Azospirillum* reduziu em 25% a produção de MV, e nos demais cortes, a aplicação conjunta de *Azospirillum* com N, promoveu incrementos, em que na dose de 100 kg de N, o incremento foi de 1,25% e na dose de 200 kg de N de

aproximadamente 16%. Comparando o primeiro com o segundo corte, pode-se observar que houve diferença entre a produção de MV, em que na ausência de N (0 kg de N, independente da inoculação) houve menor produção no segundo corte, e nos demais tratamentos com presença de N, com e sem inoculantes não houve variação entre os cortes.

No terceiro corte (tabela 2), observou-se diferença significativa, entre os tratamentos, sendo que o incremento foi observado no tratamento com aplicação de 100 kg de N observou-se que a aplicação conjunta do *Azospirillum* promoveu aumento de 115% e na dose de 200 kg de N, incremento de 72,4%. Nos demais tratamentos não observou-se diferenciação de produção de MV em relação a testemunha. Nesse corte, em que a produção de MV foi reduzida, inclusive pela menos disponibilização de água no período, pode-se observar grande aumento de produção de MV decorrente da utilização conjunta da adubação nitrogenada associada a inoculação com Masterfix Gramíneas.

Obteve-se o somatório dos três cortes de MV, observou-se que as maiores produtividades obtidas foram nos tratamentos com adubação nitrogenada com associação da inoculação com Masetrfix gramíneas. Observando-se esses tratamentos pode-se inferir o efeito da aplicação do Masterfix gramíneas uma vez que suas produtividades de MV foram superiores a aplicação exclusiva de adubação nitrogenada. No tratamento com aplicação de 100 kg de N ha⁻¹ + masterfix gramíneas, tendo produtividade 99%, ao tratamento controle, 34% superior ao tratamento exclusivo com 100 kg de N ha⁻¹ e 16% superior a aplicação exclusiva de 200 kg de N ha⁻¹. Ou seja, neste tratamento pode ser inferido que a aplicação de Masterfix gramíneas foi mais benéfico do que se dobrar a dose de N aplicado, sendo que a aplicação foliar da fonte de *Azospirillum* é um trato cultural que pode ser implantado nas propriedades produtoras de capim, sem elevação dos custos com grandes equipamentos, pois basta a aquisição de uma bomba costal, além do preço do produto comercial que é adequado visando o custo benefício de sua aplicação e os ganhos ambientais provenientes da FBN. No tratamento com aplicação de 200 kg de N ha⁻¹ + masterfix gramíneas, tendo produtividade 127% ao tratamento controle, 32% superior ao tratamento exclusivo com 200 kg de N ha⁻¹. Neste tratamento também foi inferido aumentos de produtividade de MV com a inclusão do Masterfix gramíneas de forma significativa.

Neste experimento não observou-se efeito em ambos os cortes da aplicação do Masterfix gramíneas sem a aplicação conjunta do nitrogênio, o que pode ser observado no somatório dos cortes, em média houve uma redução de 17% na produtividade de MV. Apesar dessa redução não ter diferido estatisticamente ($P < 0,05$), pode-se considerar que a FBN, pelo *Azospirillum* pode necessitar de uma concentração mínima para favorecer o aporte de N. Resultado diferente do

observado por OLIVEIRA *et al.*, (2007) trabalhando com *Brachiaria brizantha* cv. Marandu mostraram que essa gramínea sem aplicação de nitrogênio e com inoculação de bactérias diazotróficas produziu mais forragem do que a testemunha (sem aplicação de N e sem inoculação), sendo apontada pelos autores como alternativa sustentável para aumento na produção de forragem.

