

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

Dissertação



**FORMAS DE APLICAÇÃO de *Azospirillum brasilense* NA PRODUÇÃO DE
FORRAGEM DO CAMPO NATIVO**

Herlon Thadeu da Silva Mendel

Pelotas, 2024

Herlon Thadeu da Silva Mendel

**FORMAS DE APLICAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* NA PRODUÇÃO DE
FORRAGEM DO CAMPO NATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Pastagens).

Orientador: Prof. Dr. Otoniel Geter Lauz Ferreira

Pelotas, 2024

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

M537f Mendel, Herlon Thadeu da Silva

Formas de aplicação de *azospirillum brasilense* na produção de forragem do campo nativo [recurso eletrônico] / Herlon Thadeu da Silva Mendel ; Otoniel Geter Lauz Ferreira, orientador. — Pelotas, 2024.
47 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2024.

1. Bioinsumos. 2. Bioma Pampa. 3. Fixação Biológica de Nitrogênio. 4. Campos Sulinos. 5. Nitrogênio. I. Ferreira, Otoniel Geter Lauz, orient. II. Título.

CDD 633.2098165

Herlon Thadeu da Silva Mendel

**FORMAS DE APLICAÇÃO de *Azospirillum brasilense* NA PRODUÇÃO DE
FORRAGEM DO CAMPO NATIVO**

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 04/09/2024

Banca examinadora:

Prof. Dr. Otoniel Geter Lauz Ferreira (Orientador)

Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Mateus da Silveira Pasa

Doutor em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Carlos Eduardo da Silva Pedroso

Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Stefani Macari

Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dedicatória

Dedico essa dissertação primeiramente a Deus, que sempre me guia e me protege, e a minha família por todo apoio.

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que me apoiaram durante esse ciclo, de uma forma ou outra, em especial a meu orientador Otoniel Ferreira, pelos ensinamentos durante todo esse período.

A todos os professores que tive a oportunidade de cursar suas disciplinas, contribuindo para o meu desenvolvimento técnico, profissional e pessoal, agradeço a oportunidade.

À UFPel, por mais essa oportunidade que me foi proporcionada. Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

E a minha namorada, Maria Eduarda, por todo apoio durante esse período.
Obrigado a todos.

Epígrafe

Seja a mudança que você quer ver no mundo.

Mahatma Gandhi.

Resumo

MENDEL, Herlon Thadeu da Silva. **Formas de aplicação de *Azospirillum brasilense* na produção de forragem do campo nativo**. Orientador: Otoniel Geter Lauz Ferreira. 2024. 47 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia-Pastagens) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

O *Azospirillum brasilense* é uma bactéria que tem a capacidade de melhorar o aproveitamento do nitrogênio e estimular o crescimento radicular de gramíneas, porém os estudos sobre seu uso têm focado nas plantas cultivadas. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a resposta do campo nativo ao uso desse bioinsumo sob duas formas de aplicação, no sulco e pulverização foliar. O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertence ao DZ/FAEM/UFPEL, em amostras de campo natural na forma de monólitos dispostos em bandejas plásticas. Foram impostos três tratamentos experimentais alocados em delineamento de blocos completos ao acaso com quatro repetições: 1) Controle (sem aplicação de *A. brasilense*); 2) *A. brasilense* aplicado na forma de aspersão foliar; 3) *A. brasilense* aplicado na forma de aspersão em sulco no solo. O primeiro corte para avaliação da forragem se deu quando a altura média das plantas alcançou 12cm, tendo sido as mesmas rebaixadas para 6cm. Os cortes subsequentes foram realizados quando a altura média das plantas alcançou 10cm, tendo sido as mesmas rebaixadas para 5cm. Em cada corte foram determinadas as massas de forragem verde e seca, o teor de matéria seca, a taxa de acúmulo e a composição botânica dos componentes da amostra (gramíneas, leguminosas e outras espécies). Os resultados foram analisados por análise de variância e teste de comparação de médias de Tukey ($P \leq 0,05$), considerando-se a possível interação dos três cortes x três formas de aplicação de *A. brasilense*. Os resultados mostraram que o primeiro corte e na soma dos três cortes o AZ aplicado no Solo teve maior eficiência na produção de massa de forragem verde e massa de forragem seca, porém, esses maiores valores foram definidos por um maior percentual de outras sp. O AZ aplicado via foliar proporcionou menor intervalo entre cortes quando comparado ao controle e ao AZ Solo. A inoculação de *A. brasilense* em campo nativo via aspersão foliar ou diretamente no solo foi efetiva, alterando a massa de forragem produzida. A inoculação diretamente no solo influencia a frequência de espécies de diferentes famílias botânicas, aumentando a diversidade vegetal. O uso de *A. brasilense* sobre campo nativo é perfeitamente expectável, contudo, devido à complexidade vegetal presente nesse ambiente outros estudos devem ser conduzidos de modo a detalhar seus efeitos.

