

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**  
**Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

**Tese**



***Azospirillum brasilense* NA PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO MINERAL DA  
FORRAGEM DE AZEVÉM ANUAL (*Lolium multiflorum* Lam.)**

**RAFAEL BONADIMAN**

**Pelotas, 2015**

**Rafael Bonadiman**

***Azospirillum brasilense* NA PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO MINERAL DA  
FORRAGEM DE AZEVÉM ANUAL (*Lolium multiflorum* Lam.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Pastagens).

Orientador: Dr. Otoniel Geter Lauz Ferreira

Co-Orientador: Dr. Carlos Eduardo da Silva Pedroso

Pelotas, 2015

**RAFAEL BONADIMAN**

B111a Bonadiman, Rafael

Azospirillum brasilense na produção e composição mineral da forragem de azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) / Rafael Bonadiman ; Otoniel Geter Lauz Ferreira, orientador ; Carlos Eduardo da Silva Pedroso, coorientador. — Pelotas, 2015.

97 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Doses de nitrogênio. 2. Fixação biológica de nitrogênio. 3. Rizobactérias. 4. Teor de nutrientes. 5. Características estruturais. I. Ferreira, Otoniel Geter Lauz, orient. II. Pedroso, Carlos Eduardo da Silva, coorient. III. Título.

CDD : 633.2

**RAFAEL BONADIMAN**

***Azospirillum brasilense* NA PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO MINERAL DA  
FORRAGEM DE AZEVÉM ANUAL (*Lolium multiflorum* LAM.)**

**Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em  
Ciências**

**Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Faculdade de Agronomia,  
Universidade Federal de Pelotas.**

Data da Defesa: 17/12/0215

**Banca examinadora:**



**Prof. Dr. Otoniel Geter Lauz Ferreira**  
(Orientador)

Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas



**Dra. Flavia Fontana Fernandes**

Doutora em Ciências do Solo pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul



**Prof. Dr. Manoel de Souza Maia**

Doutor em Ciência pela Universidade Federal de Pelotas



**Prof. Dr. Rodrigo Pizzani**

Doutor em Ciências do Solo pela Universidade Federal de Santa Maria



**Prof. Dr. Stefani Macari**

Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## **DEDICO**

**À Deus,**

Fonte da vida, estímulo constante, que através de pessoas e oportunidades me fazem refletir, acreditar e lutar pelos meus sonhos e à sempre crer no dom da sabedoria que me foi entregue e na minha capacidade de aprendizagem.

Ao meu pai, **Luiz Bonadiman**, e  
À minha mãe, **Dilva Boscaini Bonadiman**,

Vocês são meu porto seguro para todos os momentos. Sempre me ensinaram a seguir o caminho correto, a fazer o bem, a ajudar as pessoas; saber esperar, pois para tudo há o seu tempo. Sempre me proporcionaram um amor imedível, palavras de afeto, e broncas sempre merecidas. É tão bom crescer e amadurecer ao lado de vocês, meus exemplos para toda a vida. Sei que nunca mediram esforços para dar, o que necessitava.

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por tudo e ao meu anjo da guarda que sempre me protegeu nas viagens à Pelotas.

Ao **Otoniel G.L. Ferreira**, além de orientador um amigo, um irmão, um colega. Sempre disponível para ajudar e encontrar as melhores saídas. Agradeço pela oportunidade e pela dedicação na condução dessa caminhada, meus mais sinceros agradecimentos.

Ao **Programa de Pós-graduação** da Universidade Federal de Pelotas , em possibilitar a concretização deste sonho.

A **Juliana Broch**, pela compreensão e incentivo, sempre amável e atenciosa dando-me todo amparo e proteção nos momentos difíceis. Pela possibilidade que Deus me deu em conviver contigo. Pelos anos que estivemos juntos tive a oportunidade de aprender a cada dia a importância e a beleza da simplicidade.

A minha irmã **Daiana** que me deu forças durante a minha caminhada e por entender a distância de todos esses anos.

Aos meus tios em especial **Elvino Bonadiman** (*in memoriam*), que sempre me apoiou na busca dos meus sonhos. Sei que estás intercedendo por mim.

Ao meu amigo **Ricardo Zambarda Vaz** pela amizade, companheirismo e apoio nesta jornada.

Aos colegas do **GOVI** Régis “meu braço direito”, Olmar (meu estatístico), Willian, Fernando, Pâmela, Marcos, João e Cícero, que sem a grande ajuda de vocês em todas as etapas do trabalho, não seria possível a realização deste experimento.

Aos **Professores e funcionários da UFPel** que sempre se colocaram a disposição para que essa etapa fosse cumprida.

A todos que de alguma forma contribuíram tem seu mérito no trabalho, merecendo assim meus mais sinceros agradecimentos.

## EPÍGRAFE

*Santo Anjo do Senhor  
meu zeloso guardador  
se a ti me confiou  
a piedade Divina:  
sempre me rege, me guarde,  
me governe, me ilumine.  
Amém.*

*Vinde a mim, todos os que estais aflitos sob o fardo, e eu vos aliviarei.  
Tomai sobre vós o meu jugo, e aprendei de mim, que sou manso e humilde de  
coração; e encontrareis descanso para as vossas almas.  
Porque o meu jugo é suave e o meu fardo é leve.  
(Mateus 11:28-30)*

## RESUMO

BONADIMAN, Rafael. ***Azospirillum brasilense* na produção e composição mineral da forragem de azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.)** 2015. 97f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

O objetivo do trabalho foi avaliar, em casa de vegetação, os efeitos da inoculação com *Azospirillum brasilense*, cepas AbV5 e AbV6, associada a diferentes níveis de adubação nitrogenada sobre as características estruturais, produção de matéria seca e teores de nutrientes de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) BRS Ponteio. As unidades experimentais corresponderam a vasos com capacidade de 2,43 dm<sup>3</sup>, totalizando quarenta vasos, alocados em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. O adubo nitrogenado foi aplicado 20% no momento da semeadura e 80% em cobertura, no perfilhamento. As sementes de azevém foram inoculadas com o produto comercial MASTERFIXL® Gramíneas, na dose de 300 mL.ha<sup>-1</sup>. Foram analisadas as variáveis altura de planta estendida, número de perfilhos/vaso, número de folhas em expansão, expandidas senescentes e mortas/perfilho, relação folha:colmo a área foliar, matéria seca de folha, colmo e total e a composição nutricional da parte aérea e radicular (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio). Os resultados foram submetidos à análise de variância, teste de comparação de médias de *Tukey* ou a regressão polinomial ( $P \leq 0,05$ ). A adubação nitrogenada aumentou a área foliar, relação folha:colmo e o número de perfilhos do azevém. A inoculação com *Azospirillum brasilense* potencializou o perfilhamento do azevém com, no mínimo, 50% da adubação nitrogenada recomendada. No entanto, independente do nível de adubação nitrogenada, não influenciou o desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular aumentando apenas os teores de fósforo acumulado.

**PALAVRAS-CHAVE:** doses de nitrogênio, fixação biológica de nitrogênio, rizobactérias, teor de nutrientes, características estruturais.



## ABSTRACT

BONADIMAN, Rafael. ***Azospirillum brasilense* in production and mineral composition of annual ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.)** 2015. 97f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

The aim of the study was to evaluate, under greenhouse conditions, the effects of *Azospirillum brasilense*, strains AbV5 e AbV6, inoculation associated to different nitrogen fertilization levels on structural characteristics, dry matter production and ryegrass nutrient levels (*Lolium multiflorum* Lam.) BRS Ponteio. The experimental units corresponded to vessels with a capacity of 2.43 dm<sup>3</sup>, totaling forty vessels, allocated in a completely randomized design with four replications. Nitrogen fertilizer was applied 20% at the time of sowing, and 80% in covering, at tillering. The ryegrass seeds were inoculated using a commercial product called MASTERFIXL® Gramíneas at a dosage of 300 mL.ha<sup>-1</sup>. In this work, the following variables were analyzed: extended plant height, number of tillers/vessels, number of leaves growing, expanded senescent and dead/tiller, leaf:stem ratio in leaf area, dry matter of leaf, stem and total, and the aerial and root nutritional composition (nitrogen, phosphorus, potassium, calcium and magnesium). The results were submitted to analysis of variance and mean comparison Tukey test or linear regression ( $p \leq 0.05$ ). Nitrogen fertilization increased leaf area, leaf:stem ratio and the number of tillers of ryegrass. *Azospirillum brasilense* inoculation leveraged tillering ryegrass with at least 50% of the recommended nitrogen fertilization. Meanwhile, the nitrogen fertilization level had no effect on the development of aerial and root systems, increasing only the accumulated phosphorus.

**KEYWORDS:** nitrogen dosage, biological nitrogen fixation, rhizobacteria, nutrient level, structural characteristics.

## LISTA DE ANEXOS

|         |  |    |
|---------|--|----|
| Anexo 1 | Nota fiscal de compra de Masterfix L Gramíneas inoculante líquido <i>Azospirillum brasilense</i> cepas AbV5 e AbV6. Pelotas, 2015..... | 96 |
| Anexo 2 | Rótulo de Masterfix L Gramíneas inoculante líquido <i>Azospirillum brasilense</i> cepas AbV5 e AbV6. Pelotas, 2015.....                | 97 |

## LISTA DE FIGURAS

### Artigo I

- Figura 1 Número de perfilhos de azevém (por vaso) submetido a inoculação ou não com *Azospirillum brasilense* e diferentes níveis de adubação nitrogenada. Pelotas, 2015..... 58
- Figura 2 Área foliar (cm<sup>2</sup>) de azevém submetido a diferentes níveis de adubação nitrogenada. Pelotas, 2015..... 63
- Figura 3 Relação folha:colmo de azevém submetido a diferentes níveis de adubação nitrogenada. Pelotas, 2015..... 64

### Artigo II

- Figura 1 Teores (g.Kg<sup>-1</sup>) de fósforo em azevém submetido ou não a inoculação com *Azospirillum brasilense*. Pelotas, 2015..... 82

## LISTA DE TABELAS

### Artigo I

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Número de perfilhos e comprimento de planta de azevém submetido à inoculação ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> e diferentes níveis de adubação nitrogenada. Pelotas, 2015.....  | 60 |
| Tabela 2 | Número de folhas em expansão e vivas de azevém submetido ou não a inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> . Pelotas, 2015.....  | 61 |
| Tabela 3 | Área foliar, relação folha:colmo, número de folhas expandidas, em expansão, vivas, em senescência e mortas em diferentes cortes de azevém inoculado ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> e diferentes níveis de adubação nitrogenada. Pelotas, 2015..... | 66 |

### Artigo II

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Matéria seca de folha (MSF), colmo (MSC) e total (MST) e, teores ( $\text{g.Kg}^{-1}$ ) de nitrogênio (N), fósforo (P) e magnésio (Mg) em azevém submetido a diferentes níveis de adubação nitrogenada. Pelotas, 2015..... | 80 |
| Tabela 2 | Teores ( $\text{g.Kg}^{-1}$ ) de potássio e cálcio em azevém submetido à inoculação ou não com <i>Azospirillum brasilense</i> e diferentes níveis de adubação nitrogenada. Pelotas-RS, 2015.....                           | 83 |
| Tabela 3 | Nitrogênio e potássio ( $\text{g.Kg}^{-1}$ ) na raiz de azevém submetido ou não a inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> e diferentes níveis de adubação nitrogenada. Pelotas, 2015.....                            | 86 |
| Tabela 4 | Teores ( $\text{g.Kg}^{-1}$ ) de fósforo e magnésio nas raízes de azevém submetido ou não a inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> . Pelotas, 2015.....   | 87 |
| Tabela 5 | Teores ( $\text{g.Kg}^{-1}$ ) de fósforo, magnésio e cálcio nas raízes de azevém submetido a diferentes níveis de adubação nitrogenada. Pelotas, 2015.....   | 88 |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| RESUMO.....   | 8  |
| ABSTRACT .....  | 9  |
| Lista de Figuras .....  | 11 |
| Lista de Tabelas.....   | 12 |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 14 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....  | 15 |
| 2.1. Azevém ( <i>Lolium multiflorum</i> Lam.) .....   | 15 |
| 2.2. Características estruturais da pastagem .....  | 15 |
| 2.3. Nitrogênio .....   | 16 |
| 2.4. Gênero <i>Azospirillum</i> .....   | 18 |
| 2.5. Fisiologia da fixação assimbiótica de nitrogênio atmosférico em gramíneas.....   | 23 |
| 2.6. REFERÊNCIAS .....  | 26 |
| 3. PROJETO DE PESQUISA (DOUTORADO).....   | 31 |
| 3.1. Caracterização do Problema.....  | 32 |
| 3.2. Objetivos e Metas .....  | 35 |
| 3.3. Metodologia e Estratégia de ação.....  | 36 |
| 3.4. Variáveis analisadas .....   | 38 |
| 3.5. Resultados e Impactos esperados .....  | 40 |
| 3.6. Cronograma do Projeto .....  | 41 |
| 3.7. Orçamento .....  | 42 |
| 3.8. Referências Bibliográficas.....  | 43 |
| 4. RELATÓRIO DE TRABALHO DE CAMPO.....  | 47 |
| 4.1 Local.....  | 47 |
| 4.2 Solo .....  | 47 |
| 4.3 Tratamentos e delineamento experimental.....  | 47 |
| 4.4 Adubação e calagem.....   | 47 |
| 4.5 Duração do experimento .....  | 48 |
| 4.6 Instalação e condução do experimento .....  | 48 |
| 4.7 Análise estatística.....  | 49 |
| ARTIGO I.....   | 50 |
| Adubação nitrogenada associada à inoculação com <i>azospirillum brasilense</i> em<br>relação características estruturais de azevém anual..... | 50 |
| Introdução.....   | 53 |
| Material e métodos .....  | 55 |
| Resultados e discussão.....   | 57 |
| Conclusões.....   | 67 |
| Referências .....   | 67 |
| ARTIGO II.....  | 73 |
| Adubação nitrogenada e inoculação com <i>azospirillum brasilense</i> sobre produção de<br>azevém anual .....                                  | 73 |
| Introdução.....   | 75 |
| Resultados e discussão.....   | 79 |
| Conclusões.....   | 88 |
| Referências .....   | 88 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....  | 95 |
| 6. ANEXOS.....  | 96 |

## 1. INTRODUÇÃO

O azevém anual é largamente utilizado no sul do Brasil como forrageira no período hibernar. É uma gramínea adaptada às condições regionais, possui alta capacidade de rebrote e de produção de forragem, muito presente nos diferentes sistemas produtivos.

Com a intensificação dos sistemas de produção agropecuária no Rio Grande do Sul onde a pecuária de corte, que é desenvolvida simultaneamente à agricultura em propriedades rurais, está gradativamente perdendo espaço para a produção de grãos, principalmente nos últimos dez anos.

Neste contexto a produção animal tem adotado tecnologias que tem aumentado à produtividade nestas áreas, antes com problemas de degradação, com espécies cultivadas especialmente o azevém anual.

Dentre as práticas de manejo do azevém, podemos destacar a adubação nitrogenada como importante trato cultural, pois sua aplicação, além de proporcionar maior rendimento forrageiro, permite a distribuição uniforme da produção e um ciclo produtivo mais prolongado.

Nesse aspecto, a possibilidade de utilização de organismos capazes de fixar o nitrogênio pode ser alternativa de baixar custos, para suprir este mineral. Entre os organismos fixadores de nitrogênio atmosférico, têm se destacado várias espécies de bactérias, do gênero *Azospirillum*, que ocorrem na rizosfera de várias plantas, especialmente gramíneas forrageiras e cereais. Estas colonizam o sistema radicular e promovem o crescimento vegetal, sendo denominadas rizobactérias promotoras de crescimento vegetal.

No entanto, ainda o principal entrave à introdução do *Azospirillum* na cultura do azevém é a imprevisibilidade e inconsistência dos resultados de pesquisa, os quais podem variar muito em função da espécie vegetal, tipo de solo, entre outros.

O objetivo foi avaliar os efeitos da inoculação com *Azospirillum brasilense* associada a diferentes níveis de adubação nitrogenada sobre as características estruturais, produção de matéria seca e composição nutricional de plantas de azevém.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Azevém (*Lolium multiflorum* Lam.)

O uso de pastagens cultivadas de estação fria, dentro do sistema de produção, é a maneira mais rentável para se alcançar produção de matéria seca com qualidade e baixo custo (Carvalho et al., 1999).

O azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), é forrageira de estação fria utilizada de forma ampla para formação de pastagens no Rio Grande do Sul. É produtivo e adaptado às condições ambientais do estado, tanto no cultivo exclusivo quanto em consorciação com outras gramíneas ou leguminosas. Sua elevada capacidade de ressemeadura natural também contribui para que seja a espécie mais cultivada no sul do Brasil como alternativa alimentar no período de inverno. O azevém é originário da bacia do Mediterrâneo (Carámbula, 1998) e apresenta metabolismo fotossintético de ciclo C<sub>3</sub>.

A produção de forragem em sistemas de pastejo é regulada por variáveis ligadas ao pastejo, ao ambiente, variáveis estruturais do pasto, variáveis morfogênicas das plantas e variáveis inerentes ao suplemento utilizado (Hodgson, 1990).

### 2.2. Características estruturais da pastagem

A arquitetura da planta e a distribuição dos seus componentes no dossel determinam a qualidade da forragem, assim como a produção nos distintos níveis da planta. As características da pastagem que mais afetam a produção de forragem, de maior importância para o manejo são: altura, densidade de perfilhos, matéria seca e a quantidade de folhas (Hodgson, 1990).

O corte beneficia às plantas pelo aumento da entrada de luz no dossel vegetativo, alterando a proporção de folhas novas ativas fotossinteticamente, pela remoção de folhas mais velhas e ativando meristemas.

Os perfilhos têm desenvolvimento morfológico fundamentado na sucessiva diferenciação de fitômeros em distintos estádios de crescimento (Valentine & Matthew, 1999). O fitômero se constitui de nó, entrenó, folha e gema axilar (Briske, 1991). Durante o desenvolvimento da gramínea, ocorre a formação de fitômeros sucessivos, nos quais, o crescimento mais intenso é o das folhas. Cada fitômero tem origem no primórdio foliar formado no meristema apical localizado no ápice do caule

e sempre que o meristema apical produz uma nova folha, uma nova gema é produzida, localizada na axila da gema anteriormente formada. Logo, cada nó possui uma folha apical que pode potencialmente gerar um novo perfilho.

A densidade de perfilhos é dependente do equilíbrio entre a sua taxa de aparecimento e mortalidade de folhas (Lemaire & Chapman, 1996). O processo de perfilhamento varia conforme a espécie, a cultivar, a disponibilidade de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, a intensidade e qualidade da radiação luminosa (Gomide & Gomide, 2001). A produção de novos perfilhos é um processo intermitente que pode ser desencadeado pela desfolhação da planta e o conseqüente aumento na iluminação na base do dossel da pastagem.

O número de folhas por perfilho é o produto entre o tempo de vida de cada folha e a taxa de expansão das mesmas (Lemaire & Chapman, 1996) e por isso qualquer alteração em uma dessas duas características morfogênicas afetará o número de folhas vivas por perfilho.

A altura do dossel é convencionalmente definida como a altura média do dobramento das folhas (Hodgson, 1990) podendo ser mensurada através de régua graduada em cm.

O crescimento vegetal é caracterizado pela emissão e expansão de novas estruturas (folhas e/ou colmos) e constitui o principal determinante da produção de matéria seca da pastagem (Pinto et al., 2001). O alongamento de colmos em espécies tropicais também assume importância relativa como característica morfogênica e determina a relação folha:colmo, que constitui uma variável estrutural do dossel (Sbrissia & Da Silva, 2001).

Em geral, com a elevação da temperatura, as plantas começam a diferenciar o meristema apical e alongar o colmo, o que provoca a redução da relação folha:colmo.

### **2.3. Nitrogênio**

O nitrogênio é considerado elemento essencial para as plantas, pois está presente na composição das mais importantes biomoléculas, tais como ATP, NADH, NADPH, clorofila, proteínas e inúmeras enzimas (Moreira & Siqueira, 2006). É um dos elementos minerais requerido em maior quantidade. Em muitos sistemas de



cultivo, sua disponibilidade é quase sempre um fator limitante, interferindo no pleno desenvolvimento e produção das plantas (Malavolta, 1997).

Na biosfera, os processos metabólicos de diferentes espécies atuam interdependentemente para recuperar e reutilizar este elemento através do ciclo do nitrogênio (Nelson & Cox, 2009), o qual é desempenhado principalmente pela atividade microbiana. O nitrogênio pode ser incorporado ao solo através de compostos orgânicos (restos vegetais e animais) e/ou inorgânicos (fertilizantes nitrogenados sintéticos), fixação biológica (simbiótica ou não) e fixação por descargas elétricas. No solo, o nitrogênio pode ser mineralizado, imobilizado ou perdido por volatilização, desnitrificação, lavagem (perda por erosão), lixiviação e/ou ser extraído pelas culturas.