A análise dos três cortes, podemos inferir que a presença de *Azospirillum* em complemento a adubação nitrogenada promoveu aumento da ordem de 1% a 115% de MV, sendo o custo e manejo de aplicação das doses uma ferramenta importante para incremento de produção de MV em sistemas de pastagens. Houve incremento na produção de massa verde decorrente da utilização conjunta da adubação nitrogenada com o inoculante, em que no somatório dos três cortes nos tratamentos em que não houve a aplicação de nitrogênio houve um decréscimo com ação do inoculante masterfix gramíneas de 17,62%. Já nos tratamentos com aplicação de nitrogênio, houve um incremento com a aplicação conjunta do *Azospirillum*, independente da dose, superior a 30%.

Em relação a MV total (tabela 2) pode-se observar que os melhores resultados foram obtidos quando houve a interação da dose de N e *Azospirillum*, em ambas as doses de N (100 kg e 200 kg de N por hectare), sendo significativamente superior ao nitrogênio aplicado isoladamente, com incrementos de 34,28% e 32,68%, respectivamente as doses de 100 e 200 kg de N, com inoculação de *azospirillum*. Em relação a massa seca (MS) observa-se (tabela 3) que no primeiro corte, o melhor tratamento foi o com maior dose de N (200 kg de N) com inclusão de *Azospirillum*, e este não diferiu do tratamento com 100 kg de N com inclusão de *Azospirillum*.

Tabela 3 – Produtividade de massa seca MS (kg ha⁻¹) nos três cortes realizados, na Fazenda Bonsucesso, Uberlândia, MG.

Tratamentos	1 corte	2 corte	3 corte	MS total*
0 N	4.388,75bc	2599,72 c	2.109,78 c	9098,25 ed
0 N + azospirillum	3.752,00 c	1927,94 c	2.186,98 c	7867,82 e
100 kg N	4.655,24bc	5049,42 b	2.810,31 bc	12515,33cd

100 kg N + azospirillum	4.922,96ab	5131,96 b	7.018,61 a	17073,54ab
200 kg de N	4.603,20bc	5435,53 ab	3.853,48 b	13892,41bc
200 kg de N + azospirillum	5.938,42 a	6468,90 a	7.748,25 a	20051,32 a
CV%	11,88	11,88	11,88	13,44
Média	1123,07	1123,07	1123,07	13416,45
DMS	2237,70	3293,18	379,34	4144,29

Médias seguidas por letras distintas na coluna divergem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

* somatório dos três cortes

Entre os tratamentos com aplicação de masterfix gramíneas no primeiro corte (Tabela 3), somente na dose 0 de N não foi observado incremento, com redução de 14,50%. Na dose de 100 kg de N o incremento de 6% e na dose de 200 kg de N um incremento de 29%. Esses resultados indicam que o uso de *Azospirillum* é eficiente para aumento da MS, desde o primeiro ciclo de aplicação, ou seja, seu efeito sobre a forrageira observado após 40 dias de sua inoculação e dose parcelada de N.

Já no segundo corte (tabela 3), observou-se que no tratamento com zero de N, não houve variação significativa (P<0,05) entre o tratamento com e sem aplicação de *Azospirillum*, porém onde não foi aplicado o Masterfix Gramíneas, houve uma redução de 25%. O mesmo comportamento de não variação entre os tratamentos com aplicação de 100 kg de N, porém no tratamento com aplicação de masterfix gramíneas, houve incremento de 1,63%. E nos tratamentos com aplicação de 200 kg de N, observou-se um incremento de 19%. Neste corte, observou-se que dentro da mesma dose de N, não houve variação entre a presença e ausência de azospirillum, apesar de ter sido observado incrementos nas doses com 100 e 200 kg de N.