Palavras-chaves: Bioinsumos; Bioma Pampa; Fixação Biológica de Nitrogênio; Campos Sulinos; Nitrogênio.

Abstract

MENDEL, Herlon Thadeu da Silva. **Methods of application of *Azospirillum brasilense* in the production of forage in the native field.** Advisor: Otoniel Geter Lauz Ferreira. 2024. 47 f. Dissertation (Master in Zootechnics - Pastures) – Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2024.

Azospirillum brasilense is a bacterium that can improve nitrogen utilization and stimulate root growth in grasses; however, studies on its use have focused on cultivated plants. This study aimed to evaluate the response of native grasslands to the use of this bio-input in two application methods: in-furrow and foliar spray. The experiment was conducted in a greenhouse at DZ/FAEM/UFPEL, using native grassland samples as monoliths placed in plastic trays. Three experimental treatments were applied in a randomized complete block design with four replications: 1) Control (no application of *A. brasilense*); 2) *A. brasilense* applied as a foliar spray; 3) *A. brasilense* applied in-furrow. The first forage evaluation cut was made when the average plant height reached 12 cm, with the plants being cut back to 6 cm. Subsequent cuts were made when the average plant height reached 10 cm, with the plants being cut back to 5 cm. For each cut, the green and dry forage mass, dry matter content, accumulation rate, and botanical composition of the sample components (grasses, legumes, and other species) were determined. The results were analyzed using analysis of variance and Tukey's mean comparison test ($P \leq 0.05$), considering the possible interaction between the three cuts and the three *A. brasilense* application methods. The results showed that both in the first cut and the sum of the three cuts, *A. brasilense* applied in the soil had greater efficiency in producing green forage mass and dry forage mass; however, these higher values were driven by a greater percentage of other species. *A. brasilense* applied via foliar spray resulted in shorter intervals between cuts compared to the control and soil-applied *A. brasilense*. The inoculation of *A. brasilense* in native grasslands, whether by foliar spray or directly in the soil, effectively altered the mass of forage produced. Direct soil inoculation influenced the frequency of species from different botanical families, increasing plant diversity. The use of *A. brasilense* on native grasslands is entirely feasible; however, due to the plant complexity in this environment, further studies should be conducted to detail its effects.

Keywords: Bioinputs; Pampa Biome; Biological Nitrogen Fixation; Southern Grasslands; Nitrogen.

Lista de Figuras

Figura 1 - Temperatura mínima e máxima em graus célsius durante o experimento ... 24

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Análise de solo e interpretação realizada anteriormente ao experimento....	25
Tabela 2 - Massa de forragem verde kg ha ⁻¹ por corte em cada tratamento.	27
Tabela 3 – Data do corte, intervalo entre cortes – IC (dias) e altura (cm) do dossel da pastagem no momento do corte de cada tratamento e preconizada.....	28
Tabela 4 - Massa de forragem seca kg ha ⁻¹ por corte em cada tratamento.....	29
Tabela 5 - Taxa de acúmulo de forragem (TAF) e conteúdo de matéria seca (MS) por corte.	31
Tabela 6 – Taxa de acúmulo de forragem – TAF(Kg MS/ha/dia) e percentuais de cobertura do solo e presença de gramíneas, leguminosas e outras espécies nos tratamentos experimentais (média dos cortes).....	33

Lista de Anexos

Anexo A – Foto dos monólitos e distribuição dos blocos experimentais.	43
Anexo B – Foto do temporizador para irrigação automática.....	43
Anexo C – Foto gotejador tipo estaca.	44
Anexo D – Foto da aplicação de Azospirillum com pulverizador manual.	44
Anexo E – Fotos do quadro amostral 10x40cm.....	45

Sumário

1	Introdução	12
2	Revisão bibliográfica	14
2.1	Campo Nativo: Características e Melhoramento	14
2.2	Importância do nitrogênio para plantas forrageiras	15
2.3	Bioinsumos e fixação biológica de nitrogênio	16
2.4	Bactérias fixadoras	18
2.5	Fisiologia da fixação biológica de N em gramíneas.....	20
2.6	Formas de utilização e aplicação (formas de inoculação)	21
3	Material e métodos	24
4	Resultados e discussão	27
5	Conclusões	34
6	Considerações finais	35
	Referências	36
	Anexos	42

1 Introdução

Diversas práticas têm sido propostas para aumentar o potencial produtivo dos campos nativos, como a adubação, destacando-se a adubação fosfatada e a calagem, que têm demonstrado aumentar a produção de matéria seca Somavilla *et al.* (2021). Além disso, a adubação nitrogenada tem apresentado resultados promissores, conforme relatado por Fedrigo *et al.* (2021), evidenciando uma maior taxa de acúmulo de forragem quando associada à adubação fosfatada.