Na natureza, alguns organismos são capazes de assimilar o nitrogênio atmosférico e convertê-lo à forma assimilável (Amônia -  $\text{NH}_3$ ). Esse processo, chamado fixação biológica de nitrogênio, é realizado através do complexo enzimático nitrogenase.

Estima-se que a fixação biológica de nitrogênio seja responsável por cerca de 65% do total de nitrogênio fixado no planeta (Azevedo, 2010), o que o faz ser considerado o segundo processo biológico mais importante do planeta depois da fotossíntese, juntamente com a decomposição orgânica (Moreira; Siqueira, 2006).

Um grande número de plantas cultivadas mantém em suas raízes uma população ativa de microrganismos diazotróficos, sendo que, ao longo do processo evolutivo, muitas dessas associações sofreram especializações, resultando em relações muito estreitas entre a planta e a bactéria (Marchioro, 2005).

Tendo em vista os custos econômicos e ambientais decorrentes do uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos e o fato de que o Brasil importa atualmente cerca de 70% do nitrogênio utilizado na agricultura (Hungria, 2011), muitas pesquisas têm sido direcionadas quanto ao estudo do processo de fixação biológica do nitrogênio (Cantarella & Duarte, 2004; Conceição et al., 2009).

Em termos agrícolas, a maior contribuição da fixação biológica de nitrogênio, e a que mais se destaca no Brasil, ocorre pela simbiose do *Rhizobium* com a soja (Araújo, 2008). Estudos apontam que a eficiência desta associação permite dispensar totalmente (Hungria et al., 2001) a adubação nitrogenada sem causar perda de produtividade (Alves et al., 2003).

Devido ao grande benefício gerado por esta prática, muitos estudos têm buscado bactérias que realizam a fixação de nitrogênio em gramíneas (James, 2000; Kennedy & Islam, 2001; Roncato-Maccari et al., 2003), pois, se a fixação biológica de nitrogênio pudesse estar associada a espécies gramíneas, poderia aumentar o potencial de fornecimento deste nutriente às plantas.

Além disso, promoveria a conservação dos recursos não renováveis, a preservação do meio ambiente e reduziria o custo na compra de fertilizantes nitrogenados pelos agricultores.

O potencial da fixação biológica de nitrogênio em contribuir com nitrogênio para o crescimento de algumas espécies de gramíneas já foi demonstrado para algumas forrageiras, como a grama batatais (*Paspalum notatum batatais* Flüegge), o capim-colômbio (*Panicum maximum* Jacq), o capim braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf), a braquiária (*Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick) e também para o arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) (Boddey et al., 1995), para a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (James, 2000), para a cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.) (Kennedy & Islam, 2001) e do sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) (Roncato-Maccari et al., 2003). É muito provável, porém, que a fixação biológica de nitrogênio detectada nessas plantas seja o resultado da atividade não de uma, mas de várias espécies de microrganismos diazotróficos associados a elas.

Considerando a importância e a urgência do desenvolvimento de produtos que venham a substituir ou diminuir a utilização de energias não-renováveis, a inoculação com bactérias diazotróficas pode ser uma alternativa biotecnológica na busca pela sustentabilidade dos sistemas agrícolas, visto que pode promover incrementos na produção com menor dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos (Boddey et al., 1997), uma vez que estes microrganismos podem atuar na disponibilidade de nitrogênio para a planta (Baldani et al., 2002).

Neste sentido, o azevém pode ser considerado uma cultura promissora, com grande potencial a ser explorado em termos de viabilidade da inoculação, pois pode ser colonizado simultaneamente por bactérias diazotróficas (Roesch et al., 2007).

#### **2.4. Gênero *Azospirillum***

A fixação biológica de nitrogênio é a conversão de nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) em outras espécies químicas nitrogenadas, promovida por organismos, que usam o

nitrogênio fixado na síntese de proteínas e ácidos nucleicos (Nunes et al., 2003). A fixação biológica de nitrogênio representa a principal forma de fixar  $N_2$  em amônia ou nitrato, é ponto chave de ingresso do nitrogênio molecular no ciclo biogeoquímico do nitrogênio (Taiz & Zeiger, 2004).

Bactérias fixadoras de nitrogênio são encontradas na natureza na forma de vida livre ou em associação com plantas, e estão em geral amplamente distribuídas no solo (Didonet et al., 2000). Alguns microrganismos fixadores de nitrogênio podem ser citados por associarem-se as raízes das plantas como o gênero *Rhizobium*, *Bradirhizobium*, *Azotobacter*, *Acetobacter* e *Azospirillum*. Estima-se que de 30 a 90% das amostras de solo coletadas no planeta contenham algum gênero de *Azospirillum*. O potencial para uso na agricultura do gênero *Azospirillum* está sendo estudado, assim como sua ecofisiologia (Bashan et al., 2004).

Estas bactérias pertencem à subclasse  $\alpha$  das Proteobactérias, são gram-negativas, espiraladas e estão presentes em todos os tipos de solo, possuem diâmetro de um micrômetro ( $\mu\text{m}$ ) e o comprimento de 2,1 a 3,8  $\mu\text{m}$  (Silva et al., 2004), são curvas, móveis e de várias origens geográficas (Huergo, 2006). Tem formato de bastonete, na maioria das vezes apresentam-se uniflageladas e com movimento vibratório. A temperatura ótima de crescimento varia entre 28 e 41°C (Eckert et al., 2001). São aeróbicos típicos quando supridos com fonte de nitrogênio combinado, e microaerofílicos quando crescem dependente da fixação de  $N_2$  (Donzeli, 2002).

Segundo Dobereiner (1992), as fontes de carbono de maior preferência pelo *Azospirillum* são ácidos orgânicos como o malato, piruvato, succinato, glicose e frutose. Já as fontes de nitrogênio advém de amônia, aminoácidos, nitrato e nitrito e  $N_2$ . Todavia, são microrganismos capazes de crescer utilizando o nitrogênio atmosférico como fonte única de nitrogênio (Huergo, 2006).

Algumas bactérias fixadoras de  $N_2$  ocorrem na superfície de raízes, já as espécies do gênero *Azospirillum* podem ocorrer no interior das raízes, entre os espaços intercelulares ou até dentro de algumas células da raiz, como no protoxilema, que pode ser completamente preenchido pela bactéria (Siqueira & Franco, 1988). As bactérias diazotróficas *Azospirillum* sp. tem a capacidade de colonizar, além do sistema radicial, o colmo das gramíneas. Dentro das raízes a

bactéria fica protegida dos estresses do solo, como competição com outros organismos, acidez do solo e deficiência de fósforo (Siqueira & Franco, 1988).

Kavadia et al. (2008) demonstraram que altas concentrações de amônia ( $\text{NH}_3^+$ ) e baixas concentrações de oxigênio e carbono inibem o complexo nitrogenase das bactérias do gênero *Azospirillum* reduzindo a sua população. A grande importância da fixação biológica de nitrogênio em gramíneas é a maior facilidade de aproveitamento de água das mesmas, em relação às leguminosas. Pois as gramíneas apresentam maior eficiência fotossintética, sistema radicular fasciculado, tendo vantagens sobre o sistema pivotante das leguminosas, tanto para extrair água como nutrientes do solo (Campos et al., 2000). Dependendo da espécie de gramínea a qual a bactéria esteja associada, o *Azospirillum* apresenta maior ou menor atividade de fixação de  $\text{N}_2$ , a exemplo do que ocorre na simbiose das leguminosas com rizóbio (Siqueira & Franco, 1988).

O sistema de fixação de  $\text{N}_2$  pelo *Azospirillum* é predominantemente realizado através de associação, onde energia resulta de exsudatos das raízes das plantas hospedeiras, estimando-se que este tipo de fixação forneça entre 40 a 200 Kg de  $\text{N} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$  (Marschner, 1995).

Na inoculação de bactérias diazotróficas em sementes deve levar em consideração que estas estão amplamente distribuídas nos solos. Portanto, a inoculação à base de bactérias do gênero *Azospirillum* deve competir satisfatoriamente com as bactérias diazotróficas nativas e com a microflora do solo (Didonet et al., 2000).

A capacidade competitiva das bactérias diazotróficas com outras é alta somente quando as condições são de baixa disponibilidade de nitrogênio no ambiente (Silva et al., 2007). Em um trabalho desenvolvido por Silva et al. (2004) com *Azospirillum brasilense*, o efeito nas raízes de trigo e cevada foi observado em solo pobre em nutrientes.

Segundo Didonet (1993), é possível que os efeitos benéficos atribuídos à inoculação da planta com *Azospirillum* resultem da combinação de diferentes mecanismos que em conjunto desencadeiam vários fenômenos. Segundo o mesmo autor, as substâncias capazes de desencadear estes efeitos são os fitormônios, que como resultado final promovem o crescimento da planta. Há produção de fitormônios por microrganismos, e alguns estudos já foram efetuados.

Em relação ao gênero *Azospirillum* há estudos que demonstram a biossíntese de fitormônios, sobretudo auxinas, e este aspecto fitoestimulante pode favorecer o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Martínez-Morales et al., 2003). Bottini et al. (1989) citam a produção de pequenas quantidades de giberelinas e citocininas pela rizobactérias *Azospirillum sp.*. O balanço entre auxinas e citocininas na planta como um todo determina o maior crescimento da raiz ou parte aérea.

Quando o balanço tende para maior concentração de auxinas há indução ao crescimento radicial, ao passo que, a maior concentração de citocininas favorece o crescimento da parte aérea (Spaepen et al., 2009). Deve ser destacado que o estímulo de biossíntese de auxinas nas raízes das plantas é de extrema relevância, pois este fitormônio se tratando de um composto que estimula a divisão e o crescimento celular, a área superficial de raízes pode aumentar e conseqüentemente a capacidade de absorção de água e nutrientes. Assim como, o incremento na tolerância ao déficit hídrico destas plantas inoculadas.

Em testes com plântulas de milho foi observada promoção de raízes laterais e inibição da elongação das raízes. Em trigo, a resposta à inoculação com *Azospirillum* é em grande parte creditada ao fitormônios, principalmente a auxina (Didonet, 1993), devido a sua reconhecida ação na expansão das células vegetais.

Segundo o mesmo autor, a inoculação de sementes de trigo com bactérias do gênero *Azospirillum* promoveu o crescimento das raízes, avaliado através do comprimento, peso da matéria fresca e número de raízes. Estes resultados podem ser atribuídos às substâncias que interferem no crescimento como auxinas e outros compostos. Segundo Didonet et al. (2000), mesmo não ocorrendo incremento em rendimento de grãos, de maneira em geral, têm ocorrido melhor uso dos fertilizantes, decorrente do maior desenvolvimento radicial nos estádios iniciais de crescimento das plantas proporcionado pelas bactérias.

Em experimentos realizados por Díaz-Zorita et al. (2009), com a cultura do trigo, de 2002 a 2006, na região do pampa argentino observou-se incremento no rendimento entre as médias dos locais estudados de 260 Kg.ha<sup>-1</sup> com utilização de inoculante a base de *Azospirillum brasilense*. A inoculação modifica a morfologia do sistema radicular, aumenta o número de radículas, o diâmetro das raízes laterais e adventícias, provavelmente devido à produção, de substâncias promotoras do crescimento, como auxinas, giberelinas e citocininas, e não somente pela fixação

biológica de nitrogênio (Cavallet et al., 2000). Essa produção de fitormônios interfere no crescimento das plantas e altera a morfologia das raízes de modo que possibilite exploração de maior volume de solo.

As alterações morfológicas proporcionam a alongação da zona para formação de raízes, e promovem dessa maneira, aumento total do tamanho da raiz e da planta e maior desenvolvimento (Silva et al., 2004). Segundo trabalho descrito por Silva et al. (2004), com trigo e cevada, as plantas não apresentaram nodulação, mas ocorreu aumento na superfície das raízes, observando-se diferenças entre a densidade de raízes secundárias e o surgimento das principais. As secundárias em plantas inoculadas apresentaram menor número, no entanto, maior superfície de contato. O incremento do sistema radicular em plantas inoculadas proporciona maior longevidade aos tecidos verdes, em consequência ocorre maior período de atividade fotossintética, o que resulta em quantidades maiores de fotoassimilados para os grãos ou para a própria assimilação de nitrogênio, em relação às plantas não inoculadas (Didonet et al., 2000).

Um dos efeitos da inoculação de *Azospirillum* é o aumento da absorção de nutrientes (Didonet, 1993). Em trabalho desenvolvido por Saikia et al. (2007), plantas inoculadas com *Azospirillum* apresentaram maior taxa de fotossíntese e maior condutância estomática, resultando em maior rendimento de grãos em comparação com plantas não inoculadas, assim como o teor de nutrientes nos grãos foi maior em plantas inoculadas. Didonet et al. (2000), em experimento conduzido com trigo, concluíram que a inoculação proporciona translocação mais eficiente da biomassa das plantas para os grãos, produzindo grãos com maior massa.

Devido ao processo de fixação biológica de nitrogênio ser altamente oneroso para as células bacterianas, a adubação com nitrogênio mineral sobre as bactérias fixadoras pode causar inibição do processo, com nitrogênio disponível na forma mineral o complexo nitrogenase não é sintetizado e elas passam a utilizar o nitrogênio disponível (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, o que desfavorece a complementação da fertilização nitrogenada com fixação biológica de nitrogênio (Dobereiner, 1990).

Segundo Dobereiner (1990) o efeito da inoculação de cereais com estas bactérias depende do estabelecimento em condições de campo. Diferentes estirpes

da bactéria *Azospirillum* comportam-se distintamente conforme sua adaptação às condições em que é mantida, apresentando melhor crescimento quando isoladas de uma mesma região e de uma mesma espécie daquela que será utilizada (Didonet, 1993). Dobereiner (1990) sugere que as diferenças entre genótipos de gramíneas na obtenção de N<sub>2</sub> pela fixação biológica, mostram grande potencial para a sua melhor exploração através do melhoramento vegetal.

Para Reis Junior et al. (2004), a sustentabilidade nos sistemas de pastagens é dependente do manejo adequado, relacionado a escolha de plantas (genótipos), que além de serem adaptadas as condições edafoclimáticas existentes, seja eficiente na captação do nitrogênio atmosférico.

Os fatores ambientais, principalmente o estresse hídrico, têm grande influência sobre a população de microrganismos diazotróficos do solo e sobre o processo de fixação biológica de nitrogênio (Reis Junior et al., 2004). Como constatado pelo autor, em *Brachiaria*, a distribuição dos microrganismos fixadores de N<sub>2</sub> sofreu influência de acordo com o período do ano. A interação com outras bactérias é sinérgica nos efeitos benéficos a fisiologia das plantas. A literatura apresenta alguns trabalhos, onde a inoculação de *Azospirillum* associado ao *Rhizobium* mostrou efeito significativo sobre o número de nódulos, maior fixação de nitrogênio (caracterizado pelo incremento da redução do acetileno), maior teor de nitrogênio mineral e macro e micronutrientes de maneira geral quando comparada a inoculação realizada somente com o *Rhizobium* (Burdman et al., 1998; Rodelas et al., 1999).

## **2.5. Fisiologia da fixação assimbiótica de nitrogênio atmosférico em gramíneas**

Nos mais variados habitats, livres ou associados, todos os microrganismos diazotróficos utilizam um sistema básico de fixação de nitrogênio, baseado na redução do nitrogênio atmosférico a amônia pela ação da enzima nitrogenase. Em muitos organismos ocorre apenas uma forma de nitrogenase, a Mo nitrogenase, ou nitrogenase dependente do molibdênio, ou ainda *nitrogenase 1*. Duas outras formas foram identificadas inicialmente em *Azotobacter*: *nitrogenase 2* ou dependente de vanádio (Va- nitrogenase) e *nitrogenase 3* ou dependente de ferro (Fe – nitrogenase) (Bishop & Premakumar, 1992).

A fixação de nitrogênio pode ser inibida pelo suprimento do mesmo quando combinado, em todos os sistemas. Em diazotróficos de vida livre, isto ocorre pela inibição da síntese de nitrogenase ou inativação temporária da nitrogenase através de modificação covalente da enzima. Como o processo é complexo, a fixação biológica de nitrogênio requer a expressão de um conjunto de genes denominados *nif* (*nitrogen fixation*), que codificam para proteínas envolvidas diretamente no processo (Quatrin, 2015).

A fixação assimbiótica de nitrogênio depende da capacidade do microrganismo estabelecer-se endofiticamente no interior da planta, e para que isso ocorra, o microrganismo deve ser capaz de invadir e proliferar nos tecidos da planta hospedeira, ultrapassando as barreiras físicas e químicas que a planta estabelece, instituindo vias de infecção e sítios de colonização. Mas não deve induzir uma resposta drástica da planta à infecção, o que impediria a colonização dos tecidos. O estabelecimento desta relação depende de uma sequência de etapas e de uma relação específica entre planta e bactéria.

A riqueza de compostos orgânicos na rizosfera produz intensas atividades e interações microbianas. A movimentação dos microrganismos em direção às raízes ocorre quando existe um reconhecimento químico, denominado quimiotaxia. Estudos indicam que a quimiotaxia aos exsudatos da rizosfera são responsáveis pela chegada dos microrganismos. Em *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense* (Tarrand et al., 1978) verificou-se grande atividade quimiostática a diversos açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, compostos aromáticos e exsudatos radiculares de gramíneas. Observaram também respostas aerotáxicas a diferentes fontes de carbono e concentração de oxigênio, que variam conforme as espécies de *Azospirillum* (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

Este contexto demonstra a importância do desenvolvimento de pesquisas avaliando a viabilidade da inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio em gramíneas, na tentativa de verificar os benefícios desta tecnologia para a cultura do azevém.

Deste modo, considerando as pesquisas com *Azospirillum brasilense* em gramíneas e a possibilidade de se encontrar soluções para a agricultura este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos da inoculação com *Azospirillum brasilense* associada a diferentes níveis de adubação nitrogenada



sobre as características estruturais, produção de matéria seca e composição nutricional de plantas de azevém.

## 2.6. REFERÊNCIAS

- ALVES, B.R.J.; DODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, The Hague, v.252, p.1-9, 2003.
- ARAÚJO, S.C. Realidade e perspectivas para o uso de *Azospirillum* na cultura do milho. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n.122, p.4-6, 2008.
- AZEVEDO, P.T.M. **Minhocas, fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em mudas de *Araucaria angustifolia***. 2010. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.
- BALDANI, J.I. et al. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. 433p.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.50, p.521-577, 2004.
- BISHOP, P.E.; PREMAKUMAR, R. 1992. Alternative nitrogen fixation systems. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. eds. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.736-762.
- BODDEY, R.M. et al. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, The Hague, v.174, p.195-209, 1995.
- BODDEY, R.M. et al. The contribution of biological nitrogen fixation for sustainable agricultural systems in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.29, p.787-799, 1997.
- BOTTINI, R. et al. Identification of gibberellins A1, A3 and iso-A3 in culture of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, v.89, p.1-3, 1989.
- BRISKE, D.D. Developmental morphology and physiology of grasses. In: HEITSCHMIDT, R.K., STUTH, J.W. **Grazing management: an ecological perspective**. Oregon: Timber Press, 1991. p.85-108.
- BURDMAN, S. et al. Legume crop yield promotion by inoculation with *Azospirillum*. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W.E. (eds.) **Biological nitrogen fixation for the 21st century**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.609-612.
- 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, 2000.
- CANTARELLA, H.; DUARTE, A.P. Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho. In: GALVÃO, J.C.C.; MIRANDA, G.V. (eds.) **Tecnologias de produção do milho**. Viçosa: UFV, 2004. p.139-182.

CARÁMBULA, M. **Producción y manejo de pasturas sembradas**. Hemisferio Sur, 1998. 464 p.

CARVALHO, P.C. de F; PRACHE, S.; DAMASCENO, J.C. O processo de pastejo: desafios da procura e apreensão da forragem pelo herbívoro. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999. **Anais...**: SBZ, 1999. p.253-268.

CAVALLET, L.E. et al. 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.

CONCEIÇÃO, P.M. et al. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.1880-1883, 2009.

DÍAZ-ZORITA, M.; FERNÁNDEZ-CANIGIA, M. V. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. **European Journal of Soil Biology**, n.45, p. 3-11, 2009.

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, 1993. 80p.

DIDONET, D.A.; LIMA, O.S.; CANDATEN, M.H. & RODRIGUES, O. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos, em trigo submetido à inoculação de *Azospirillum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n.35, p.401-411, 2000.

DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In: CARDOSO, E.J.B.N. (eds.) **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 1992. p.173-180.

DÖBEREINER, J.; PAULA, M.A. de, MONTEIRO, E.M.S. A pesquisa em microbiologia do solo no Brasil. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, n. 50, p. 841-854, 1990.

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**, Reading, v.51, p.17-26, 2001.

GOMIDE, J.A.; GOMIDE, C.A.M. Utilização e manejo de pastagens. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. 38., 2001. **Anais...**: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001, p. 808-825.

HODGSON, J. grazing management: Science into practice. John Wiley; Longman Scientific and Technical, Longman, 1990. p. 203.