No terceiro corte (tabela 3), os incrementos observados nos tratamentos com inclusão conjunta de N e *Azospirillum* foram superiores as observadas nos demais cortes. Esse comportamento pode indicar que a aplicação acumulativa de *Azospirillum*, pode promover maior acúmulo de MS em forrageiras. Observou-se que no tratamento sem aplicação de N, que independente da aplicação de *Azospirillum*, a produtividade de MS foram equivalentes, com incremento de 3% com aplicação de *Azospirillum*, mesmo não significativo, entre os três cortes avaliados, o maior desempenho nos tratamentos sem inclusão de N e *Azospirillum* só foi observado no último corte, devendo-se verificar se há efeito somando-se maiores doses de masterfix gramíneas para obtenção de maiores produtividades na ausência de N. Nas demais doses houve

grande incremento de MS, em resposta a aplicação ou não de *Azospirillum*, sendo que na dose de 100 kg de N o incremento onde houve aplicação de *Azospirillum* foi 150%, superior inclusive a diferença entre a aplicação exclusiva de N entre a dose de 100 e 200 kg de N que foi de 37%. Na dose de 200 kg de N a aplicação de *Azospirillum* foi 101%. Ou seja, o incremento do *Azospirillum*, neste corte, foi superior a 100%, nos tratamentos com inclusão de N e *Azospirillum*, o que indica que a fixação biológica de N promovida foi benéfica.

No somatório dos três cortes de MS, observou-se (tabela 3) que os melhores tratamentos foram observados onde foi aplicado o *Azospirillum* em complemento a adubação nitrogenada. A aplicação do *Azospirillum* associado a doses intermediárias de nitrogênio (uma vez que as aplicações de N foram realizadas parceladas) levou a incrementos na produção de matéria seca, comparado ao nitrogênio isolado. Entre os tratamentos com dose de 100 kg de N exclusivo e com a inclusão de *Azospirillum* o incremento foi de 36,42%. Entre os tratamentos com dose de 200 kg de N exclusivo e com a inclusão de *Azospirillum* o incremento foi de 44,33%. E entre os tratamentos com aplicação suplementar de *Azospirillum* nas doses de 100 e 200 kg de N, houve uma diferença de 17%. Uma observação que ocorreu em todos os cortes e refletiu no somatório dos três cortes, foi o resultado sempre inferior do uso do *Azospirillum*, quando associado ao tratamento controle, sem aplicação de N suplementar, com menor produção de 13%. Esse comportamento deve-se a necessidade do *Azospirillum*, em uma dose suplementar de N para que possa ser favorecido o fornecimento dos benefícios das bactérias diazotróficas, como fornecimento de N, efeito hormonal, entre outros.

O comportamento de acúmulo de forragem pode ser observado na Figura 1, e a avaliação dos contrastes ortogonais (tabela 5) confirmou que há efeito significativo entre a aplicação ou não de *azospirillum* em todas as doses.

Tabela 4- Contrastes ortogonais significativos a 5% de probabilidade

O contraste testado da MS total e MV total	
Nível dessa Fonte de Variação	Coefficientes
T1	1.0000
T2	-1.0000
T3	1.0000
T4	-1.0000
T5	1.0000

T6

-1.0000

Figura 1. Produtividade total (somatório dos três cortes) da massa seca de *B. brizantha* com e sem aplicação de inoculante e nitrogênio.

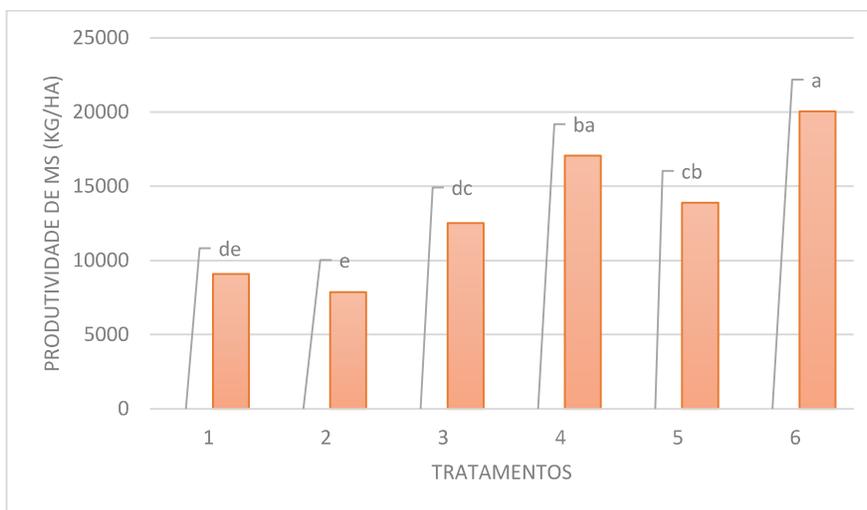


Tabela 5. Produtividade total (somatório dos três cortes) da massa seca de *B. brizantha* com e sem aplicação de inoculante e nitrogênio.

5. CONCLUSÕES

O uso de *Azospirillum* promove incremento de produção de massa seca e massa verde quando utilizado em conjunto com o nitrogênio. As melhores respostas foram obtidas quando a aplicação de *Azospirillum* ocorreu em conjunto com a dose de nitrogênio suplementar, com ganhos significativos quando comparado ao tratamento com a adubação nitrogenada somente. O uso de *Azospirillum* associados à dose intermediária de nitrogênio (100 kg/ha) trouxe respostas significativamente iguais a maior dose nitrogênio aplicada isoladamente. A forma de aplicação de *Azospirillum* em superfície em pastagens estabelecidas propiciou o aumento de massa seca e massa verde quando em consórcio com doses de nitrogênio suplementar.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRINO, EMERSON *et al.* Características morfogênicas e estruturais na rebrotação da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu submetida a três doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1372-1379, 2004.

AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 1, p. 241-248, 2002.

AZAM, F.; MALIK, K.A. e SAJJAD, M.I. Transformations in soil and availability to plants of ^{15}N Applied as inorganic fertilizer and legume residues. **Plant Soil**, 86:3-13, 1985.

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

BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.36, p.591-608, 1990.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum* – plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.103-121, 1997.

BASHAN, Y.; VAZQUEZ, P. Effect of calcium carbonate, sand, and organic matter levels on mortality of five species of *Azospirillum* in natural and artificial bulk soils. **Biol. Fertil. Soils.**, 30:450-459, 2000.

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

BODDEY, R. M.; MORAES SÁ, J. C.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. The contribution of biological nitrogen fixation for sustainable agricultural systems in the tropics. **In: International Symposium - Sustainable Agriculture for the Tropics: The Role of Biological Nitrogen Fixation.** Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brazil, 1995. p. 787-799.

BÜLL, L. T. Nutrição mineral do milho. In: BULL, L. T.; CANTARELLA, H. (ed). Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Potafos, 1993. p.63-131.

CANTARELLA, L. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, R. L. F. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (ed.). Fertilidade do solo. Viçosa: SBCS, 2007. p.376-470.

CAVALLET, L.H.; PESSOA, A.C. dos S.; HELMICH, J.J.; HELMICH, P.R.; OST, C.F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande, v.4, n.1, p.129-132, 2000.

CORREA, O.S.; ROMERO, A.M.; SORIA, M.A.; DE ESTRADA, M. *Azospirillum* brasilense-plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Microbiología, 2008. p.87-95.

Argentina de

CHEN, J. e GABELMAN, W.H. Morphological and physiological characteristics of tomato roots associated with potassium acquisition efficiency. **Sci. Hortic.**, 83:213-225, 2000.

DIDONET, C.C.G.M. Bactérias diazotróficas: isolamento, diversidade e caracterização em plantas do arroz no cerrado. Anápolis: UnU CET, 2007. 20 p.

DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, v.22, p.1464-1473, 1976.

DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In.: CARDOSO, E.J.B.N., TSAI, S.M., NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas : SBCS, 1992. p. 173-180.

DOBBELAERE, S.; CROONRNBOGHES, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; AGUIRRE, J.F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S.; OKON, Y. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal of Plant Physiology*, v.28, p.871-879, 2001.

DOBBELAERE, S.; CROONENBOGHES, A. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biology and Fertility of Soils*, v.36, p.284-297, 2002

DOBBELAERE, S; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant-growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 22, n. 2, p.107-149, 2003.