HUERGO, L.F. **Regulação do metabolismo de nitrogênio em *Azospirillum brasilense***. 2006. 187f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

HUNGRIA, M. et al. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.33, p.387-394, 2001.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: EMBRAPA-SOJA, 2011. 36p. (Documentos EMBRAPA-SOJA, ISSN 1516-781X, n.325).

JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.65, p.197-209, 2000.

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.

KENNEDY, I.R.; ISLAM, N. The current and potential contribution of asymbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v.41, n.3, p.447-457, 2001.

LEMAIRE, G.; CHAPMAN, D. Tissue flows in grazed plant communities. In: HODGSON, J.; ILLIUS, A.W. (Ed.) **The ecology and management of grazing systems**. Guildford: CAB International, 1996. cap.1, p.3-36.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.

MARCHIORO, L.E.T. **Produção de ácido indol-acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. 2005. 74f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. Institute of Plant Nutrition University of Hohenheim, Academic Press: Germany, 1995. 889 p.

MARTÍNEZ-MORALES, L.J et al. Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v.228, p.167-173, 2003.

MIRANDA, C.H.B.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Selection of ecotypes of *Panicum maximum* for associated biological nitrogen fixation using the <sup>15</sup>N isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.22, p.657-663, 1990.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. (eds.) **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: UFLA, 2006. p.449-542.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5. ed. W.H. Freeman, 2009. 1100p.

NUNES, F. S. et al. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**. São Paulo, v.26, n.6, p.872-879, 2003.

PINTO, L.F.F. et al. Dinâmica do acúmulo de matéria seca em pastagens de Tifton 85 sob pastejo. **Scientia Agricola**, p.439-447, 2001.

REIS JUNIOR, F. B; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associado a *Brachiaria* sp. em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, p. 103-113, 2004.

RODELAS, B. et al. Influence of *Rhizobium/Azotobacter* and *Rhizobium/Azospirillum* combined inoculation on mineral composition of faba bean (*Vicia faba* L.). *Biology and Fertility of Soils*, v.29, p.165-169, 1999.

ROESCH, L.F.W. et al. Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. For nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.23, n.10, p.1377-1383, 2007.

RONCATO-MACCARI, L.D.B. et al. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.45, n.1, p.39-47, 2003.

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.

SBRISSIA, A.F., DA SILVA, S.C. O ecossistema de pastagens e a produção animal. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001. **Anais...:SBZ**, 2001.p .731-754.

SILVA, A.A. O. et al. Ação do *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV 95033). **Conscientiae Saúde**, v.3, p.29-35, 2004.

SILVA, D.M. et al. Bactérias diazotróficas nas folhas e colmos de plantas de arroz irrigado (*Oriza sativa* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, n.2, p.181-187, 2007.

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

SPAEPEN, S. et al. Plant Growth-Promoting Actions of Rhizobacteria. In L. C. VAN LOON editor: *Advances in Botanical Research*, v.51, Burlington: **Academic Press**, 2009, pp.283-320.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004. 719p.

TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.24, n.8, p.967-980, 1978.

VALENTINE, I.; MATTHEW, C. Plant growth, development and yield. In: WHITE, J.; HODGSONS, J. (Ed). New Zealand- **Pasture and crop science**, Oxford: Cambridge University Press, 1999. p. 11-27.

### **3. PROJETO DE PESQUISA (DOUTORADO)**

#### **INOCULAÇÃO DE *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* EM AZEVÉM (*LOLIUM MULTIFLORUM* L.) E AVEIA PRETA (*AVENA STRIGOSA* S.)**

(Código do COCEPE: 4688)

**Equipe: Eng.Agr. Rafael Bonadiman**

**Orientador: Prof. Dr. Otoniel Geter Lauz Ferreira**

**Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo da Silva Pedroso**

**Eng. Agr. Msc. Roger Marlon Gomes Esteves**

**Bolsista Régis Antônio Teixeira Coelho**

**Bolsista Olmar Antônio Denardin Costa**

**Bolsista Wilian Cardinal Brondani**

**Bolsista Cícero Mateus Sell**

**Bolsista João Junqueira**

**Bolsista Fernando Amarilho Silveira**

**Bolsista Pâmela Peres de Farias**

### 3.1. Caracterização do Problema

Espécies como azevém e aveia preta são amplamente usadas no Sul do país para garantir a alimentação dos rebanhos bovinos durante o outono e inverno, porém com qualidade nutricional muito abaixo do seu potencial, devido a problemas de manejo e adubação, principalmente. O azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) é uma gramínea cespitosa de clima temperado que apresenta metabolismo fotossintético de ciclo C<sub>3</sub>. Considera-se como origem a bacia do Mediterrâneo, onde foi trazido para o Brasil pelos colonos italianos (Floss, 1988).

A aveia- preta é uma gramínea que apresenta crescimento ereto, com época de semeadura de março a junho, sendo uma das espécies com maior potencial para produção de forragem, contribuindo, assim, significativamente para a produção animal na região sul do Brasil (Postiglioni, 1996). Considera-se como centro de origem a Europa ocidental e foi introduzida no Brasil, provavelmente pelos espanhóis, visto que a aveia era amplamente utilizada para a alimentação de cavalos ainda no século XVII (Coffman, 1977).

Resultados de pesquisa (Lesama, 1997; e Roso, et al., 1998) demonstram que a mistura de aveia preta e azevém apresenta elevado potencial de produção animal, quando se utilizam manejo adequado e adubação nitrogenada. Considerando-se que os custos de implantação destas pastagens são altos e, dependendo do nível de adubação nitrogenada, exigem alto investimento pelo produtor, é necessário que os recursos sejam usados de forma eficiente e sustentável. Os dados obtidos por Restle et al. (1993) demonstram bom retorno econômico da adubação nitrogenada nestas espécies.

No entanto, o manejo, a dose recomendada e a fonte de nitrogênio a ser utilizada têm grande importância no sucesso do investimento da adubação nitrogenada. Dentre os nutrientes essenciais ao crescimento e desenvolvimento das plantas, destaca-se o papel que o nitrogênio desempenha, como constituinte essencial dos aminoácidos, principais integrantes de proteínas. A adubação nitrogenada é um aspecto importante a ser considerado, pois o nitrogênio (N) na pastagem, além de proporcionar maior rendimento, permite a distribuição mais uniforme da forragem e um ciclo de produção maior (Heringer; Moojen, 2002) e com aumento na produção animal (Paris et al., 2009).



Em gramíneas a adubação nitrogenada apresenta grande importância, pois, o nitrogênio é um dos nutrientes que apresenta os efeitos mais relevantes no aumento da produção de grãos (Fernandes; Libardi; Trivelin, 2008), uma vez que é requerido em grandes quantidades e além da clorofila, compõe substâncias como proteínas, enzimas e ácidos nucleicos. No entanto, os fertilizantes nitrogenados amplamente utilizados na agricultura moderna são provenientes de combustíveis fósseis que são fontes não renováveis, e como Cantarella (2007) relata, tais fertilizantes são um dos insumos mais caros do custo de produção.

Assim, devido à crescente busca por sustentabilidade nos sistemas agrícolas de produção, alguns autores têm apresentado como forma alternativa para a economia de fertilizante nitrogenado, a fixação biológica de nitrogênio, a qual pode suplementar ou, até mesmo, substituir a utilização destes fertilizantes (Reis Júnior et al., 1998; Bergamaschi, 2006). A fixação biológica de nitrogênio é um processo de transformação do  $N_2$  na forma inorgânica combinada  $NH_3^{3+}$ , e a partir daí, em formas reativas orgânicas e inorgânicas. A reação de redução do  $N_2$  em  $NH_3^{3+}$  é realizada por microrganismos que contêm a enzima nitrogenase e são conhecidos como fixadores de  $N_2$  ou diazotróficos (Bergamaschi, 2006).

As bactérias do gênero *Azospirillum* são endofíticas facultativas e colonizam tanto o interior quanto a superfície das raízes, são plantas hospedeiras desta bactéria o trigo, arroz, sorgo e aveia (Bergamaschi, 2006). Além disso, vários autores têm verificado que o efeito estimulatório exercido por este gênero de bactérias tem sido atribuído a diversos mecanismos, sendo que além da fixação biológica de nitrogênio há que se considerar a produção de hormônios vegetais, produção de fitormônios, solubilização de fosfatos, antagonismo a fitopatógeno, entre outros (Mendonça; Urquiaga; Reis, 2006).

Nesse sentido, vários trabalhos com *Azospirillum* spp. têm demonstrado aumento no rendimento de massa seca e o acúmulo de nutrientes por plantas inoculadas (Reis Júnior et al., 2008). Entretanto, resultados da interação bactérias diazotróficas e milho em termos de potencial agrônomo, fixação de nitrogênio ou promoção do crescimento, depende de muitos fatores bióticos e ambientais, tais como genótipo da planta, comunidade microbiológica do solo e disponibilidade de nitrogênio (Roesch et al., 2006). Bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Azospirillum* colonizam a rizosfera de culturas com importância econômica

exercendo efeitos benéficos no crescimento das plantas, embora o mecanismo de colonização por espécies de *Azospirillum* não é claro (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

Atualmente, as cinco espécies são descritas: *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens* e *A. irakense* (Alexandre et al. 1999; Hauwaerts et al, 2002). A inoculação das plantas com *Azospirillum* pode resultar em significativa mudança em vários parâmetros de crescimento das plantas, os quais podem ou não podem afetar o rendimento. A inoculação com *Azospirillum* modifica a morfologia do sistema radicular pela produção de substâncias promotoras de crescimento, aumentando não apenas o número de radículas, mas também o diâmetro das raízes laterais e adventícias, ampliando assim o volume de solo explorado e promovendo conseqüentemente ganhos em rendimento. Foi relatado aumento na quantidade de nitrogênio total, peso de grãos, taxas de germinação, massa seca, o aumento da densidade e comprimento de pelos radiculares (Kapulnik et al, 1981;. Bashan & Levanony, 1990; Okon & Vanderleyden, 1998; Jofre et al.1998; Dalla Santa et al, 2004). O crescimento das plantas, determinado por *Azospirillum*, foi demonstrado em campo e casa de vegetação (Sumner, 1990).

A colonização da superfície radicular da planta pela bactéria é depende da quimiotaxia para exsudatos radiculares (Bashan & Levanony, 1990; Creus et al. 1996; Bashan & Holguín, 1997; Hauwaerts et al, 2002). Aumentos de rendimento têm sido atribuídos a mecanismos como a fixação de nitrogênio, redução de nitrato, proteção contra microrganismos e de plantas (Barbieri et al, 1986.; Fullchieri & Frioni, 1994; REIS et al, 2000;. Fischer et al, 2003). Em vários experimentos em campo, com diferentes culturas, encontraram aumentos dos grãos rendimento após a inoculação com diferentes estirpes da bactéria *Azospirillum*. (Rao, 1981; Sumner, 1990; Didonet et al., 1996).

O efeito sobre o aumento rendimento em geral variou entre 5 e 30%. No entanto, os efeitos relatados na produção, devido à inoculação de bactérias, muitos efeito positivo ou negativo, do resultado de inoculação foram raramente relatada (Bashan & Levanony, 1990; Sumner, 1990; Bashan & Holguin, 1997). Devido à escassez de informações sobre o manejo adequado da inoculação de *Azospirillum brasilense* em azevém e aveia preta, associado ou não a adubação nitrogenada, foi planejado este projeto.

## Objetivos e Metas

### Geral:

- Avaliar a inoculação com *Azospirillum brasilense* sobre o potencial produtivo de azevém e aveia-preta.

### Específicos:

- Determinar o efeito da inoculação sobre ao crescimento de azevém e aveia-preta;
- Determinar doses de aplicação de nitrogênio em plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense*;
- Determinar as características morfológicas em plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense*;
- Determinar o potencial produtivo em plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense*;
- Contribuir para o embasamento científico do manejo forrageiro local;
- Minimizar o impacto ambiental através da técnica de inoculação.

### Metas:

- Definir técnicas de manejo para a cultura do azevém e aveia-preta em plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense*.
- Obter informações que possam servir de subsidio para pesquisadores e produtores;
- Contribuir para o progresso científico da área de pastagem do país.

### 3.2. Metodologia e Estratégia de ação

Dois experimentos serão conduzidos na Universidade Federal de Pelotas, localizada no município de Capão do Leão, (31° 48' S e 52° 24' W), região Sul do estado, primeiro em casa de vegetação e o segundo em campo. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é do tipo subtropical úmido (Cfa), com precipitação uniforme e bem distribuída ao longo do ano e temperaturas no mês mais frio entre -3 e 18°C. O primeiro experimento será realizado em casa de vegetação da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel em Capão do Leão/RS usando, azevém (*Lolium multiflorum* LAM.) cv. "BRS Ponteio". O experimento será constituído por 10 tratamentos (T<sub>1</sub>: Com inoculação e sem Nitrogênio; T<sub>2</sub>: Com inoculação e 25% de N recomendado na base e em cobertura; T<sub>3</sub>: Com inoculação e 50% de N recomendado na Base e em cobertura; T<sub>4</sub>: Com inoculação e 75% de N recomendado na base e em cobertura; T<sub>5</sub>: Com inoculação e 100% de N recomendado na base e em cobertura; T<sub>6</sub>: Sem inoculação e sem Nitrogênio; T<sub>7</sub>: Sem inoculação e 25% de N na Base e em cobertura; T<sub>8</sub>: Sem inoculação e 50% de N recomendado na base e em cobertura; T<sub>9</sub>: Sem inoculação e 75% de N recomendado na base e em cobertura; T<sub>10</sub>: Sem inoculação e 100% de N recomendado na base e em cobertura) e quatro repetições com delineamento inteiramente casualizado. As unidades experimentais correspondem aos vasos com capacidade de 2,43 dm<sup>3</sup> com cinco plantas de azevém, totalizando quarenta vasos. Os vasos serão desinfetados com uma solução de hipoclorito de sódio à 2,5% e colocado para secar ao ar. O solo para preenchimento dos vasos será coletado na área experimental da Universidade Federal de Pelotas, localizada no município de Capão do Leão em área previamente não cultivada. Para análise do solo, amostras simples serão retiradas da camada de 0-20 cm e homogeneizadas, formando a amostra composta e enviando para o laboratório de análise de solos da UFPel. O resultado da análise do solo, caracterizado o solo como Planossolo Háplico Eutrófico Solódico pertencente a unidade de mapeamento Pelotas (Streck et al., 2008) esta descrito: Argila= 17%; pH= 4,90; SMP= 6,0; Matéria Orgânica= 1,70%; Fósforo= 1,20 mg/dm<sup>3</sup>; Potássio= 30 mg/dm<sup>3</sup>; saturação por base: 27%, CTC efetiva: 3,2 cmolc/dm<sup>3</sup>. O solo será peneirado, seco ao ar, destorroado e acondicionado nos vasos sendo realizada a adubação conforme análise de solo e recomendação do

ROLAS,2004. A adubação de base, em cada vaso, constituirá de aplicação de 120 Kg.ha<sup>-1</sup> super fosfato triplo (42% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e 180 Kg.ha<sup>-1</sup> de cloreto de potássio (60% de K<sub>2</sub>O) e 20 Kg.ha<sup>-1</sup> ureia (45% de N) (nos tratamentos com fertilizante nitrogenado), de acordo com cada tratamento (20 Kg.ha<sup>-1</sup> para o tratamento com 100% de N, 15 Kg.ha<sup>-1</sup> para o tratamento com 75% de N, 10 Kg.ha<sup>-1</sup> para o tratamento com 50% de N, 05 Kg.ha<sup>-1</sup> para o tratamento com 25% de N). Os adubos serão pesados em balança de precisão, macerados e incorporado à 5 cm de profundidade, o adubo nitrogenado será diluído em 40 mL de água destilada e aplicado no momento da semeadura. A semeadura será feita com 20 sementes por vaso à uma profundidade de 3 cm, será feito desbaste quando a planta elongar a primeira folha mantendo-se quatro plantas por vaso. Para o cálculo de quantidade de adubo que será colocado nos vasos, será considerado 2000 toneladas.ha<sup>-1</sup> de solo, onde cada vaso terá 3 Kg de solo. O segundo experimento será realizado em campo na unidade experimental da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel em Capão do Leão/RS usando, azevém (*Lolium multiflorum* LAM) cv. "BRS Ponteio" e Aveia preta (*Avena strigosa* Schreb) utilizando os dois melhores tratamentos com inoculação utilizados no primeiro experimento. O experimento será constituído por seis tratamentos (T<sub>1</sub>: sem inoculação e sem Nitrogênio; T<sub>2</sub>: sem inoculação e porcentagem de N (% correspondente ao primeiro melhor tratamento) recomendado na base e em cobertura; T<sub>3</sub>: sem inoculação e porcentagem de N (% correspondente ao segundo melhor tratamento) recomendado na Base e em cobertura; T<sub>4</sub>: com inoculação e sem Nitrogênio; T<sub>5</sub>: com inoculação e porcentagem de N (% correspondente ao primeiro melhor tratamento) recomendado na base e em cobertura; T<sub>6</sub>: com inoculação e porcentagem de N (% correspondente ao segundo melhor tratamento) recomendado na Base e em cobertura. O experimento será conduzido no delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições. Cada unidade experimental será constituída de 11 linhas de cultivo de 3 m espaçadas em 17 cm entre linhas perfazendo uma área de 1,87 m<sup>2</sup> e área útil de 0,68 m<sup>2</sup>. Como área útil será considerada as 04 linhas centrais excluindo 1 metro de cada ponta da parcela como bordadura. Cerca de 30 dias antes da semeadura será realizada dessecação com 03 L.ha<sup>-1</sup> de *glyphosate*. A semeadura será realizada com semeadora tratorizada em sistema de plantio direto com densidade de 25 Kg.ha<sup>-1</sup> e 60 Kg.ha<sup>-1</sup> de sementes viáveis de azevém e aveia-preta, respectivamente. Para os

experimentos, as sementes de azevém, serão inoculadas com o produto comercial MASTERFIXL<sup>®</sup> Gramíneas na dose de 300 mL.ha<sup>-1</sup> segundo recomendação do fabricante para garantir a inoculação em todas as sementes nos solos onde nunca foi feita inoculação com esta bactéria. Para realizar a inoculação será feita diluição em água destilada, a mistura será cuidadosamente realizada para garantir a perfeita distribuição do inoculante líquido nas sementes. Este inoculante contém estirpes de *Azospirillum brasilense* em concentração mínima de 2x10<sup>8</sup> células viáveis mL<sup>-1</sup>. As sementes serão tratadas e semeadas imediatamente. Para o experimento em casa de vegetação a adubação de base será realizada diluindo a quantidade de nitrogênio recomendado, em água destilada e aplicado sobre o solo imediatamente após a semeadura, já para o experimento em campo a adubação de base será feita pelo advento da semeadura tratorizada. A adubação nitrogenada de cobertura, no experimento em casa de vegetação, com ureia (45% de N) (nos tratamentos com fertilizante nitrogenado), será realizada quando as plantas tiverem no estágio fenológico de perfilhamento com 80 Kg.ha<sup>-1</sup>, de acordo com cada tratamento (80 Kg.ha<sup>-1</sup> para o tratamento com 100% de N, 60 Kg.ha<sup>-1</sup> para o tratamento com 75% de N, 40 Kg.ha<sup>-1</sup> para o tratamento com 50% de N, 20 Kg.ha<sup>-1</sup> para o tratamento com 25% de N), diluindo-se a quantidade recomendada em água destilada e, para os experimentos em campo a aplicação de adubação nitrogenada será feita à lanço seguindo a recomendação de adubação.