DONZELI, V.P. **Atividade de alguns componentes da comunidade microbiana do solo e microrganismos diazotróficos endofíticos sob influência do nitrogênio na cultura do milho**. 2002. Dissertação (Mestrado Pós-Graduação Instituto de Biologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002. 84p.

ECKERT, B. *et al.* *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.17-26, 2001.

EMBRAPA - CNPS. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília: Embrapa-SPI; Rio de Janeiro: Embrapa-Solos, 2006. 306 p.

FERREIRA, Daniel Furtado. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas**. 2000.

FERREIRA, V. L. P. *et al.* **Análise sensorial: testes discriminativos e afetivos**. Campinas: SBCTA, 2000.

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.

GOEBEL, E.M.; KRIEG, N.R. 1984. Fructose catabolism in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. **J. Bacteriol.** 159: 86-92.

GUILHERME, L.R.G.; VALE, F.R.; GUEDES, G.A.A. **Fertilidade do solo: dinâmica e disponibilidade de nutrientes**. Lavras: Esal; Faepe, 1995. 171p.

HALL, P. G.; KRIEG, N. R. Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 47, p. 433-435, 1984.

HARPER, J.E. Nitrogen metabolism. In: BOOTE, K.J., BENNETT, J.M., SINCLAIR, T.R., *et al.* **Physiology and determination of crop yield**. Madison : ASA/CSSA/SSSA, 1994. Chapt.11A. p.285-302.

HARRIS, G.H.; HESTERMAN, O.B.; PAUL, E.A.; PETERS, S. e E.JANKE, R.R. Fate of legume and fertilizer nitrogen-15 in a long term cropping systems experiment. **Agron. J.**, 86:910-915, 1994.

HARRIS, G.H. e HESTERMAN, O.B. Quantifying the nitrogen contribution from alfafa to soil and two succeeding crops using nitrogen-15. **Agron. J.**, 82:129-134, 1990.

HUERGO, L.F.; MONTEIRO, R.A.; BONATTO, A.C.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. *Azospirillum* sp.: cell hysiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. **Asociación Argentina de Microbiologia, Argentina**, 2008. p.17-35.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto**

brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283). (ISSN 1516-781X; N 283).

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* (online), 2009.

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.1-2, p.413-425, 2010.

JARVIS, S. C. Nitrogen management and sustainability. In: CHERNEY, J. H.; CHERNEY, D. J. R. (Ed.). *Grass for dairy cattle*. Wallingford: CAB International, 1998. p. 161-192.

LARA CABEZAS, W.A.R.; TRIVELIN, P.C.O.; KORNODÔRF, G.H. e PEREIRA, S. Balanço da adubação nitrogenada sólida e fluida de cobertura na cultura do milho em sistema plantio direto no Triângulo Mineiro. **R. Bras. Ci. Solo**, 14:363-376, 2000.

MARCHIORO, LUIZ EDUARDO TEDESCO. Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio. 2005.

MIFLIN, B.J.; LEA; P.J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. **Phytochemistry**, New York, v.15, p.873-885, 1976.

MORRISSEY, J.P.; DOW, M.; MARK, G.L.; O'GARA. F.. **Are microbes at the root of a solution to world food production? Rational exploitation of interactions between microbes and plants can help to transform agriculture**. *EMBO Rep* 5:922-92, 2004.

NAYAK, D.N., LADHA, J.K., WATANABE, I.: *Biol. Fertil. Soils* 2, 7-14 (1986).

OLIVEIRA, A. L. M. *et al.* The effect of inoculating endophytic N₂ -fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant Soil*, v. 242, n. 2, p. 205-215, 2002.

OLIVEIRA, P. P. A.; TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, W. S.; CORSI, M. Fertilização com N e S na recuperação de pastagem de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 4, p. 1121- 1129, 2005.