### 3.3. Variáveis analisadas

Em cada corte, será determinado os índices de clorofila utilizando-se um clorofilômetro da marca comercial ClorofiLOG<sup>®</sup> modelo CFL 1030, produzido pela Falker automação agrícola. Este aparelho possui diodos que emitem luz, e esta passa através da amostra da folha atingindo um receptor (fotodiodo de silício) que converte a luz transmitida em sinais elétricos analógicos. A partir desse dado, o aparelho fornece valores de leitura proporcionais à absorbância das clorofilas a, b e total (a + b) (Falker, 2008). As leituras serão realizadas na última folha completamente expandida de cada planta (duas leituras por planta) Pocojeski et.al (2007). As raízes e a parte aérea das plantas serão secas em estufa de ventilação forçada a 68°C até peso constante, sendo após pesados para determinação da massa seca. Após secagem, os sacos serão pesados em balança digital. O fósforo

será determinado depois que as amostras serão desidratadas em estufa de ventilação forçada (Malavolta et al., 1989). Uma vez desidratado, o material será pesado para a determinação da matéria seca e, em seguida, as amostras serão moídas em moinho tipo Willey, passadas em peneira de 20 “mesh” e armazenadas em frascos hermeticamente fechados. Após submeter o material vegetal à oxidação pela digestão sulfúrica, será determinado o fósforo por colorimetria, pelo método do molibdato (Malavolta et al., 1989). Para quantificação de N, as amostras passarão pelos processos de digestão sulfúrica, destilação e titulação, segundo metodologia de Tedesco et al. (1995). A determinação do volume de raízes das plantas será realizada logo após o último corte. As raízes serão lavadas, secas com papel absorvente e submersas em proveta contendo 100 mL de solução de água destilada com álcool 70%, na proporção 4:1. O volume será determinado pela diferença entre os volumes inicial e final do recipiente. Pela diferença, obtém-se a resposta direta do volume de raízes, pela equivalência de unidades ( $1 \text{ ml} = 1 \text{ cm}^3$ ), segundo metodologia descrita por Basso (1999). Utilizando-se os dados da massa seca da parte aérea (MSA) e da raiz (MSR), será determinada a taxa de crescimento (TC) em mg/x dias, de acordo com Benincasa (1988), conforme a equação abaixo.

$$TC = \frac{P_2 - P_1}{T_2 - T_1}$$

onde:  $P_2 - P_1$  = pesos da matéria seca em duas avaliações sucessivas;  $T_2 - T_1$  = variação no tempo. A eficiência da adubação nitrogenada será expressa em Kg de MS produzida por Kg de N aplicado, admitindo-se que a contribuição do N do solo foi semelhante nos tratamentos que receberam N e na testemunha. Por isto, no cálculo da eficiência dos tratamentos que receberam N será subtraída a produção da testemunha. A recuperação do N pela pastagem será calculada com base na produção total de MS e o teor de N, obtendo-se desta forma, a estimativa da quantidade total de N absorvido pelas plantas. A recuperação de N será calculada pela seguinte fórmula:

$$NR(\%) = \frac{(NCT - NST)}{NF} \times 100$$

onde: NR = % de N recuperado; NCT = N absorvido com o tratamento; NST = N absorvido sem o tratamento; e NF = N fornecido (doses de N). Sempre que as plantas alcançarem 20 cm de altura será cortado deixando-se um resíduo de 10 cm. Os procedimentos de avaliação a cada corte serão realizados conforme a

metodologia proposta por Moliterno (2002): altura da pastagem, massa total de matéria seca, composição botânica. Após a separação botânica as folhas e colmos serão secados separadamente, para posterior pesagem de matéria seca de folha e colmo. A área foliar das lâminas verdes será medida em aparelho integrador de área foliar. As características morfogênicas e estruturais da pastagem serão avaliadas pela técnica de “perfilhos marcados”, conforme metodologia detalhada por CARRÈRE et al., (1997), sendo que em cada unidade experimental será marcado com fio colorido quatro perfilhos. A cada avaliação será medido com régua graduada o comprimento do perfilho ou ramo e a altura da planta de cada espécie. Além disto, será contabilizado o número de folhas mortas (NFM), o número de folhas senescentes (NFS) e o número de folhas vivas (NFV = soma das folhas completamente expandidas com as folhas em expansão).

### **3.4 Resultados e Impactos esperados**

Espera-se, com este estudo, avaliar a curva de produção das espécies, bem como sua adaptação ao ecossistema em questão. Tais informações servirão como subsídio para o planejamento de sistemas forrageiros e indicação de novas forma de manejo de pastagens de inverno.

A orientação de práticas de manejo produtivo, e conservacionista, mais adequadas visam à preservação e perenidade dos recursos naturais bem como a sustentabilidade ambiental, social e econômica.

Simultaneamente aos objetivos científicos do projeto, espera-se inserir a comunidade acadêmica dos diferentes níveis de ensino nas práticas de pesquisa, demonstrando sua importância na formação profissional, pessoal e no desenvolvimento de um determinado setor produtivo agrícola.

Contribuir para o progresso científico da área de forragicultura, através da publicação dos resultados em periódicos de impacto, e apresentação em congressos técnico-científicos da área.





### 3.5. Orçamento

| <b>Descrição</b>             | <b>Unidade</b> | <b>Quantidade</b> | <b>Valor Unitário (R\$)</b> | <b>Sub Total (R\$)</b> |
|------------------------------|----------------|-------------------|-----------------------------|------------------------|
| Adubo – Fertilizante         | Kg             | 01                | 60,00                       | 60,00                  |
| Análise de Solo              | Laudo          | 01                | 30,00                       | 30,00                  |
| Análise laboratorial         | Laudo          | 03                | 400                         | 1200,00                |
| Estacas                      | Un.            | 200               | 1,00                        | 200,00                 |
| Ureia                        | Kg             | 02                | 60,00                       | 120,00                 |
| Sementes                     | Kg             | 20                | 12,50                       | 250,00                 |
| Agroquímicos                 | L              | 04                | 50,00                       | 200,00                 |
| Combustíveis e Lubrificantes | L              | 50                | 4,00                        | 200,00                 |
| Sacaria Papel                | Sc             | 350               | 0,15                        | 52,50                  |
| Sacaria Plástico             | Sc             | 150               | 0,35                        | 52,50                  |
| Material Escritório          | Kit            | 01                | 80,00                       | 80,00                  |
| <b>Total</b>                 |                |                   |                             | <b>2.445,00</b>        |

### 3.6. Referências Bibliográficas

- ALEXANDRE G.; RENÉ R.; RENÉ B. A phase variant of *Azospirillum lipoferum* lacks a polar flagellum and constitutively expresses mechanosensing lateral flagella. ***Applied and Environmental Microbiology***, v. 65, p. 4701-4704, 1999.
- BARBIERI P.; ZANELLI T.; GALLI E.; ZANETTI G. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. ***Microbiology Letters***, v. 36, p. 87-90, 1986.
- 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.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. ***Canadian Journal of Microbiology***, v. 36, p.591-603, 1990.
- BASSO, S.M.S. **Caracterização morfológica e fixação biológica de nitrogênio de espécies de *Adesmia* DC. e *Lótus* L.** Porto Alegre: UFRGS, 1999. 268 p. (Tese doutorado)
- BENINCASA, M.M.P. **Análise do crescimento de plantas.** Jaboticabal: FUNEP, 1988. 42p.
- BERGAMASCHI, C. **Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas às raízes e colmos de cultivares de sorgo.** 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B. & NEVES, J.C.L., eds. **Fertilidade do solo. Viçosa**, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.375-470.
- CARRÈRE, P.; LOUAULT, F.; SOUSSANA, J.F. Tissue turnover within grass-clover mixed swards grazed by sheep. Methodology for calculating growth, senescence and intake fluxes. ***Journal of Applied Ecology***, v.34, p.333-348, 1997.
- COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO-RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.** 10.ed. Porto Alegre: SBCS/CQFS, 2004. 400p.
- COFFMAN, F. A. **Oat history, identification and classification.** Washington: United States Department Agriculture, 1977. 364p. (Technical Bulletin nº 1516).
- CREUS C.M.; SUELDO R.J.; BARASSI C.A. *Azospirillum* inoculation in pregerminating wheat seeds. ***Canadian Journal of Microbiology***, v. 42, p. 83-86, 1996.
- DALLA SANTA, O.R.; FERNÁNDEZ, R.; MICHELENA, G.; RONZELLI Jr., P.; SOCCOL, C.R. *Azospirillum* sp. Inoculation in wheat, barley and oats seeds in greenhouse experiments. ***Brazilian Archives of Biology and Technology***, v. 47, p. 843-849, 2004a.

DIDONET, A.D.; RODRIGUES, O.; KENNER, M.H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, p.645-651, 1996.

FERNANDES, F. C. S.; LIBARDI, P. L.; TRIVELIN, P. C. O. Parcelamento da adubação nitrogenada na cultura do milho e utilização do N residual pela sucessão aveia preta - milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 4, p. 1138-1141, 2008.

FISCHER S.E.; MIGUEL M.J.; MORI G.B. Effect of root exudates on the exopolysaccharide composition and the lipopolysaccharide profile of *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress. **FEMS Microbiology Letters**, v. 219, p. 53-62, 2003.

FLOSS, E.L. **Manejo forrageiro da aveia (*Avena spp*) e azevém (*Lolium spp*)**. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 1988, Piracicaba. Anais... Piracicaba: FEALQ, 1988. p.231-268.

FULCHIERI M.; FRIONI L. *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): Effect on yield in a field experiment in central Argentina. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, p. 921-923, 1994.

HAUWAERTS D.; ALEXANDRE G.; DAS S.K.; VANDERLEYDEN J.; ZHULIN I.B. A major chemotaxis gene cluster in *Azospirillum brasilense* and relationships between chemotaxis operons in alfa-proteobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 208, p. 61-67, 2002.

HERINGER, I.; MOOJEN, E.L. Potencial produtivo, alteração da estrutura e qualidade da pastagem de milho submetida a diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.875-882, 2002.

JOFRÉ E.; FISCHER S.; RIVAROLA V.; BELEGNO H.; MORI G. Saline stress affects the attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to maize and wheat roots. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 416-422, 1998.

Kapulnik Y, Kigel J, Okon Y, Nur I, Henis Y. Effect of *Azospirillum* inoculation on some growth parameters and N content of wheat, sorghum and *Panicum*, **Plant and Soil**. 63: 627-631.1981

Kapulnik Y, Okon Y, Kigel J, Nur I, Henis Y (1981a). Effect of temperature, nitrogen fertilization and plant age on nitrogen fixation by *Setaria italica* inoculated with *Azospirillum brasilense* (strain Cd). **Plant Physiology** 68: 340-343.1981

LESAMA, M.F. **Produção animal em gramíneas de estação fria com fertilização nitrogenada ou associadas com leguminosa, com ou sem fertilização nitrogenada**. Santa Maria: UFSM, 1997. 129p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, 1997.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, A.S. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 1989. 201p.

Markwell, J.; Osterman, J. C.; Mitchell, J. L. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. **Photosynthesis Research**, v.46, p.467- 472, 1995.

MENDONÇA, M. M.; URQUIAGA, S. S.; REIS, V. M. Variabilidade genotípica de milho para acumulação de nitrogênio e contribuição da fixação biológica de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1681-1685, 2006.

MOLITERNO, E.A. Variables básicas que definen el comportamiento productivo de mezclas forrajeras en su primer año. **Agrociencia**, v.6, n.1, p.40-52, 2002.

OKON Y.; VANDERLEYDEN J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **Features**, v. 63, p. 366–370, 1998.

PARIS, W.; CECATO, U.; BRANCO, A. F.; BARBERO, L. M.; GALBEIRO, S. Produção de novilhas de corte em pastagem de Coastcross-1 consorciada com *Arachis pintoi* com e sem adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, n. 1, p. 122-129, 2009

POCOJESKI, E.; SILVA, L.S.; MARCHESAN E.; GRAUPE, F.A.; BRITZKE, D. **Nível de nitrogênio em cultivares de arroz irrigado: uso do clorofilômetro e da cartela de cores**. Anais... XXX Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. Gramado, RS, 2007.

POSTIGLIONI, S. R. **Forragicultura no Paraná: azevém anual**. Londrina: Comissão Paranense de Avaliação de Forrageiras, 1996. 231 p.

RAO N.S.S. Response of crops to *Azospirillum* inoculation in India. In VOSE, P.B.; RUSCHEL, A.P. (Eds): *Associative N<sub>2</sub>-Fixation*. CRC Press, Florida, pp. 137–144, 1981.

REIS JUNIOR, F. B. dos; MACHADO, C. T. de 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, MG, v. 32, n. 3, p. 1139- 1146, 2008.

REIS JÚNIOR, F. B.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; MACHADO, A. T. **Seleção de genótipos de milho e arroz mais eficientes quanto ao ganho de N através de fixação biológica de N<sub>2</sub>**. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia, nov. 1998. 23 p. (Documento, n. 73).

REIS V.M.; BALDANI J.I.; BALDANI V.L.D.; DOBEREINER J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Plant Science**, v. 19, p. 227-274, 2000.

RESTLE, J., LUPATINI, G.C., VALENTE, A.V. et al. Avaliação da mistura de aveia preta (*Avena strigosa*) e azevém (*Lolium multiflorum*) sob pastejo submetida a níveis de nitrogênio. Produção animal. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 30, 1993, Rio de Janeiro. Anais... Viçosa: SBZ, 1993. p.71.

ROESCH, L. F. W.; OLIVARES, F. L.; PASSAGLIA, L. P. M.; SELBACH, P. A.; SÁ, E. L. S de; CAMARGO, F. A. O. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 22, n. 9, p. 967-974, 2006.

ROSO, C., RESTLE, J., SOARES, A.B. 1999. Produção e qualidade de forragem da mistura de gramíneas anuais de estação fria sob pastejo contínuo. **Revista brasileira de zootecnia**, 28(3):459- 467.

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

STRECK, E.V.; KÄMPF, N.; DALMOLIN, R.S.D.; KLAMT, E.; NASCIMENTO, P.C. do; SCHNEIDER, P.; GIASSON, E.; PINTO, L.F.S. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2.ed. revisado e ampliado Porto Alegre: Emater/RS, 2008. 222p.

SUMNER M.E. Crop responses to *Azospirillum inoculation*. In STEWART, B.A (Ed): **Advances in Soil Science**. Springer-Verlag, New York, pp. 52-123, 1990.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H. & VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 147p. (Boletim Técnico, 5)

## 4. RELATÓRIO DE TRABALHO DE CAMPO

### 4.1 Local

O experimento foi conduzido em casa de vegetação (31°45'48"S e 52°29'02"W), pertencente à Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, campus Capão do Leão, RS.

### 4.2 Solo

Em de abril de 2013 foi realizada a coleta de solo no CAP (Centro Agropecuário da Palma), e avaliada no Laboratório de Análise de Solo no Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/UFPel. O resultado da análise do solo, caracterizado o solo como Planossolo Háplico Eutrófico Solódico pertencente a unidade de mapeamento Pelotas (Streck et al., 2008) está descrito: Argila= 17%; pH= 4,90; SMP= 6,0; Matéria Orgânica= 1,70%; Fósforo= 1,20 mg/dm<sup>3</sup>; Potássio= 30 mg/dm<sup>3</sup>; saturação por base: 27%, CTC efetiva: 3,2 cmolc/dm<sup>3</sup>.

### 4.3 Tratamentos e delineamento experimental

Em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, a cultivar de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) BRS Ponteio foi submetida a 10 tratamentos experimentais, provenientes da combinação da presença, ou ausência, de inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* com cinco níveis de adubação nitrogenada (0, 25, 50, 75 e 100%) da dose recomendada pela da Comissão de Química e Fertilidade do solo (CQFS, 2004).

### 4.4 Adubação e calagem

Na semeadura foi aplicado o equivalente a 120 Kg.ha<sup>-1</sup> de superfosfato triplo, 180 Kg.ha<sup>-1</sup> de cloreto de potássio e, até, 44,44 Kg.ha<sup>-1</sup> de ureia (de acordo com o tratamento de adubação nitrogenada), 20% seguindo as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo (2004) para gramíneas forrageiras anuais de estação fria.

O cálculo foi realizado considerando-se que em 1ha de solo (20 cm de camada arável e densidade de  $1\text{g.cm}^{-3}$ ) estão contidas 2.000 t de solo. A partir daí, por regra de três, calculou-se a quantidade de adubo a ser colocada em cada vaso com 3,0 Kg de solo (considerada uma densidade de  $1\text{g.cm}^{-3}$ ). O valor de fertilizante a ser incorporado ao solo foi multiplicado por quatro (quatro vezes a quantidade recomendada) no qual a dose foi macerada para a aplicação uniforme no solo e que fosse maximizada a absorção. O valor de corretivo não sofreu essa multiplicação, sendo corrigido para pH 5,50.

#### **4.5 Duração do experimento**

O período experimental teve início em 04/06/2013 e foi finalizado em 21/10/2013, totalizando 139 dias. Em 14/09, 05/09, 02/10 e 21/10/2013 foram realizados os cortes.

#### **4.6 Instalação e condução do experimento**

A semeadura foi realizada em 04/06/2013, utilizando-se 20 sementes por vaso à profundidade de 03 cm. Por ocasião do aparecimento da primeira folha completamente expandida, foi realizado o raleio das plantas, deixando-se quatro por vaso. Após o surgimento do perfilho secundário, foi marcado, com fio colorido, o perfilho a ser avaliado (perfilho primário), representativo do vaso, utilizando-se a técnica dos “perifilhos marcados” (Carrère et al., 1997).

Sempre que as plantas atingiam 20 cm de altura foram realizados cortes e mensuradas as seguintes variáveis: altura de planta estendida (do substrato até a extremidade da folha mais alta com a planta esticada), número de perfilhos por vaso, número de folhas em expansão/perfilho (aquelas que ainda não expuseram a lígula), número de folhas expandidas/perfilho (aquelas que já expuseram a lígula), número de folhas senescentes/perfilho e número de folhas mortas. O somatório do número de folhas em expansão e expandidas originou o número de folhas vivas/perfilho. As folhas com mais de 50% de senescência foram consideradas mortas.



#### **4.7 Análise estatística**

Os dados das variáveis obtida através das médias dos cortes por cultivar, foram submetidas a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), Para as análises utilizou-se procedimentos do pacote estatístico SAS (Statistical Analysis System®), versão 9.0.

**ARTIGO I**

**ADUBAÇÃO NITROGENADA ASSOCIADA À INOCULAÇÃO COM *Azospirillum  
brasilense* EM RELAÇÃO CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DE AZEVÉM  
ANUAL**

**ARTIGO DE QUALIFICAÇÃO DE TESE**

Normas de publicação da revista Pesquisa Agropecuária tropical.

**PAT - e-ISSN 1983-4063**

**Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* em relação características estruturais de azevém anual**

Nitrogen fertilization associated to inoculation with *Azospirillum brasilense* about structural characteristics of annual ryegrass

**RESUMO:**

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inoculação com *Azospirillum brasilense*, cepas AbV5 e AbV6, associada a diferentes níveis de adubação nitrogenada (0, 25, 50, 75 e 100 Kg.ha<sup>-1</sup>) sobre as características estruturais de plantas de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), totalizando dez tratamentos, em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, a cultivar de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) BRS Ponteio. As unidades experimentais corresponderam a vasos com capacidade de 2,43 dm<sup>3</sup>, totalizando quarenta vasos. O adubo nitrogenado foi diluído em 40 mL de água destilada e aplicado no momento da semeadura (20%), sendo a adubação de cobertura, 80% realizada no perfilhamento. As sementes de azevém foram inoculadas com o produto comercial MASTERFIXL<sup>®</sup> Gramíneas, na dose de 300 mL.ha<sup>-1</sup>. Foram analisadas as seguintes variáveis (altura de planta estendida, número de perfilhos/vaso, número de folhas em expansão/perfilho, número de folhas expandidas/perfilho, número de folhas senescentes/perfilho, número de folhas mortas, relação folha:colmo a área foliar). A adubação nitrogenada aumenta linearmente as características estruturais área foliar, relação folha:colmo e número de perfilhos de azevém. A adubação nitrogenada aumenta a área foliar, relação folha:colmo e o número de perfilhos de azevém. A inoculação com *Azospirillum brasilense* aumenta o perfilhamento do azevém, com no mínimo, 50 Kg.ha<sup>-1</sup> da adubação nitrogenada recomendada.

**PALAVRAS-CHAVES:** bactérias diazotróficas, doses de nitrogênio, fixação biológica de nitrogênio, *Lolium multiflorum*, rizobactérias.

**ABSTRACT:**

The goal of this study was to evaluate the effects of inoculation with *Azospirillum brasilense*, strains AbV5 e AbV6, associated with different levels of nitrogen fertilization (0, 25, 50, 75 e 100%) on the structural characteristics of ryegrass plants (*Lolium multiflorum* Lam.), totaling den treatments, a completely randomized design with four replications, to cultivate ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) BRS Ponteio. The experimental units correspond to vessels with a capacity of 2.43 dm<sup>3</sup>, in a total of forty vessels. Nitrogen fertilizer was diluted in 40 ml of distilled water and applied at planting (20%), and the fertilization coverage, 80% it was held at tillering. The ryegrass seeds were inoculated using the commercial product MASTERFIXL® Gramíneas at a dose of 300 mL.ha<sup>-1</sup>. Following variables were analyzed (extended plant height, number of tillers/vessel, number of leaves in expansion/tiller, number of expanded leaves/tiller , number of senescent leaves/tiller, number of dead leaves, leaf: stem ratio and leaf area). Nitrogen fertilization increases linearly the structural characteristics of leaf area, leaf:stem ratio, and number of tiller ryegrass. Inoculation using *Azospirillum brasilense* increases tillering ryegrass, with at least 50 Kg.ha<sup>-1</sup> of the recommended nitrogen fertilization.

**KEYWORDS:** *Lolium multiflorum*, nitrogen dosage, biological nitrogen fixation, rhizobacteria, diazotrophic bacteria.

## INTRODUÇÃO

O azevém anual é uma espécie amplamente utilizada no sul do Brasil como forrageira de alto valor nutritivo para o período hibernar. É uma gramínea adaptada às condições edafoclimáticas da região, que possui alta capacidade de rebrote e de produção de forragem, muito presente nos diferentes sistemas produtivos (Pedroso et al., 2004, Cauduro, 2005).

Dentre as práticas de manejo do azevém, se destaca a adubação nitrogenada como importante trato cultural, pois sua aplicação, além de proporcionar maior rendimento forrageiro, permite a distribuição uniforme da produção e um ciclo produtivo mais prolongado (Heringer & Moojen, 2002). O nitrogênio é um dos nutrientes que apresenta o efeito mais relevante no aumento da produção, sendo também o mais limitante na produção vegetal (Malavolta, 1980), uma vez que é requerido em grandes quantidades. Além da clorofila, o nitrogênio compõe substâncias como proteínas, enzimas e ácidos nucleicos.

Os fertilizantes nitrogenados amplamente utilizados na agricultura são oriundos de combustíveis fósseis, de fontes não renováveis, e como Cantarella (2007) relata, são os que causam maior impacto no custo de produção da cultura do azevém.

Nesse contexto, a utilização de organismos capazes de fixar o nitrogênio atmosférico se configura como alternativa sustentável e viável, para suprir este importante nutriente requerido pelos vegetais.

Entre os organismos fixadores de nitrogênio atmosférico destacam-se as bactérias conhecidas como *Rhizobium*, que estabelecem simbiose com raízes de leguminosas. Neste caso, existe fina sintonia entre a planta hospedeira e o *Rhizobium* específico, com formação de estruturas típicas das raízes, os nódulos, onde as bactérias ficam alojadas e realizam o processo de captura e fixação do nitrogênio atmosférico (Fernandes Júnior et al., 2012).

Além das bactérias fixadoras que ocorrem na superfície de raízes, têm sido identificadas várias espécies de bactérias, do gênero *Azospirillum*, que ocorrem na rizosfera de várias plantas, especialmente gramíneas forrageiras e cereais (Döbereiner, 1992). Estas colonizam o sistema radicular e promovem o crescimento vegetal, sendo denominadas rizobactérias promotoras de crescimento vegetal.

Bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* spp. são consideradas promotoras de crescimento, devido à sua capacidade de estimular o crescimento das plantas pela produção de fitormônios, redução do potencial de membrana das raízes, síntese de enzimas, solubilização de fosfato inorgânico e mineralização de fosfato orgânico. Indiretamente, promovem o crescimento vegetal reduzindo ou prevenindo a ação de microrganismos patogênicos (Rodriguez & Fraga, 1999). Segundo Alvarez et al. (1996), as bactérias do gênero *Azospirillum*, além de fixadoras assimbióticas de nitrogênio, também são consideradas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas comumente associadas com raízes de cereais. Todavia, mesmo após décadas de estudos, a adoção dessa tecnologia nos sistemas agrícolas ainda é incipiente.

O principal entrave à introdução do *Azospirillum* na cultura do azevém é a imprevisibilidade e inconsistência dos resultados de pesquisa, os quais podem variar de acordo com o genótipo, condições edafoclimáticas e metodologia de condução do ensaio. Assim, os estudos relatam que a contribuição dessa bactéria para a produção forrageira têm mostrado resultados contrastantes (Hungria et al., 2010; Bartchechen et al., 2010, Godoy et al., 2011)

Recentemente, têm sido introduzidos no Brasil inoculantes contendo cepas de *Azospirillum*, havendo, contudo, carência de informações relativas ao seu potencial agrônomo e retorno econômico, especialmente quando utilizado em pastagens.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inoculação com *Azospirillum brasilense* associada a diferentes níveis de adubação nitrogenada sobre as características estruturais de plantas de azevém.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, campus Capão do Leão (31°45'48"S e 52°29'02"W), RS, com temperatura média anual de 22 °C.

Em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, a cultivar de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) BRS Ponteio (ciclo longo) foi submetida a 10 tratamentos experimentais, provenientes da combinação da presença ou ausência, de inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* cepas AbV5 e AbV6 com cinco níveis de adubação nitrogenada (0, 25, 50, 75 e 100 Kg.ha<sup>-1</sup>) da dose recomendada pela da Comissão de Química e Fertilidade do solo (CQFS, 2004).

As unidades experimentais corresponderam a vasos com capacidade de 2,43 dm<sup>3</sup> com quatro plantas de azevém, totalizando quarenta vasos. Os vasos plásticos com drenos foram previamente desinfestados com solução contendo 40% de álcool (álcool 70%) + 20% de hipoclorito de sódio (2,5 %) e colocados para secar ao ar. Após secos, foram preenchidos com Planossolo Háplico Eutrófico solódico pertencente à Unidade de Mapeamento Pelotas (Strecket al., 2008). As características químicas do solo eram: Argila= 17%; pH= 4,90; SMP= 6,0; Matéria Orgânica= 1,70%; P= 1,20 mg/dm<sup>3</sup>; K= 30 mg/dm<sup>3</sup>; saturação por base: 27%, CTC efetiva: 3,2 cmolc/dm<sup>3</sup>.O solo foi peneirado, seco ao ar, destorroado e acondicionado nos vasos.

Para o cálculo de quantidade de adubo a ser adicionado, foi considerado 2000 ton.ha<sup>-1</sup> de solo, sendo que cada vaso comportou 3 Kg. A adubação foi realizada conforme análise de solo e recomendação da CQFS (2004). Na semeadura foi aplicado o equivalente a 120 Kg.ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 180 Kg.ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O e, até, 44,44 Kg.ha<sup>-1</sup> de ureia (de acordo com o tratamento de adubação nitrogenada), 20% da recomendação. O adubo fosfatado e o potássico foram pesados em balança de precisão, macerados e incorporados ao solo à 5 cm de profundidade. O adubo nitrogenado foi diluído em 40 mL de água destilada e aplicado no momento da semeadura. Nos tratamentos com adubação nitrogenada, a adubação de cobertura, até 177,78 Kg.ha<sup>-1</sup> de ureia (de acordo com o tratamento de adubação nitrogenada), 80% da recomendação, foi realizada no perfilhamento.

As sementes de azevém foram inoculadas com o produto comercial MASTERFIXL<sup>®</sup> Gramíneas, na dose de 300 mL.ha<sup>-1</sup>, dose recomendada pelo fabricante para garantir a inoculação das sementes em solos onde nunca foi realizada inoculação com esta bactéria. O produto foi diluído em água destilada e misturado às sementes, de modo a garantir a perfeita distribuição do líquido nas mesmas. Conforme o fabricante, o inoculante continha estirpes de *Azospirillum brasilense* em concentração mínima de 2x10<sup>8</sup> células viáveis.mL<sup>-1</sup>. As sementes tratadas foram semeadas imediatamente.

A semeadura foi realizada em 04/06/2013, utilizando-se 20 sementes por vaso à profundidade de 03 cm. Por ocasião do aparecimento da primeira folha completamente expandida, foi realizado o raleio das plantas, deixando-se quatro por vaso. Após o surgimento do perfilho secundário, foi marcado, com fio colorido, o perfilho a ser avaliado (perfilho primário), representativo do vaso, utilizando-se a técnica dos “perfilhos marcados” (Carrère et al., 1997).

Sempre que as plantas atingiam 20 cm de altura foram realizados cortes e mensuradas as seguintes variáveis: altura de planta estendida (do substrato até a extremidade



da folha mais alta com a planta esticada), número de perfilhos por vaso, número de folhas em expansão/perfilho (aquelas que ainda não expuseram a lígula), número de folhas expandidas/perfilho (aquelas que já expuseram a lígula), número de folhas senescentes/perfilho e número de folhas mortas. O somatório do número de folhas em expansão e expandidas originou o número de folhas vivas/perfilho. As folhas com mais de 50% de senescência foram consideradas mortas.

Para determinação da relação folha: colmo, após os cortes procedeu-se a separação das frações folhas e colmos que foram secas em estufa de ventilação forçada a 55°C até peso constante. As folhas, antes de serem secas foram avaliadas quanto a sua área em um integrador eletrônico de área foliar modelo Licor LI-2600.

Os cortes foram realizados sempre que as plantas atingiam 20 cm de altura, deixando-se resíduo de 07 cm no primeiro corte e 10 cm nos cortes subsequentes, para evitar que se eliminasse o ponto de crescimento do perfilho (Oliveira et al., (2014).

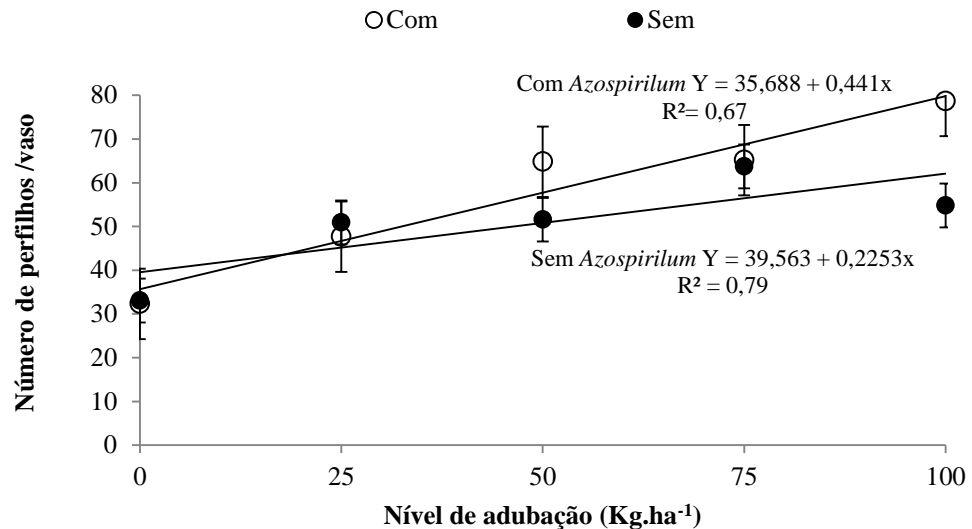
O primeiro corte foi realizado em 14/08/2013 (71 dias após a semeadura), o segundo em 05/09/2013 (22 dias após o primeiro corte), o terceiro em 02/10/2013 (27 dias após o segundo corte) e o quarto em 21/10/2013 (19 dias após o terceiro). Quando a maioria das plantas emitiu a inflorescência o experimento foi encerrado.

Os dados foram submetidos à análise de variância, regressão polinomial e ao teste de comparação de médias de Duncan ( $P < 0,05$ ). Para as análises utilizou-se o procedimento GLM do pacote estatístico SAS (Statistical Analysis System<sup>®</sup>), versão 9.0.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Observou-se efeito da interação entre os fatores *Azospirillum* e adubação nitrogenada no número de perfilhos e no comprimento de planta estendida. Em ambas houve aumento

linear dos valores com a elevação da adubação nitrogenada, todavia essa foi mais acentuada quando em presença da inoculação com *Azospirillum* (Figura 1).



**Figura 1.** Número de perfilhos de azevém (por vaso) submetido a inoculação ou não com *Azospirillum brasilense* e diferentes níveis de adubação nitrogenada. Pelotas, 2015.

O aumento no número de perfilhos com o acréscimo do nitrogênio sem a presença de *Azospirillum* (0,22 perfilhos por unidade percentual de adubação), embora significativo estatisticamente, foi pequeno, resultando em um coeficiente de determinação de baixa magnitude. Quando a adubação nitrogenada foi associada à inoculação de *Azospirillum* o incremento linear do número de perfilhos dobrou, sendo de 0,44 perfilhos por unidade de adubação (Figura 1).

Lemaire & Agnusdei (1999) afirmam que, quando os assimilados (carbono e nitrogênio) suprem a demanda para desenvolvimento foliar, a planta aumenta o número de meristemas ativos, aumentando assim a densidade de perfilhos e mantendo o crescimento das folhas, até mesmo no perfilho principal. Neste sentido, é possível verificar que houve adequado suprimento de nitrogênio quando a fixação biológica foi associada à adubação nitrogenada. O aumento do número de perfilhos também pode ser reflexo da maior área foliar

produzida com a elevação da adubação nitrogenada. Conforme Mazzanti et al. (1994), o efeito do nitrogênio no número de perfilhos é positivo. Todavia esse efeito depende da taxa de surgimento de folhas, uma vez que cada folha traz uma gema axilar que poderá desenvolver-se em novo perfilho. Segundo Confortin (2010), com o aparecimento de uma nova folha no perfilho, há concomitantemente o aparecimento de uma nova gema axilar. Influência positiva do nitrogênio sobre o número de perfilhos também foi encontrada por Garcez Neto et al. (2002). De acordo com esses autores, o aumento no número de perfilhos se deve à taxa de aparecimento de folhas, as gemas desenvolverão perfilhos em função da interação de vários outros fatores, como luz e nutrientes, especialmente como o nitrogênio.

É importante observar que a associação do *Azospirillum* com a adubação nitrogenada só se mostrou eficiente, na alteração do número de perfilhos, a partir do uso de 50 Kg.ha<sup>-1</sup> da dose de adubação recomendada (Tabela 1). Em doses inferiores, o efeito do *Azospirillum* não foi percebido, indicando a possível necessidade de um suprimento mínimo de nitrogênio através da adubação. Todavia, após ter a necessidade suprida há potencialização da resposta ao nitrogênio aplicado. A partir de 50 Kg.ha<sup>-1</sup> da adubação nitrogenada recomendada haveria o suprimento necessário para a planta, além do nitrogênio disponibilizado lentamente pelo *Azospirillum*, proporcionando melhor aproveitamento deste para a produção de novos perfilhos. Os resultados mostraram, ainda, que o maior número de perfilhos foi obtido com o uso da inoculação associado a maior dose de nitrogênio. Isso sugere que a resposta da planta não ocorre apenas em razão do N<sub>2</sub> fixado, mas, também pela maior eficiência de absorção de nitrogênio mineral do solo (Dobbelaere et al., 2003). Além disso, substâncias estimulantes do sistema radicular, tais como auxinas, podem ser liberadas pelo *Azospirillum brasilense* e melhorar a eficiência do uso do nitrogênio do solo (Hungria et al., 2010, Novakowski et al., 2011).

**Tabela 1.** Número de perfilhos e comprimento de planta de azevém submetido à inoculação ou não com *Azospirillum brasilense* e diferentes níveis de adubação nitrogenada. Pelotas, 2015.

| <i>Azospirillum</i> | Nível de Adubação (Kg.ha <sup>-1</sup> ) |          |          |          |          |
|---------------------|--|----------|----------|----------|----------|
|                     | 0  | 25       | 50       | 75       | 100      |
|                     | Número de perfilhos/vaso                 |          |          |          |          |
| <b>Com</b>          | 32,312 a                                 | 47,687 a | 64,812 a | 65,187 a | 78,687 a |
| <b>Sem</b>          | 33,062 a                                 | 50,937 a | 51,562 b | 63,75 a  | 54,812 b |
| <b>CV (%)</b>       | 17,41                                    |          |          |          |          |
|                     | Comprimento de planta (cm)               |          |          |          |          |
| <b>Com</b>          | 35,581 a                                 | 35,406 a | 35,018 a | 34,906 a | 36,575 a |
| <b>Sem</b>          | 28,418 b                                 | 33,968 a | 36,118 a | 36,256 a | 39,575 a |
| <b>CV (%)</b>       | 16,61                                    |          |          |          |          |

Médias seguidas de mesma letra na coluna, dentro da mesma variável, não diferem significativamente para o teste T ( $P \leq 0,05$ ).

Para o comprimento de planta, apesar da significância da interação entre os fatores de tratamento, verificou-se que a adubação nitrogenada influenciou pouca esta variável, o que pode ser observado pelo baixo coeficiente angular ( $Y = 29,948 + 0,0984x$ ) e de determinação ( $R^2 = 0,23$ ) da equação de regressão do acréscimo de nitrogênio na ausência de *Azospirillum*.

Na presença de *Azospirillum* a adubação nitrogenada não influenciou o comprimento de planta estendida ( $P > 0,05$ ). As diferenças nesta variável quanto à presença ou ausência da inoculação só foram significativas quando a dose de nitrogênio foi zero (Tabela 1). Nesta dose, a inoculação com *Azospirillum* já proporcionou o comprimento máximo de planta.

Para o fator inoculação, verificou-se efeito significativo sobre o número de folhas em expansão e folhas vivas (Tabela 2), com maior valor destas variáveis quando não foi utilizada a inoculação com *Azospirillum* (Tabela 2).

**Tabela 2.** Número de folhas em expansão e vivas de azevém submetido ou não a inoculação com *Azospirillum brasilense*. Pelotas, 2015.

| <i>Azospirillum</i> | Folhas em expansão | Folhas vivas |
|---------------------|--------------------|--------------|
| <b>Com</b>          | 1,472 b            | 1,944 b      |
| <b>Sem</b>          | 1,531 a            | 2,045 a      |
| <b>CV (%)</b>       | 12,2               | 14,2         |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente para o teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).

O maior número de perfilhos das plantas com *Azospirillum*, nas maiores doses de nitrogênio, pode ter diminuído o tempo de vidas das folhas nos perfilhos principais e assim promover menor número médio de folhas vivas neste tratamento. Além disso, o resultado pode ser decorrente do menor surgimento de folhas associado ao menor tempo de vida da folha nos tratamentos sem a presença de *Azospirillum*. Como o nitrogênio aumenta o tempo de vida da folha e o número de folhas (Cauduro et al. 2006), provavelmente o *Azospirillum* não supriu a demanda de nitrogênio que o azevém necessitava para expressar seu potencial produtivo.

Segundo Alvarez et al. (1996), o *Azospirillum* não se fixa a planta ocorrendo uma assimbiose. Os microrganismos ficam na rizosfera não liberando diretamente o nitrogênio para a planta. Este nitrogênio vai sendo liberado aos poucos com a morte das células destes microrganismos e desta forma possivelmente não foi suficiente para suprir adequadamente as plantas. Por sua vez, a aplicação de nitrogênio teria suprido a demanda. Influência positiva do nitrogênio sobre as características estruturais de plantas forrageiras também foi encontrada por Garcez Neto et al. (2002). De acordo com esses autores, o aumento no número de folhas se deve ao suprimento adequado de nitrogênio às plantas.

O numero de folhas vivas observado é baixo (Tabela 2) comparado a outros estudos, como o de Oliveira et al (2014). Estes autores, ao avaliarem sete cultivares de azevém durante

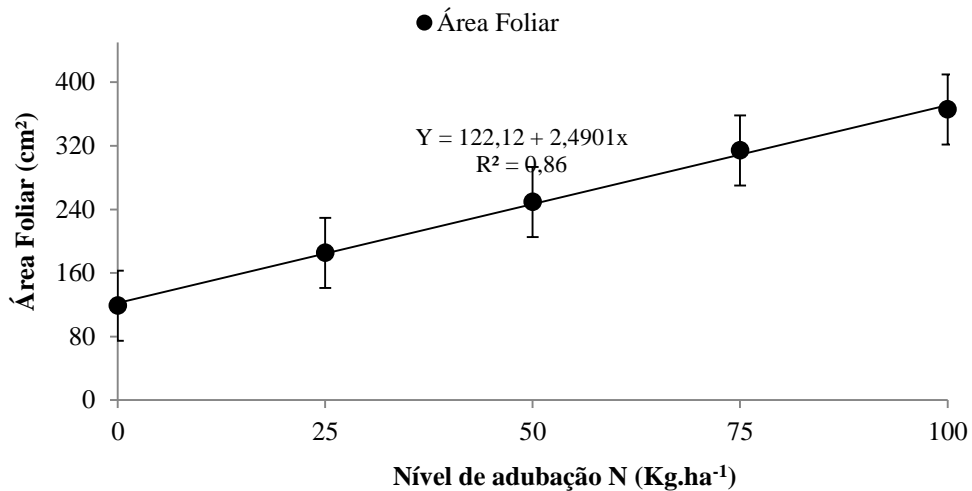
o estágio vegetativo observaram média de 4,6 folhas vivas por perfilho. Pontes et.al (2003) encontraram número médio de folhas vivas por perfilho de 3,7, número este semelhante ao encontrado por Marriot et al. (1999). Por sua vez, Quatrin (2015) observou número médio de 4,2 folhas vivas, por perfilho, em pastagem mantida com adubações nitrogenadas elevadas, no entanto, houve similaridade entre os níveis de 100 e 150 Kg de nitrogênio.ha<sup>-1</sup>.

Por outro lado, menor valor da fração material senescente foi verificado para os níveis mais elevados de nitrogênio. Esse resultado deve-se, provavelmente, a maior disponibilidade de nitrogênio no sistema, implicando em maior participação de tecidos vivos das plantas (Heringer & Moojen, 2002). Segundo Cassol et. al (2011) esse resultado se deve ao fato do nitrogênio proporcionar maior crescimento vegetativo e aumentar as taxas de perfilhamento do azevém.

Outro fator que contribuiu para o menor número de folhas vivas é o estágio de desenvolvimento do último corte, em antese, onde neste estágio de desenvolvimento e em pleno florescimento, o número de folhas vivas diminui, em função do deslocamento metabólico de solutos para a produção de grãos, ocorrendo a senescência das folhas e cessando o surgimento de novas folhas (Nabinger, 1997).

O número de folhas vivas e em expansão está diretamente ligado ao surgimento de novas folhas assim como ao tempo de vida da folha. Ou seja, quando surgem novas folhas e quando esta tem tempo de vida mais estendido, o número de folhas vivas, no dossel vegetativo, aumenta (Nabinger & Pontes, 2001, Lemaire & Chapman, 1996). Gomide & Gomide (2000) afirmam que o surgimento de novas folhas ocorre com maior velocidade no perfilho principal, ainda, e quanto maior o número de perfilhos maior será a taxa de aparecimento de novas folhas visto que esse fato indicaria a prioridade deste perfilho relativamente à alocação dos assimilados, já que ele dispõe de um sistema radicular mais desenvolvido.