OLIVEIRA, P. P. A.; OLIVEIRA, W. S.; BARIONI, W. J.; **Produção de forragem e qualidade de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com *Azospirillum brasilense* e fertilizada com nitrogênio**. São Carlos: Embrapa pecuária sudeste, 2007, 4p. (Circular Técnico, 54)

OLSON, R.A.; KURTZ, L.T. **Crop nitrogen requirements, utilization and fertilization**. In: STEVENSON, F.J., ed. Nitrogen in agricultural soils. Madison, American Society of Agronomy, 1982. p.567-604 (Agronomy, 22).

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

QUADROS, P. D. de. Inoculação de *Azospirillum spp.* em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: UFRGS, 2009. 62p. Dissertação Mestrado

PEARSE, P.J.; WILMAN, D. Effects of applied nitrogen on grass leaf initiation, development and death in field swards. *Journal Agriculture Science*, v.103, n.2, p.405-413, 1984.

PERON, ANTÔNIO JOSÉ; EVANGELISTA, ANTÔNIO RICARDO. Degradação de pastagens em regiões de cerrado. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 3, p. 655-661, 2004.

PRIMAVESI, A. C.; PRIMAVESI, O.; CORREA, L. A.; CANTARELLA, H.; SILVA, A. G. Efeito de doses e de fontes de nitrogênio na composição mineral de capim-marandu. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 7 p. (Embrapa Pecuária Sudeste. **Comunicado Técnico, 58**).

RADWAN, T. E. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.39, p.987-994, 2004.

RAO, A. C. S.; SMITH, J. L.; PARR, J. F.; PAPENDICK, R. I. Considerations in estimating nitrogen recovery efficiency by the difference and isotopic dilution methods. *Fertilizer Research*, v.33, p.209-217, 1992.

RYLE, G.J. A. *et al.* The respiratory costs of nitrogen fixation in soybean, cowpea, and white clover. II. Comparisons of the cost of nitrogen fixation and the utilization of combined nitrogen. **Journal of Experimental Botany**, v.30, p.145-153, 1979.

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**, Viçosa, v. 32, n. 3, p. 1139-1146, 2008.

RONCATO-MACCARI, L.D.B. *et al.* Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.45, p.39-47, 2003.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends in Microbiology*, Marburg, v.6, n.4, p.139-144, 1998.

SAIKIA, S.P.; JAIN, V. Biological nitrogen fixation with non-legumes: an achievable target or a dogma? **Current Science**, Bangalore, v. 92, n. 3, p. 317-322, 2007.

SANTOS, Reginaldo Ferreira; CARLESSO, Reimar. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 2, n. 3, p. 287-294, 1998.

SCIVITTARO, W.B.; MURAOKA, T.; BOARETTO, A.E. e TRIVELIN, P.C.O. Transformações do nitrogênio proveniente de mucuna-preta e uréia utilizados como adubo na cultura do milho. **Pesq. Agropec. Bras.**, 38:1427-1433, 2003.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3. Ed. Viçosa, MG. Editora UFV, 2002. 165p.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotecnologia do solo**: fundamentos e perspectivas. Brasília: MEC Ministério da Educação, ABEAS, Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 236p.

SOUZA, Paulino Taveira de *et al.* Inoculação com *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada em *Brachiaria brizantha* cv. marandu. 2014.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p.487 - 506, 2000.

SUMNER, M.E. Crop responses to *Azospirillum inoculation*. **Advances in Soil Sciences**, New York, v.12, p.54-123, 1990.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.449-484.

TERVER, I.W.; HOLLIS, J.P. Bacteria in the storage organs of healthy tissue. **Phytopathology Journal**, New York, v.38, p.960-967, 2002.

WHITEHEAD, D. C. Volatilization of ammonia. In. *Grassland nitrogen*. Wallingford: CAB International, 1995. p. 152-179.

ZHULIN, I. B., TRETYAKOVA, S.E. e IGNATOV, V. V. (1988). Chemotaxis of *Azospirillum brasilense* towards compounds typical of plant root exudates. **Folia Microbiologica** 33, 277-280.