Para o fator adubação nitrogenada verificou-se diferenças significativas nas variáveis área foliar e relação folha:colmo, que apresentaram aumento linear com o acréscimo da dose de nitrogênio (Figuras 2 e 3).



**Figura 2.** Área foliar (cm<sup>2</sup>) de azevém submetido a diferentes níveis de adubação nitrogenada. Pelotas, 2015.

Para cada dose de nitrogênio (Kg.ha<sup>-1</sup>) adicionado verificou-se aumento de 2,49 cm<sup>2</sup> na área foliar e 0,22 unidades na relação folha:colmo. Estes resultados concordam com Pellegrini (2010), que analisando a ação da adubação nitrogenada nas plantas forrageiras observou, também, comportamento linear na relação folha:colmo com o aumento da adubação nitrogenada.

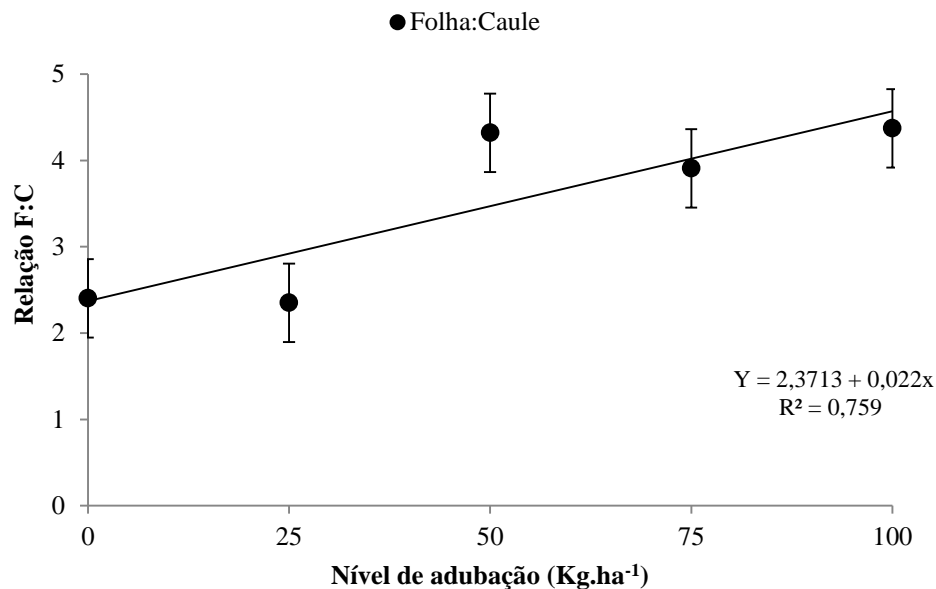
O aumento da área foliar, e consequentemente da relação folha:colmo, se deve a resposta positiva, do número de perfilhos com a elevação do aporte de nitrogênio no sistema, principalmente quando associado à inoculação com *Azospirillum*, (Figura 1 e Tabela 1).

A área foliar produzida em uma comunidade de plantas é determinada pelo acúmulo de carbono que ocorre por meio do processo fotossintético, com influência direta do nível de nitrogênio presente nos tecidos da planta (Lemaire & Chapman, 1996). Conforme Lemaire & Gastal (1997), o nitrogênio interfere positivamente na morfogênese das gramíneas, principalmente nas taxas de expansão foliar e de perfilhamento. Assim, a fertilização

nitrogenada influencia a estrutura da pastagem, uma vez que modifica a densidade de perfilhos e a área de folhas presente nestes perfilhos.

Segundo Freitas (2003), o nitrogênio intervém diretamente sobre as características morfológicas das plantas forrageiras atuando no alongamento e na divisão celular, aumentando o número de células, com isso favorecendo a taxa de expansão e o surgimento de folhas, o que, conseqüentemente proporciona aumento de folhas, favorecendo a relação folha:colmo.

O nitrogênio influencia de forma positiva as taxas de alongamento de folhas e de colmos, o perfilhamento e o comprimento final da lâmina das forrageiras de inverno, no entanto, o perfilhamento é a variável que mais é influenciada pela adubação nitrogenada (Dos Santos Braz, 2014). Neste contexto, Quatrin (2015) afirma que adubação nitrogenada de 100 Kg.ha<sup>-1</sup> é a dose mais eficiente para produção de massa seca de forragem de azevém.



**Figura 3.** Relação folha:colmo de azevém submetido a diferentes níveis de adubação nitrogenada. Pelotas, 2015.

Para cortes, verificou-se diferença estatística em todas as variáveis analisadas (Tabela 3). A área foliar foi maior no primeiro corte. Isso se deve ao maior acúmulo de folhas



vivas que ocorre no início do desenvolvimento vegetativo, diferindo dos cortes posteriores, associado à ausência de folhas senescentes e mortas. Simultaneamente, com o avanço do ciclo da cultura, a quantidade de colmos aumenta, assim como, tem início a senescência resultando em menor área foliar.

O número de perfilhos foi influenciado significativamente pelo avanço do ciclo da pastagem, sendo uma resposta plástica aos cortes. Essa variável define o índice de área foliar (IAF) da pastagem e sua capacidade de interceptar e fornecer energia para as funções de crescimento, absorção de água e nutrientes pelas raízes. Com a chegada de luz nos pontos de crescimento há estímulo ao surgimento de novos perfilhos, desde que com suprimento adequado de nutrientes (Nabinger & Pontes, 2001).

Valores de número de perfilhos semelhantes ao do presente estudo foram observados por Oliveira et al (2014), ao avaliarem sete cultivares de azevém durante o estágio vegetativo. No entanto o número de perfilhos observados é menor que identificados por Barth Neto et. al (2013)

A relação folha:colmo apresentou redução com o avanço no ciclo das plantas (Tabela 3), o que está relacionado diretamente com o ciclo produtivo da forrageira. Nos dois primeiros cortes a matéria seca era composta somente de folhas, não havendo caules em sua composição. A partir do terceiro corte, embora as plantas ainda estivessem em desenvolvimento vegetativo, estas passaram a compor a matéria seca, ainda que em pequena e variada proporção. Conforme Hodgson (1990), no momento em que ocorre a elevação do meristema apical das gramíneas, a planta cessa a produção de folhas e as folhas mais velhas deixam de ser dreno e passam a ser fonte de fotoassimilados para o alongamento dos entrenós e formação da estrutura reprodutiva.

**Tabela 3.** Área foliar, relação folha:colmo, número de folhas expandidas, em expansão, vivas, em senescência e mortas em diferentes cortes de azevém inoculado ou não com *Azospirillum brasilense* e diferentes níveis de adubação nitrogenada. Pelotas, 2015.

| Variáveis                      | Corte               |                     |          |          | CV (%) |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|----------|----------|--------|
|                                | 1°                  | 2°                  | 3°       | 4°       |        |
|                                | 71 DAS <sup>1</sup> | 22 DAC <sup>2</sup> | 27 DAC   | 19 DAC   |        |
| Área Foliar (cm <sup>2</sup> ) | 336,5 a             | 198,90 c            | 246,22 b | 204,88 c | 21,67  |
| Folha:colmo                    | -                   | -                   | 5,46 a   | 1,47 b   | 53,98  |
| Número de perfilhos/vaso       | 46,825b             | 50,375b             | 59,075a  | 60,850a  | 12,05  |
| Folhas expandidas              | 1,663 b             | 1,689 b             | 1,810 a  | 1,412 c  | 16,02  |
| Folhas em expansão             | 1,453 b             | 1,712 a             | 1,475 b  | 1,366 c  | 12,19  |
| Folhas vivas                   | 3,116 b             | 3,401 a             | 3,285 a  | 2,778 c  | 14,21  |

Médias seguidas de mesma letra na linha, não diferem significativamente para o teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>1</sup> DAS: Dias após a semeadura; <sup>2</sup> DAC: Dias após o último corte.

A relação folha:colmo é uma variável importante na nutrição animal e no manejo das plantas forrageiras. Um dossel com alta relação folha:colmo apresenta melhor valor nutritivo e maior facilidade de apreensão da forragem pelo animal em pastejo. Segundo Pinto et al. (1994), alta relação folha:colmo confere a gramínea melhor adaptação ao pastejo ou tolerância ao corte, por estar com os meristemas apicais mais próximos ao solo, e, portanto, menos vulneráveis à remoção.

Com o avanço do ciclo da planta houve acréscimo de folhas senescentes e mortas, com diminuição de folhas expandidas e em expansão. De modo geral as plantas forrageiras quando em final de ciclo se caracterizam pela baixa taxa de aparecimento de folhas, tendo reflexo nas características estruturais como número de folhas em expansão e expandidas assim como número de folhas vivas.

Quando a planta forrageira entra em estágio reprodutivo e dá início a alongação dos entre nós estabiliza o aparecimento de novas folhas. Com isso, a participação das folhas na produção de matéria seca desse perfilho diminui conforme está atingem a maturidade.

Enquanto essa haste reprodutiva não for cortada ou morrer, novas folhas não voltam a aparecer (Hodgson, 1990). Nesse estágio a mobilização de assimilados passa a priorizar as partes reprodutivas da planta e ocorre decréscimo da relação folha:colmo (Santos, 2002)

## CONCLUSÕES

A adubação nitrogenada aumenta a área foliar, relação folha:colmo e o número de perfilhos de azevém.

A inoculação com *Azospirillum brasilense* aumenta o perfilhamento do azevém, com no mínimo, 50 Kg.ha<sup>-1</sup> da adubação nitrogenada recomendada.

## REFERÊNCIAS

ALVAREZ, M.L. et.al. *Effect of Azospirillum on coleoptile growth in wheat seedlings under water stress*. Cereal Research Communications, Szeged, v. 24, n. 1, p. 101-107, 1996.

BARTCHECHEN, A. et al. *Efeito da inoculação de Azospirillum brasilense na produtividade da cultura do milho (Zea mays L.)*. Campo Digital, v.5, n.1, p. 56-59, 2010.

BARTH NETO et al. *Perfilhamento em pastagens de azevém em sucessão a soja ou milho, sob diferentes métodos e intensidades de pastejo*. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 2013, v.48, n.3, pp. 329-338.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B. & NEVES, J.C.L 1ª ed.. **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 375-470.

CARRÈRE, P et.al. *Tissue turnover within grass clover mixed swards grazed by sheep. Methodology for calculating growth, senescence and intake fluxes.* Journal of Applied Ecology, v.34, n. 2, p.333-348, 1997.

CASSOL, L. C et.al. *Produtividade e composição estrutural de aveia e azevém submetidos a épocas de corte e adubação nitrogenada.* Revista Ceres, Viçosa, v. 58, n. 4, p. 438-443, 2011.

CAUDURO, G. F. **Morfogênese e dinâmica do acúmulo em pastagens de azevém anual manejadas sob intensidades de métodos de pastejo.** 2005, 130 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – UFRGS – Porto Alegre, 2005.

CAUDURO, G. et al. *Variáveis morfogênicas e estruturais de azevém anual (Lolium multiflorum Lam.) manejado sob diferentes intensidades e métodos de pastejo.* Revista Brasileira de Zootecnia, v.35, n.4, p.1298-1307, 2006.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - CQFSRS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina.** 10.ed. Porto Alegre, SBCS - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004. 400p.

CONFORTIN, et.al. *Morfogênese e estrutura de azevém anual submetido a três intensidades de pastejo.* Actas cientiarum. Animal Sciences, v. 32, n. 4, p. 385-391, 2010.

DOBBELAERE, S, et.al. *Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere.* Critical Reviews in Plant Sciences, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

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.

DOS SANTOS BRAZ, T. G. et al. *Morfogênese de forrageiras de inverno adubadas com nitrogênio*. Zootecnia, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2014.

FERNANDES JÚNIOR, P. I et.al. *Phenotypic diversity and amylolytic activity of fast growing rhizobia from pigeonpea [Cajanus cajan (L.) Millsp]*. Brazilian Journal of Microbiology, v. 43, n. 4, p.1604-1612, 2012.

FREITAS, T.M.S. **Dinâmica da produção de forragem, comportamento ingestivo e produção de ovelhas Ile de France em pastagem de azevém anual (*Lolium multiflorum Lam.*) em resposta a doses de nitrogênio**. 2003. 114f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2003.

GARCEZ NETO, A.F. et al. *Respostas morfológicas e estruturais de Panicum maximum cv. Mombaça sob diferentes níveis de adubação nitrogenada e alturas de corte*. Revista Brasileira de Zootecnia, v.31, n.5, p.1890-1900, 2002.

GODOY, J.C. et al. *Produtividade de milho em resposta a doses de nitrogênio com e sem inoculação das sementes com Azospirillum brasilense*. Campo Digital, v.6, n.1, p.26-30, 2011.

GOMIDE, C.A.M., GOMIDE, J.A. *Morfogênese de cultivares de Panicum maximum*. Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia, v. 29, n.2, p. 341-348, 2000.

HERINGER, I.; MOOJEN, E. L. *Potencial produtivo, alterações da estrutura e qualidade da pastagem de milheto submetida a diferentes níveis de nitrogênio*. Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, MG, v. 31, n. 2, p. 875-882, suplemento 2002.

HODGSON, J. **Grazing management: science into practice**. Harlow: Longman Scientific & Technical, 1990. 203p

HUNGRIA, M. et al. *Inoculation with selected strains of Azospirillum brasilense and Azospirillum lipoferum improves yields of maize and wheat in Brazil*. Plant and Soil, v.331, n. 1 p.413-425, 2010.

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).

LEMAIRE, G.; AGNUSDEI, M. Leaf tissue turnover and efficiency of herbage utilization. In: **International Symposium “Grassland Ecophysiology And Grazing Ecology”**, 1999, Curitiba. UFPR, 1999. p.165-186.

LEMAIRE, G.; CHAPMAN, D. Tissue flows in grazed plant communities. In: HODGSON, J.; ILLIUS, A.W. (Eds.) **The ecology and management of grazing systems**. Oxon: CABI, 1996. p.3-36.

LEMAIRE, G.; GASTAL, F. Nitrogen uptake and distribution in plant canopies. In: LEMAIRES, G. (Ed.) **Diagnosis of the nitrogen status in crops**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1997, p.3-43.

MALAVOLTA, E. Os elementos minerais. In: **Elementos De Nutrição Mineral De Plantas**. Ed.: Agronômica Ceres. São Paulo, 1980.

MANZANTI, A.; LEMAIRES, G. *Effect of nitrogen fertilization on herbage production of tall fescue swards continuously grazed by sheep. 2. Consumption and efficiency of herbage utilization*. Grass and Forage Science, v.49, n.3, p.352-359, 1994.

MARRIOT, C.A. et al. *Seasonal dynamics of leaf extension and losses to senescence and herbivory in extensively managed sown ryegrass-white clover swards*. Journal of Agricultural Science, v.132, n.1, p.77-89, 1999.

NABINGER, C. Princípios da exploração intensiva de pastagens. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 13, 1996, Piracicaba. Anais... Piracicaba: FEALQ, 1997. p.15-95.

NABINGER, C.; PONTES, L. S. Morfogênese de plantas forrageiras e estrutura do pasto. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Piracicaba, 2001. Anais... Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 755-770.

NOVAKOWISKI, J.H. et al. *Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de Azospirillum brasilense na cultura do milho*. Semina: Ciências Agrárias, v.32, n.4, Sup.1, p.1687-1698, 2011.

OLIVEIRA, L. V. et al. *Características produtivas e morfofisiológicas de cultivares de azevém*. Pesquisa Agropecuária Tropical, v.44, n.2, p. 191-197, 2014.

PEDROSO, C.E.S. et al. *Produção de ovinos em gestação e lactação sob pastejo em diferentes estádios fenológicos de azevém anual*. Revista Brasileira de Zootecnia, v.33, n.5, p.1345-1350, 2004.

PELLEGRINI, L. G. de et al. *Produção de cordeiros em pastejo contínuo de azevém anual submetido à adubação nitrogenada*. Ciência Rural, v.40, n.6, p. 1399-1404. 2010.

PINTO, J.C, et al. *Crescimento de folhas de gramíneas forrageiras tropicais, cultivadas em vasos, com duas doses de nitrogênio*. Revista Brasileira de Zootecnia, v.23, n.3, p.327-332, 1994.

PONTES, L.S. et al. *Variáveis morfológicas e estruturais de azevém anual (Lolium multiflorum Lam.) manejado em diferentes alturas*. Revista Brasileira de Zootecnia, v.32, n.4, p.814-820, 2003.

QUATRIN, M. P. et.al. *Efeito da adubação nitrogenada na produção de forragem, teor de proteína bruta e taxa de lotação em pastagens de azevém*. Boletim da indústria animal, v.72, n.1, p. 21-26, 2015.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. *Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion*. Biotechnology Advances, vol. 17, n. 4-5, p. 319-339, 1999.

SANTOS, P.M. **Controle do desenvolvimento das hastes no capim Tanzânia: um desafio**. 2002, 98 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.



**ARTIGO II**

**ADUBAÇÃO NITROGENADA E INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense*  
SOBRE PRODUÇÃO DE AZEVÉM ANUAL**

Artigo formatado conforme as normas da revista Ciência Rural

**UFSM (RCR – ISSN 0103-8478)**

**Adubação nitrogenada e inoculação com *Azospirillum brasilense* sobre produção de azevém anual**

Nitrogen fertilization and inoculation with *Azospirillum brasilense* about yield of annual ryegrass

**RESUMO:**

O objetivo do trabalho foi avaliar, em casa de vegetação, os efeitos da inoculação com *Azospirillum brasilense*, cepas AbV5 e AbV6, associada a diferentes níveis de adubação nitrogenada (0, 50 e 100% da dose recomendada para gramíneas forrageiras de inverno) sobre a produção de matéria seca e composição de nutrientes de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) BRS Ponteio. As unidades experimentais corresponderam a vasos com capacidade de 2,43 dm<sup>3</sup>, totalizando quarenta vasos, alocados em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. O adubo nitrogenado foi aplicado 20% no momento da semeadura e 80% em cobertura, no perfilhamento. As sementes de azevém foram inoculadas com o produto comercial MASTERFIXL<sup>®</sup> Gramíneas, na dose de 300 mL.ha<sup>-1</sup>. Foram analisadas as variáveis matéria seca de folha, colmo e total e a composição nutricional (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio). Os resultados foram submetidos a análise de variância e teste de comparação de médias de Tukey (P≤0,05). A inoculação com *Azospirillum* não influenciou o desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular, independente do nível de adubação nitrogenada. O uso de *Azospirillum* aumentou os teores de fósforo acumulado na parte aérea e sistema radicular.

**PALAVRAS-CHAVES:** *Lolium multiflorum*, doses de nitrogênio, fixação biológica de nitrogênio, rizobactérias, teor de nutrientes.

**ABSTRACT:**

The aim of the study was to evaluate, under greenhouse conditions, the effects of *Azospirillum brasilense*, strains AbV5 e AbV6, inoculation associated to different nitrogen fertilization levels (0, 50, and 100% of the recommended dosage for winter forage grasses) on dry matter production and composition ryegrass nutrient (*Lolium multiflorum* Lam.) BRS Ponteio. The experimental units correspond to vessels with a capacity of 2.43 dm<sup>3</sup>, totaling forty vessels, allocated in a completely randomized design with four replications. Nitrogen fertilizer was applied 20% at the time of sowing, and 80% in covering, at tillering. The ryegrass seeds were inoculated using a commercial product called MASTERFIXL<sup>®</sup> Gramíneas at a dosage of 300 mL.ha<sup>-1</sup>. In this work, it was analyzed the following variables: dry matter of leaf, stem, and total nutritional composition (nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, and magnesium). The results were submitted to analysis of variance and mean comparison Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). Inoculation with *Azospirillum* had no influence the development of aerial and root systems, regardless of the nitrogen fertilization level. The *Azospirillum* usage increases the accumulated level of phosphorus in the aerial and root systems.

**KEY WORDS:** *Lolium multiflorum*, nitrogen dosage, biological fixation, rhizobacteria, nutrient level.

**INTRODUÇÃO**

O azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) foi introduzido no Brasil em meados do século XIX, estando largamente disseminado nos Estados da Região Sul do Brasil em cultivo isolado ou em consórcio com outras espécies. Apresenta adaptação às condições edafoclimáticas, alta produção de forragem e valor nutritivo, tolerância ao pisoteio, bom vigor inicial, grande capacidade de rebrota e de manter-se no solo por ressemeadura natural,

podendo ser utilizado no melhoramento das pastagens naturais bem como para a formação de palhada em sistema de semeadura direta (PEDROSO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2014).

Para alcançarmos produtividade satisfatória no cultivo de gramíneas o nitrogênio é indispensável e, ao mesmo tempo, limitante. Normalmente se encontra, no solo, em baixas concentrações, sendo que, na maioria das vezes indisponível. Neste aspecto, o suprimento adequado deste mineral em pastagens cultivadas é o fator de manejo com maior impacto no aumento de produção de matéria seca e conseqüentemente, conforme (ASSMANN et al., 2004), ganho de peso animal.

Diversos trabalhos têm demonstrado que o suprimento inadequado de nitrogênio, não afeta apenas a produção de matéria seca, mas também o crescimento radicular. Assim a área explorada pelas raízes é menor, conseqüentemente menor a taxa de acúmulo de nitrogênio e outros nutrientes, tanto nas folhas como no sistema radicular (PAVINATO, 2014).

A fixação biológica de nitrogênio aparece como alternativa no suprimento de nitrogênio. Neste sentido, as pesquisas sobre a associação de bactérias diazotróficas com gramíneas têm avançado para o conhecimento das interações entre o genótipo da planta e a seletividade da população microbiana do sistema solo/planta (HUNGRIA et al., 2007).

As bactérias do gênero *Azospirillum* são comumente encontradas habitando raízes de gramíneas. O *Azospirillum* spp. colabora para a nutrição da planta seja através do processo de fixação biológica de nitrogênio ou da produção de hormônios vegetais que atuam no aumento do sistema radicular. A inoculação com *Azospirillum* modifica a morfologia do sistema radicular pela produção de substâncias promotoras de crescimento, aumentando não apenas o número de radículas, mas também o diâmetro das raízes laterais e adventícias, ampliando assim, o volume de solo explorado e promovendo, conseqüentemente, ganhos em rendimento (OKON & VANDERLEYDEN, 1997). Os fitormônios são compostos que provocam alterações nos processos fisiológicos e estruturais com a finalidade de auxiliar no incremento

do rendimento de forragem e melhorar a qualidade sob as mais diversas condições ambientais (CASTRO & VIEIRA 2001).

Como o processo de fixação biológica de nitrogênio é altamente oneroso para as células bacterianas, a adubação com nitrogênio mineral pode causar inibição do processo. Com nitrogênio disponível na forma mineral o complexo nitrogenase não é sintetizado pelo *Azospirillum*, passando as bactérias utilizar o nitrogênio disponível na solução do solo (SILVA et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inoculação com *Azospirillum brasilense* associada a diferentes níveis de adubação nitrogenada sobre a produção de matéria seca e composição de nutrientes em azevém anual.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, campus Capão do Leão (31°45'48"S e 52°29'02"W), RS, localidade com temperatura média anual de 22 °C.

Em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, a cultivar de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) BRS Ponteio foi submetida a 06 tratamentos experimentais, provenientes da combinação da presença ou ausência de inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense*, cepas AbV 5 e AbV6, e três níveis de adubação nitrogenada (0, 50 e 100% da dose recomendada para gramíneas forrageiras de inverno pela Comissão de Química e Fertilidade do solo (CQFS, 2004), que corresponde no presente estudo a 100 Kg.ha<sup>-1</sup>).

As unidades experimentais corresponderam a vasos com capacidade de 2,43 dm<sup>3</sup>. Os vasos plásticos com drenos foram previamente desinfestados com solução contendo 40% de

álcool (70%) + 20% de hipoclorito de sódio (2,5 % p/p) e colocados para secar ao ar. Após secos, foram preenchidos com Planossolo Háptico Eutrófico solódico pertencente à Unidade de Mapeamento Pelotas (Strecket al., 2008). As características químicas do solo eram: Argila= 17%; pH= 4,90; SMP= 6,0; Matéria Orgânica= 1,70 %; P= 1,20 mg/dm<sup>3</sup>; K= 30 mg/dm<sup>3</sup>; saturação por base: 27%, CTC efetiva: 3,2 cmolc/dm<sup>3</sup>. O solo foi peneirado, seco ao ar, destorroado e acondicionado nos vasos.

Para o cálculo de quantidade de adubo a ser adicionado, foi considerado 2000 ton.ha<sup>-1</sup> de solo, sendo que cada vaso comportou 3 Kg. A adubação foi realizada conforme análise de solo e recomendação da CQFS (2004). Na semeadura foi aplicado o equivalente a 120 Kg.ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 180 Kg.ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O e, até, 20 Kg.ha<sup>-1</sup> de N (de acordo com o tratamento de adubação nitrogenada), 20% da recomendação. O adubo fosfatado e o potássico foram pesados em balança de precisão, macerados e incorporados ao solo à 5 cm de profundidade. O adubo nitrogenado, na forma de ureia, foi diluído em 40 mL de água destilada e aplicado no momento da semeadura. Nos tratamentos com adubação nitrogenada, a adubação de cobertura, até 80 Kg.ha<sup>-1</sup> de N (de acordo com o tratamento de adubação nitrogenada), 80% da recomendação, foi realizada no perfilhamento.

As sementes de azevém foram inoculadas com o produto comercial MASTERFIXL<sup>®</sup> Gramíneas, na dose de 300 mL.ha<sup>-1</sup>. Dose recomendada pelo fabricante para garantir a inoculação das sementes em solos onde nunca foi realizada inoculação com esta bactéria. O produto foi diluído em água destilada e misturado às sementes, de modo a garantir a perfeita distribuição do líquido nas mesmas. Conforme o fabricante, o inoculante continha estirpes de *Azospirillum brasilense* em concentração mínima de 2x10<sup>8</sup> células viáveis.mL<sup>-1</sup>. As sementes tratadas foram semeadas imediatamente.

A semeadura foi realizada em 04/06/2013, utilizando-se 20 sementes por vaso à profundidade de 03 cm. Por ocasião do aparecimento da primeira folha completamente expandida, foi realizado o raleio das plantas, deixando-se quatro por vaso.

Sempre que as plantas atingiam 20 cm de altura eram cortadas, deixando-se resíduo de 07 cm no primeiro corte e 10 cm nos cortes subsequentes, para evitar que se eliminasse o ponto de crescimento do perfilho (Oliveira, et al., 2014).

Após cada corte foram mensuradas as seguintes variáveis: matéria seca de folha, colmo e total. Por ocasião do último corte as plantas foram retiradas dos vasos sendo também avaliadas as raízes. Todas as amostras foram secas em estufa de ventilação forçada a 55°C até peso constante. Em seguida foram moídas em moinho tipo Willey, com peneira de 20 mesh e acondicionada em vidros para posterior análise química de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio, no Laboratório de Análises de Solos e Tecido Vegetal da FAEM/UFPEL.

O primeiro corte foi realizado em 14/08/2013 (71 dias após a semeadura), o segundo em 05/09/2013 (22 dias após o primeiro corte), o terceiro em 02/10/2013 (27 dias após o segundo corte) e o quarto em 21/10/2013 (19 dias após o terceiro). Quando a maioria das plantas emitiu a inflorescência o experimento foi encerrado.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Para as análises utilizou-se o procedimento GLM do pacote estatístico SAS (Statistical Analysis System<sup>®</sup>), versão 9.0.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### *Parte aérea*

Apesar de outros trabalhos citarem benefícios da inoculação com *Azospirillum* na produção total de matéria seca (SALAMONE; DÖBEREINER, 1996; MACHADO et al., 1998), o efeito desta prática não foi observado neste estudo. Também não houve interação

significativa entre a inoculação com *Azospirillum brasilense* e a adubação nitrogenada para os parâmetros matéria seca de folha (MSF), matéria seca de colmo (MSC), matéria seca total (MST) e teores de nitrogênio (N), magnésio (Mg) e fósforo (P), que apresentaram significância para o fator adubação nitrogenada (Tabela 01).

Maiores quantidades de matéria seca de folhas, colmos e total foram observados em adubações nitrogenadas mais elevadas ( $P < 0,0001$ ). Esse resultado se deve ao fato do nitrogênio proporcionar maior crescimento vegetativo e aumentar as taxas de perfilhamento do azevém, dentro de certos limites, e por consequência, elevar a capacidade de produtividade da pastagem (CASSOL et al., 2011). Valor similar ao presente trabalho também foi constatado por HUMPHREYS et al. (2012), em pastagens de azevém submetidas à fertilização nitrogenada entre 79 e 105 Kg.ha<sup>-1</sup>.

**Tabela 1.** Matéria seca de folha (MSF), colmo (MSC) e total (MST) e, teores (g.Kg<sup>-1</sup>) de nitrogênio (N), fósforo (P) e magnésio (Mg) em azevém submetido a diferentes níveis de adubação nitrogenada. Pelotas, 2015.

| <b>Adubação</b> | <b>MSF<br/>(g)</b> | <b>MSC<br/>(g)</b> | <b>MST<br/>(g)</b> | <b>N<br/>(g.Kg<sup>-1</sup>)</b> | <b>P<br/>(g.Kg<sup>-1</sup>)</b> | <b>Mg<br/>(g.Kg<sup>-1</sup>)</b> |
|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>0</b>        | 2,17 c             | 0,37 b             | 2,54 c             | 20,95 c                          | 4,52 a                           | 2,27 a                            |
| <b>50</b>       | 5,70 b             | 0,76 ab            | 6,45 b             | 35,65 b                          | 4,21 b                           | 2,02 b                            |
| <b>100</b>      | 7,86 a             | 1,21 a             | 9,07 a             | 40,47 a                          | 3,79 c                           | 2,08 b                            |
| <b>Média</b>    | 5,24               | 0,78               | 6,02               | 32,26                            | 4,17                             | 2,12                              |
| <b>CV (%)</b>   | 17,17              | 70,44              | 27,74              | 5,28                             | 5,46                             | 5,34                              |

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente para o teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Quanto aos teores de nitrogênio nas folhas, se observou maior acúmulo deste nas maiores taxas de adubação, com diferença significativa entres as taxas testadas neste trabalho, com teor



praticamente dobrando em relação ao controle, passando de 20,95 à 40,47 g de N.Kg<sup>-1</sup> de matéria seca (Tabela 1). Isso ocorre por ser o teor de nitrogênio nas plantas muito influenciado pela adubação nitrogenada (KILLORN; ZOURARAKIS, 1992), refletindo a disponibilidade desse nutriente no solo.

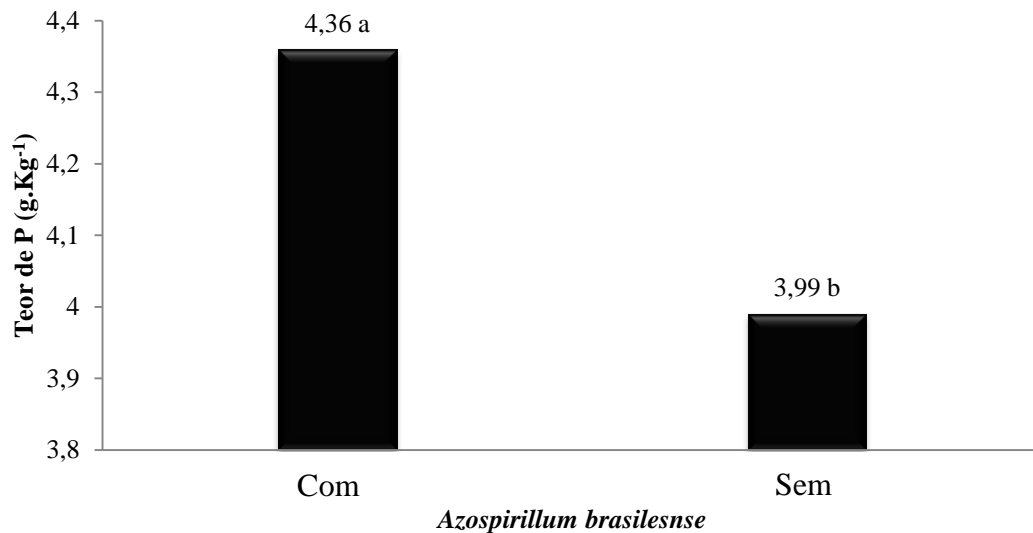
Esses resultados condizem com o apresentado por MENDONÇA et al. (2006) que, trabalhando com a inoculação de milho com uma mistura de bactérias diazotróficas, encontraram que, o acúmulo de nitrogênio na cultura foi decorrente da adubação nitrogenada e não devido à contribuição microbiana. Do mesmo modo, HUNGRIA et al. (2010) tampouco verificaram diferenças no conteúdo de nutrientes nas folhas de plantas inoculadas com espécies de *Azospirillum*.

O fornecimento de nitrogênio reduziu o acúmulo de fósforo e magnésio na parte aérea (Tabela 1). É possível que os resultados obtidos sejam consequência de toxidez nos tratamentos em que se forneceu nitrogênio. Toxidez de amônio, tem sido atribuída à acidificação da rizosfera, acúmulo de NH<sup>4+</sup> livre nos tecidos das plantas e inibição da absorção de cátions, como K, Ca e Mg (JACKSON & VOLK, 1995).

Os teores fósforo na parte aérea foram influenciados pela inoculação das sementes com *Azospirillum*. Nos tratamentos inoculados com *Azospirillum* foi verificado 4,36 g.Kg<sup>-1</sup> de fósforo por unidade de massa seca, sendo esse valor 9,27% superior ao encontrado sem a presença de inoculante (Figura 1). Isso ocorre, pois as bactérias presentes na rizosfera são capazes de secretar ácidos orgânicos e fosfatases que facilitam a conversão das formas insolúveis de fósforo em formas disponíveis para as mesmas, disponibilizando o nutriente para as plantas hospedeiras (KIM et al., 1998).

A produção de ácidos orgânicos resulta em acidificação da célula microbiana e seu microambiente. Em consequência, o fósforo inorgânico é liberado do solo pela substituição por Ca<sup>+2</sup>. Conforme RODRÍGUEZ & FRAGA (1999), o ácido mais frequentemente

observado entre os solubilizadores de fosfatos é o ácido glucônico, sendo observados também os ácidos cetoglucônico, láctico, isovalérico, isobutírico, acético, glicólico, malônico e succínico em diferentes espécies de bactérias.



**Figura 1.** Teores (g.Kg<sup>-1</sup>) de fósforo em azevém submetido ou não a inoculação com *Azospirillum brasilense*. Pelotas, 2015.

Experimentos conduzidos em campo, com a cultura do trigo, evidenciaram aumento na absorção de nitrogênio e fósforo em virtude da associação das plantas com bactérias promotoras do crescimento (GALAL et al., 2000), possivelmente devido ao maior desenvolvimento radicular. Da mesma forma, a inoculação com *Azospirillum*, em condições de casa de vegetação, também promoveu substancial aumento na assimilação de nitrogênio em plantas e grãos de trigo (ISLAM et al., 2002).

Observou-se interação significativa entre as doses de nitrogênio e inoculação com *Azospirillum* na absorção dos cátions, potássio e cálcio. De acordo com a Tabela 2, nota-se que o aumento na adubação nitrogenada determinou elevação dos teores de potássio na parte aérea, estando esta associada ou não a inoculação *Azospirillum*. Os teores de potássio encontrados nos tratamentos sem inoculação, embora numericamente maiores, só diferiram

estatisticamente do tratamento com *Azospirillum* na dose de 50 Kg.ha<sup>-1</sup> de nitrogênio recomendada.

Os teores de cálcio diminuíram em função do aumento da adubação nitrogenada, principalmente quando não associada à *Azospirillum*, passando de 4,67 para 2,83 g.Kg<sup>-1</sup> de potássio por unidade de matéria seca. Isso ocorre, pois a absorção de Ca<sup>2+</sup> pode ser diminuída pelo excesso de outros íons como o K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e, principalmente, NH<sup>4+</sup> (BÜLL, 1993). Nos tratamentos com maiores doses de nitrogênio os teores de NH<sup>4+</sup> e NO<sup>3+</sup> provavelmente são maiores, assim o teor de cálcio na planta é menor (Tabela 2). A relação da absorção de cálcio em função dos teores de potássio e amônio é conhecida e importante. Alta quantidade destes nutrientes na solução do solo causam diminuição da absorção de cálcio e magnésio nas plantas (Tabela 2). Isso pode ser explicado pelo efeito de diluição, abordado por ROSOLEM (2005). Uma planta com suprimento mineral de potássio e nitrogênio cresce mais e, mesmo com diminuição dos teores de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> na planta, muitas vezes não há prejuízo no crescimento ou na produção.

**Tabela 2.** Teores (g.Kg<sup>-1</sup>) de potássio e cálcio em azevém submetido à inoculação ou não com *Azospirillum brasilense* e diferentes níveis de adubação nitrogenada. Pelotas-RS, 2015.

| <i>Azospirillum</i> | Nível de Adubação (Kg.ha <sup>-1</sup> ) |           |          |
|---------------------|--|-----------|----------|
|                     | 0  | 50        | 100      |
|                     | Potássio (g.Kg <sup>-1</sup> )           |           |          |
| Com                 | 37,92 aB                                 | 39,56 bAB | 39,92 aA |
| Sem                 | 38,48 aB                                 | 42,74 aAB | 44,87 aA |
| CV (%)              | 2,01                                     |           |          |
|                     | Cálcio (g.Kg <sup>-1</sup> )             |           |          |
| Com                 | 4,54 aA                                  | 3,61 aB   | 3,21 aB  |
| Sem                 | 4,67 aA                                  | 3,13 bB   | 2,83 aBC |
| CV (%)              | 5,04                                     |           |          |

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna ou maiúscula na linha, dentro da mesma variável, não diferem significativamente para o teste Tukey (P≤0,05).

KOLB & MARTIN (1988) relataram que a adição de nitrogênio mineral, diminui a atividade e o número de bactérias diazotróficas. Os autores sugerem que o decréscimo na proporção de diazotróficos no solo ocorre em virtude de uma supressão competitiva dos microrganismos heterotróficos na presença de formas combinadas de nitrogênio. Resultado semelhante foi observado por KIRCHHOF et al. (1997), ao trabalharem com *Herbaspirillum* em gramíneas do gênero *Miscanthus*. Na cultura da cana-de-açúcar, altas doses de adubo nitrogenado causaram efeito negativo sobre a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993; MUTHUKUMARASAMY et al., 1999). De maneira geral, os autores consideraram que o fertilizante altera o estado fisiológico da planta, influenciando em sua associação com os microrganismos. Além da diminuição da população de bactérias diazotróficas, recentemente verificou-se que a diversidade destas bactérias também pode ser comprometida pela adição de adubos nitrogenados ao solo (BERGAMASCHI, 2006). O efeito negativo de elevadas doses de fertilizantes nitrogenados sobre populações de bactérias diazotróficas associadas à cultura do milho também já foi relatado (REIS JÚNIOR et al., 2008b). HUNGRIA (2011), em trabalho com plantas de milho inoculadas, salienta que nos tratamentos que receberam 100 Kg.ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, o efeito da inoculação com *Azospirillum* foi, em geral, anulado. Também é consistente com o verificado por OLIVEIRA et al. (2006), que observaram redução na produtividade de cana-de-açúcar devido à inoculação com bactéria diazotrófica em solo de alta fertilidade.

#### *Sistema Radicular*

Como observado na parte aérea, a inoculação com *Azospirillum* não proporcionou alteração no desenvolvimento do sistema radicular, cujo crescimento é relatado na literatura como decorrente da produção de fitormônios por essas bactérias (SALAMONE; DÖBEREINER, 1996). Segundo esses autores, a inoculação modifica a morfologia do

sistema radicular das plantas, aumentando não apenas o número de radículas, mas, também, o diâmetro das raízes laterais e adventícias. A matéria seca de raízes no presente estudo variou de 3,48 a 3,72 g, respectivamente sem e com inoculação, e de 21,80 a 22,90 cm<sup>3</sup> para o volume das raízes, respectivamente.

A inconsistência em trabalhos de inoculação com *Azospirillum* é bastante conhecida e variações no ambiente, solo ou substrato, nas plantas e nos componentes da microflora são consideradas como responsáveis por esta variação entre diferentes experimentos (DOBBELAERE et al., 2001). VERONA et al. (2010) relatam que não houve diferença significativa para as variáveis matéria seca de parte aérea e matéria seca de raiz de plantas de milho inoculadas ou não com bactérias promotoras de crescimento. Da mesma maneira, a aplicação de diferentes doses de inoculante à base dessa bactéria em não promoveu incrementos na matéria seca do sistema radicular e tampouco no acúmulo de matéria seca da parte aérea (ROBERTO et al., 2010). Esses resultados confirmam as pesquisas de CAMPOS et al. (1999) que, trabalhando com a inoculação de *Azospirillum* durante todo o ciclo das culturas do trigo, aveia e milho, também não encontraram respostas agronômicas favoráveis à associação em nenhum dos parâmetros analisados. O sucesso dos resultados encontrados na literatura da associação com *Azospirillum* está relacionado, na maioria das vezes, a fatores da própria bactéria, como a escolha da estirpe, o número ideal de células por semente e sua viabilidade (OKON, Y & LABANDERA-GONZÁLEZ, 1994).

Os resultados da avaliação nutricional no sistema radicular indicaram interação entre a aplicação de nitrogênio e a inoculação com *Azospirillum brasilense* nos teores de nitrogênio e potássio (Tabela 3). O acréscimo da adubação nitrogenada proporcionou maior acúmulo de nitrogênio nas raízes do azevém independentemente da inoculação ou não com *Azospirillum*, todavia a presença da bactéria elevou o teor deste nutriente mesmo na ausência de adubação. A partir de 50 Kg.ha<sup>-1</sup> da dose recomendada esse efeito não foi observado, provavelmente em

função da mobilização do nitrogênio mineral pelo *Azospirillum* que, segundo BASHAN et al. (2004), tem preferência pelo nitrogênio na forma inorgânica em detrimento da fixação biológica, que naturalmente é mais onerosa energeticamente.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 3, percebeu-se que o aumento da adubação nitrogenada determinou diminuição dos teores de potássio na raiz, com destaque para a dose de 100 Kg.ha<sup>-1</sup>, principalmente quando não associada à *Azospirillum*, que passou de 6,91 para 3,98 g.Kg<sup>-1</sup> de potássio por unidade de massa seca. De maneira geral, as quantidades de potássio encontradas nos tratamentos sem *Azospirillum* foram menores comparados aos tratamentos com inoculante.

**Tabela 3.** Nitrogênio e potássio (g.Kg<sup>-1</sup>) na raiz de azevém submetido ou não a inoculação com *Azospirillum brasilense* e diferentes níveis de adubação nitrogenada. Pelotas, 2015.

| <i>Azospirillum</i> | Nível de Adubação (Kg.ha <sup>-1</sup> ) |         |         |
|---------------------|--|---------|---------|
|                     | 0  | 50      | 100     |
|                     | Nitrogênio (g.Kg <sup>-1</sup> )         |         |         |
| <b>Com</b>          | 4,87 aC                                  | 7,69 aB | 8,80 aA |
| <b>Sem</b>          | 3,91 bC                                  | 7,99 aB | 9,29 aA |
| <b>CV (%)</b>       | 5,54                                     |         |         |
|                     | Potássio (g.Kg <sup>-1</sup> )           |         |         |
| <b>Com</b>          | 12,6 aA                                  | 7,31 aB | 5,71 aB |
| <b>Sem</b>          | 6,91 bA                                  | 7,44 aA | 3,98 bB |
| <b>CV (%)</b>       | 24,44                                    |         |         |

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna ou maiúscula na linha, dentro da mesma variável, não diferem significativamente para o teste T ukey (P≤0,05).

A inoculação com *Azospirillum* promoveu maior acúmulo de fósforo no sistema radicular (Tabela 4), o que possivelmente se deve à citada produção de fitormônios pelas plantas, na rizosfera, promovida pelas bactérias diazotróficas. Segundo OKON & VANDERLEYDEN (1997), a atuação destes reguladores químicos está ligada à liberação de

moléculas de fósforo, que estão fortemente adsorvidos aos colóides do solo, para a solução, e posteriormente para absorção pela planta na forma iônica.

Para o magnésio, de forma contrária, a inoculação com *Azospirillum* diminuiu seu teor no sistema radicular.

**Tabela 4.** Teores ( $\text{g.Kg}^{-1}$ ) de fósforo e magnésio nas raízes de azevém submetido ou não a inoculação com *Azospirillum brasilense*. Pelotas, 2015.

| <i>Azospirillum</i> | Fósforo<br>( $\text{g.Kg}^{-1}$ ) | Magnésio<br>( $\text{g.Kg}^{-1}$ ) |
|---------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| <b>Com</b>          | 2,05 a                            | 0,60 b                             |
| <b>Sem</b>          | 1,77 b                            | 0,64 a                             |
| <b>Média</b>        | 1,91*                             | 0,62*                              |
| <b>CV (%)</b>       | 12,04                             | 6,56                               |

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente para o teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Houve efeito significativo da adubação no acúmulo de fósforo, magnésio e cálcio nas raízes do azevém. Com aumento da adubação nitrogenada verificou-se maior absorção de fósforo e cálcio pelas plantas, o que possivelmente se deve ao aumento da capacidade de absorção deste mineral do solo (Tabela 5). Esse resultado sugere que a maior ou menor disponibilidade de nitrogênio pode exercer efeito na assimilação de fósforo. Interações sinérgicas entre esses nutrientes já foram identificadas na cultura do milho (MACHADO et al., 2004), sendo que, para BÜLL (1993), é marcante a influência do nitrogênio na maior absorção de fósforo pelo milho. À semelhança dos resultados apresentados nesse experimento, REIS JÚNIOR et al. (2008) também verificaram que aumentos na dose de nitrogênio resultaram em maior acúmulo de nitrogênio e fósforo nas plantas de milho.

**Tabela 5.** Teores ( $\text{g.Kg}^{-1}$ ) de fósforo, magnésio e cálcio nas raízes de azevém submetido a diferentes níveis de adubação nitrogenada. Pelotas, 2015.

| Adubação<br>( $\text{Kg.ha}^{-1}$ ) | Fósforo<br>( $\text{g.Kg}^{-1}$ ) | Magnésio<br>( $\text{g.Kg}^{-1}$ ) | Cálcio<br>( $\text{g.Kg}^{-1}$ ) |
|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| 0                                   | 1,66 b                            | 0,66 a                             | 0,64 b                           |
| 50                                  | 2,05 a                            | 0,59 b                             | 0,76 a                           |
| 100                                 | 2,02 a                            | 0,61 ab                            | 0,84 a                           |
| <b>Média</b>                        | 1,91*                             | 0,62*                              | 0,75*                            |
| <b>CV (%)</b>                       | 12,04                             | 6,56                               | 10,4                             |

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente para o teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

## CONCLUSÕES

A inoculação com *Azospirillum* não influenciou o desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular, independente do nível de adubação nitrogenada.

O uso de *Azospirillum* aumentou os teores de fósforo acumulado na parte aérea e sistema radicular

## REFERÊNCIAS

ALVAREZ, M.I., SUELDO, R.J., BARASSI, C.A. Effect of *Azospirillum* on coleoptile growth in wheat seedlings under water stress. **Cereal Research Communications**, Szeged, v. 24, n. 1, p. 101-107, 1996.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 12<sup>th</sup> ed. Washington, D.C., 1975. 1094p.

ARAÚJO, A. A. **FORAGEIRAS para ceifa**. 2.ed. Porto Alegre: Sulina, 1967.



ASSMANN, A.; PELISSARI, A.; MORAES, A. et al. Produção de gado de corte e acúmulo de matéria seca em sistema de integração lavoura-pecuária em presença e ausência de trevo branco e nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33,n.1, p.37-44, 2004.

BADALUCCO, L.; NANNIPIERI, P. Nutrient transformations in the rhizosphere. In: PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. (eds.) **The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface**. Boca Raton/London/New York: CRC Press, 2007. 2. ed. p.111-133.

BALIGAR, V.C.; STALEY, T.E.; WRIGHT, R.J. Enzyme activities in Appalachian soils: Urease. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.22, n.3, p.315-322, 1991.

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.

BERGAMASCHI, C. **Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a raízes e colmos de cultivares de sorgo**. 2006. 83f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

BRAGA, J.M.; DEFELIPO, B.V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solos e plantas. **Revista Ceres**, Viçosa, v.21, n.113, p.73-85, 1974.

BÜLL, L.T. Nutrição mineral do milho. In: BÜLL, L.T.; CANTARELLA, H. (eds.) **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Potafós, 1993. p.63- 145.

BÜLL, L.T.; BOARETTO, A.E.; MELLO, F.A.F.; SOARES, E. Influência da relação K/(Ca+Mg) do solo na produção de matéria seca e na absorção de potássio por gramínea e leguminosa forrageiras: II. Absorção de potássio em função da relação K/(Ca+Mg) no complexo de troca do solo. **Científica**, v.21, p 67-75, 1993.

CAMPOS, B.C.; THEISEN, S.; GNATTA, V. Avaliação do inoculante "Graminante" nas culturas de trigo e aveia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.3, p.401-407, 1999.

CASSOL, P.C.; SILVA, D.C.P.R.; ERNANI, P.R.; KLAUBERG FILHO, O. & LUCRECIO, W. Atributos químicos em Latossolo Vermelho fertilizado com dejetos suíno e adubo solúvel. **Revista Ciência Agroveterinária**, 10:103-112, 2011.

CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical. Guaíba: **Agropecuária**, 2001.

CHU, H. et al. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.39, n.11, p.2971-2976, 2007.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - CQFSRS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10.ed. Porto Alegre, SBCS - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004. 400p.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.42, p.669-678, 2010.

DOBBELAERE, S. et al. Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v.28, p.871- 879, 2001.

FUENTES-RAMÍREZ, L.E. et al. *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid producing bacterium isolated from sugar cane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, The Hague, v.154, n.2, p.145-150, 1993.

GALAL, Y.G.M. et al. Non-isotopic method for the quantification of biological nitrogen fixation and wheat production under field conditions. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.32, p.47-51, 2000.

HE, J.Z. et al. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammoniaoxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.9, n.9, p.2364-2374, 2007.

HERINGER, I.; MOOJEN, E. L. Potencial produtivo, alterações da estrutura e qualidade da pastagem de milho submetida a diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 31, n. 2, p. 875-882, suplemento 2002.

HUMPHREYS U.J.; MIHAILESCU E.; CASEYSE, I.A. An economic comparison of systems of dairy production based on N-fertilized grass and grass-white clover grassland in a moist maritime environment. **Grass and Forage Science**, v.67, p.519–525, 2012.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: EMBRAPA-SOJA, 2011. 36p. (Documentos EMBRAPA-SOJA, ISSN 1516-781X, n.325).

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. (Documentos EMBRAPA-SOJA, 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**, v. 331, n. 1-2, p. 413-425, 2010.

ISLAM, N.; RAO, C.V.S.; KENNEDY, I.R. Facilitating a N<sub>2</sub>-fixing symbiosis between diazotrophs and wheat. In: KENNEDY, I.R.; CHOUDHURY, A.T.M.A. (eds.) **Biofertilisers in action**. Canberra: Rural Industries Research and Development Corporation, 2002. p.84-93.

JACKSON, W.A. & VOLK, R.J. Attributes of the nitrogen uptake systems of maize (*Zea mays* L.): maximal suppression by exposure to both nitrate and ammonium. **New Phytologist**, 130:327-335, 1995.

JOHNSON, C.M.; ULRICH, A. **Analytical methods for use in plant analysis**. Santa Barbara: University of California, California Agricultural Experimental Station, 1959. 1956p. (Bulletin, 766).

JORGENSEN, S.S. **Laboratory manual: some methods used for routine chemical analysis**. Centro de Energia Nuclear na Agricultura: Piracicaba, SP, 1977.22p.

KANCHIKERIMATH, M.; SINGH, D. Soil organic matter and biological properties after 26 years of maize-wheat-cowpea cropping as affected by manure and fertilization in a Cambisol in semiarid region of India. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.86, n.2, p.155-162, 2001.

KILLORN, R.; ZOURARAKIS, D. Nitrogen fertilizer management effects on corn grain yield and nitrogen uptake. **Journal of Production Agriculture**, v.5, p.142-148, 1992.

KIM, K. Y., JORDAN, D., McDONALD, G. A. Effects of phosphate solubilizing bacteria and vesicular arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biology and Fertility of Soils**, n. 26, p. 79 – 87, 1998.

KIRCHHOF, G. et al. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. **Plant and Soil**, The Hague, v.194, p.45-55, 1997.

KOLB, M.; MARTIN, P. Influence of nitrogen on the number of N<sub>2</sub>-fixing and total bacteria in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.20, n.2, p.221- 225, 1988.

LINDNER, R.C. Rapid analytical methods for some of the more common inorganic constituents of plant tissues. **Plant Physiology**, Rockville, v.19, n. 1, p. 76-89, 1944.

MACHADO, A.T. et al. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n.6, p.961-970, 1998.

MACHADO, C.T.T. et al. Acumulação de nitrogênio, fósforo e zinco e índices de eficiência de utilização e translocação de nutrientes em milho submetido a dois níveis de adubação nitrogenada. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 26.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 10.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 7.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO: AVALIAÇÃO DAS CONQUISTAS: BASE PARA ESTRATÉGIAS FUTURAS, 5., 2004. Viçosa.

MENDONÇA, M. M.; URQUIAGA, S. S.; REIS, V. M. Variabilidade genotípica de milho para acumulação de nitrogênio e contribuição da fixação biológica de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 41, n. 11, p. 1681-1685, 2006.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from indian sugar cane varieties. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.29, n.2, p.157-164, 1999.

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

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.63, n.7, p.366-370, 1997.

OLIVEIRA, A.L.M. et al. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v.284, p.23-32, 2006.

PAVINATO, P. S. ; RESTELATO, R. ; SARTOR, L. R. ; PARIS, W. . Production and nutritive value of ryegrass (cv. Barjumbo) under nitrogen fertilization. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, p. 230-237, 2014.

PEDROSO, C. E. S.; et al. Comportamento de ovinos em gestação e lactação sob pastejo em diferentes estágios fenológicos de azevém anual. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.33, n.5, p.1340-134. 2004.

REIS JÚNIOR, F.B. et al. 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.

REIS, V.M. et al. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **CRC Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v.19, p.227-247, 2000.

ROBERTO, V.M.O.; SILVA, C.D.; LOBATO, P.N. Resposta da cultura do milho à aplicação de diferentes doses de inoculante (*Azospirillum brasilense*) via semente. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28., 2010. Goiânia.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances** v. 17, p. 319 – 339, 1999.

ROSOLEM, C. A. **Interação do potássio com outros íons**. 2005. In: Simpósio sobre potássio na agricultura brasileira, 2., 2005, São Pedro. Anais... Piracicaba: Potafôs. 239-260.

SALAMONE, I.E.G.; DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.21, p.193- 196, 1996.

STRECK, E.V.; KÄMPF, N.; DALMOLIN, R.S.D.; KLAMT, E.; NASCIMENTO, P.C.; SCHNEIDER, P.; GIASSON, E. & PINTO, L.F.S. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2.ed. Porto Alegre, EMATER/RS-ASCAR, 2008. 222p.

UMBREIT, W.W.; BURRIS, R. H.; STEAUFFER, J.F. **Manometric and biochemical techniques**. 5<sup>th</sup> ed. Minneapolis: Burges, 387p. 1972.

VALE, F.R.; NOVAIS, R.F.; BARROS, N.F. & MILAGRES, B.G. Absorção de nitrato e amônio por raízes intactas de milho pré-tratadas com alumínio. **Revista Brasileira de ciência do solo**, n.8, p.215-218, 1984.

VERONA, D.A. et al. **Tratamento de sementes de milho com Zeavit®, Stimulate® e inoculação com *Azospirillum* sp.** In: Congresso nacional de milho e sorgo, 28, 2010.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A adubação nitrogenada aumentou a área foliar, relação folha:colmo e o número de perfilhos do azevém.

A inoculação com *Azospirillum brasilense* potencializou o perfilhamento do azevém com, no mínimo, 50 Kg.ha<sup>-1</sup> da adubação nitrogenada recomendada.

A inoculação com *Azospirillum brasilense*, independente do nível de adubação nitrogenada, não influenciou o desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular aumentando apenas os teores de fósforo acumulado.

## 6. ANEXOS

|  |   |  |
|--|---|--|
| CEBEMOS DE STOLLER DO BRASIL LTDA OS PRODUTOS CONSTANTES DA NOTA FISCAL INDICADA AO LADO   |   | NF-e<br>N. 000038209<br>SÉRIE 1  |
| DATA DE RECEBIMENTO  | IDENTIFICAÇÃO E ASSINATURA DO RECEBEDOR - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS   |  |
| <b>Identificação do emitente</b><br><b>STOLLER DO BRASIL LTDA</b><br>ROD SP 332 KM 136, 138<br>Itapavussu Cep:13150-000<br>COSMOPOLIS/SP<br>Fone: 19 551936728288<br>http://www.stoller.com.br<br>info@stoller.com.br; fiscal@stoller.com.br   |   |  |
| <b>DANFE</b><br>DOCUMENTO AUXILIAR DA<br>NOTA FISCAL ELETRÔNICA<br>0-ENTRADA 1<br>1-SAÍDA<br>N. 000038209<br>SÉRIE 1<br>FOLHA 01/01  |   | <br><b>CHAVE DE ACESSO DA NF-E</b><br>3513 0554 9552 6100 0118 5500 1000 0382 0910 0111 3673<br>Consulta de autenticidade no portal nacional da NF-e<br>www.nfe.fazenda.gov.br/portal ou no site da SEFAZ Autorizada |
| MUNICÍPIO DA OPERAÇÃO<br>PELOTAS PARA TESTE  |   | PROTOCOLO DE AUTORIZAÇÃO DE USO<br>135130303937922 23/05/2013 14:05:41   |
| CREAÇÃO ESTADUAL<br>1024729118   | INSC. ESTADUAL DO SUBST. TRIB.  | CNPJ<br>54.995.261/0001-18   |
| <b>DESTINATÁRIO/REMETENTE</b><br>RAZÃO SOCIAL<br>UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS<br>ENDEREÇO<br>CAMPUS UNIVERSITARIO, SN, PRO REITORIA ADMIN.<br>BAIRRO/DISTRITO<br>CAMPUS UNIVERSITARIO<br>CEP<br>98160-000<br>DATA DE EMISSÃO<br>23/05/2013<br>DATA ENTRADA/SAÍDA<br>23/05/2013<br>HORA ENTRADA/SAÍDA                    |   |  |
| MUNICÍPIO<br>PELOTAS   | UF<br>RS  | INSCRIÇÃO ESTADUAL<br>2351004580   |
| <b>VALORES DO IMPOSTO</b><br>VALOR DE CÁLCULO DO ICMS<br>14,70<br>VALOR DO ICMS<br>1,76<br>BASE DE CÁLCULO DO ICMS SUBSTITUIÇÃO<br>VALOR DO ICMS SUBSTITUIÇÃO<br>VALOR TOTAL DOS PRODUTOS<br>36,75   |   |  |
| VALOR DO FRETE   | VALOR DO SEGURO   | DESCONTO   |
| OUTRAS DESPESAS ACESSÓRIAS   |   | VALOR DO IPI   |
| VALOR TOTAL DA NOTA<br>36,75   |   |  |
| <b>TRANSPORTADOR/VOLUMES TRANSPORTADOS</b><br>RAZÃO SOCIAL<br>CARLOS FERNANDO CARON<br>ENDEREÇO<br>R. DOVIA SP 332 KM 138<br>MUNICÍPIO<br>COSMOPOLIS<br>UF<br>SP<br>INSCRIÇÃO ESTADUAL<br>ISENTO<br>FRETE POR CONTA<br>DE-EMITENTE<br>CÓDIGO ANTT<br>PLACA DO VEÍCULO<br>HHS9217<br>UF<br>MG<br>CNPJ/CPF<br>018.960.088-24 |   |  |
| QUANTIDADE   | ESPECIE<br>VOLUMES  | MARCA  |
| NUMERAÇÃO  |   | PESO BRUTO<br>1,0000   |
|  |   | PESO LÍQUIDO<br>0,5000   |
| <b>ITENS DO PRODUTO / SERVIÇO</b>  |   |  |
| 3. PROD<br>035V-1  | DESCRIÇÃO DO PROD./SERV.<br>MASTERFIX L<br>GRAMINEAS 0,5 LITRO<br>(INOCULANTE LIQUIDO<br>- CEPAS ABV5 E ABV6<br>(UFPR) -<br>CONCENTRAÇÃO MNIMA:<br>200 ML DE UFC/ML<br>REG MAPA SP-08784<br>10172-3 - Lote<br>n.1-12268 -<br>Embalagem: Caixa com<br>70 doses | NCM/SH<br>30029099 020<br>CST<br>6949<br>UN<br>DM<br>QUANT.<br>5,000<br>V.UNITARIO<br>7,3500<br>V.TOTAL<br>36,75<br>BC.ICMS<br>14,70<br>V.ICMS<br>1,76<br>V.IPI<br>0,00<br>A.ICMS<br>12%<br>A.IPI  |
| <b>CÁLCULO DO ISSQN</b><br>CRIAÇÃO MUNICIPAL<br>10<br>VALOR TOTAL DOS SERVIÇOS<br>BASE DE CÁLCULO DO ISSQN<br>VALOR DO ISSQN   |   |  |
| <b>ISS ADICIONAIS</b><br>DEDUÇÕES COMPLEMENTARES<br>local: 135130303937922<br>PELOTAS PARA TESTE / ENDEREÇO DE ENTREGA: PELOTAS/RS RUA MARECHAL FLORIANO, N<br>10172-3 CEP: 96018-440 BAIRRO: CENTRO A/C DR. OTONIEL GETER LAUZ FERREIRA - BASE DE<br>CÁLCULO DO ISSQN: 135130303937922                                    |   |  |
| RESERVADO AO FISCO   |   |  |

**Anexo 01.** Nota fiscal de compra de Masterfix L Gramíneas inoculante líquido *Azospirillum brasilense* cepas AbV5 e AbV6. Pelotas, 2015.





**Anexo 02.** Rótulo de Masterfix L Gramíneas inoculante líquido *Azospirillum brasilense* cepas AbV5 e AbV6. Pelotas, 2015.