O nitrogênio (N) é um nutriente essencial necessário para todos os organismos vivos e frequentemente limitante para a produção, especialmente em sistemas forrageiros. (Dartora *et al.* 2013; Vieira 2017) destacam sua importância, uma vez que o N é fonte de proteínas, ácidos nucleicos e outros constituintes celulares. Embora o N seja abundante na atmosfera, as plantas não podem utilizá-lo diretamente, portanto, é necessária a transformação do N atmosférico em amônia ou nitrato, processo conhecido como nitrificação (Freitas; Rodrigues 2010). Esse processo é realizado por bactérias que fazem quimiossíntese, ou seja, que utilizam a energia liberada na nitrificação para sintetizar suas substâncias orgânicas (Vieira, 2017).

Nesse sentido, buscam-se práticas que melhorem a eficiência de absorção de N pelas plantas, destacando-se a fixação biológica de nitrogênio (FBN), baseada em bactérias capazes de captar o N atmosférico e disponibilizá-lo para as plantas, reduzindo assim a necessidade de insumos e melhorando seu aproveitamento (Baldani *et al.* 1997; Guimarães; Baldani; Baldani, 2003).

O *Azospirillum brasilense* é uma espécie de bactéria fixadora de N que promove o crescimento tanto da parte aérea quanto das raízes das plantas, devido à produção de fitormônios Hungria *et al.* (2010), o que, por sua vez, favorece a absorção de água e nutrientes pela superfície do solo (Freitas; Rodrigues, 2010; Nakao *et al.* 2018a).

Compreender os fatores e processos biológicos que controlam a fixação biológica de nitrogênio é crucial para produtores e pesquisadores, pois esse conhecimento permite adequar o manejo visando aumentar a eficiência da adubação nitrogenada e melhorar os rendimentos das culturas (Fagan *et al.* 2007).

Nesse contexto o *Azospirillum brasilense* se apresenta como uma alternativa para o campo nativo, possibilitando aumento da produtividade, além de contribuir como uma forma mais econômica e ambientalmente mais sustentável de introdução de

nitrogênio no ecossistema pastoril. Assim, considerando a inexistência de estudos com *Azospirillum brasilense* em campo nativo, esse trabalho tem como objetivo avaliar a resposta do campo nativo ao uso desse bioinsumo sob duas formas de aplicação, no sulco e pulverização foliar.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Campo Nativo: Características e Melhoramento

O território brasileiro é constituído por seis biomas distintos, entre os quais se destaca o Bioma Pampa, caracterizado por vastas planícies e uma biodiversidade rica, desempenhando um papel fundamental tanto no contexto agrícola quanto ambiental Viana *et al.* (2021). O Campo Nativo (CN), componente integral desse bioma, representa uma fonte de potencial produtivo inestimável, porém ainda subexplorada. Este ecossistema, notável por sua diversidade vegetal, que abriga cerca de 400 espécies de gramíneas e 150 espécies de leguminosas Boldrini (1997), e pela sua capacidade de adaptação a condições climáticas adversas, oferece oportunidades significativas para o desenvolvimento sustentável (Carvalho *et al.* 2006).

A pecuária é a principal atividade econômica associada ao campo nativo, que oferece pasto para gado sem necessidade de grandes intervenções agrícolas. No entanto, o manejo inadequado, como o superpastejo e falta de adubação, podem degradar essas áreas (Fisher, 2019). A expansão da monocultura (como soja) e da silvicultura tem impactado significativamente a vegetação nativa, com a conversão de grandes áreas para uso agrícola mais intensivo, causando perda de biodiversidade e esgotamento do solo (Marin, 2019).

O melhoramento do campo nativo é uma prática que busca aumentar a produtividade das pastagens naturais sem comprometer a sustentabilidade ecológica. As principais técnicas incluem:

- **Sobressemeadura:** Introdução de novas espécies forrageiras sobre pastagens naturais para diversificar e enriquecer a cobertura vegetal (Carvalho *et al.* 2006).
- **Adubação:** Uso de fertilizantes para compensar a baixa fertilidade natural do solo (Azambuja *et al.* 2019).
- **Manejo rotacionado:** Alternância de áreas de pasto para evitar o sobrepastoreio e permitir a regeneração das plantas.
- **Diferimento:** Exclusão do pastejo em determinada área e época, por um determinado período, permitindo um acúmulo de biomassa maior (Quadros *et al.* 2019).

Pesquisas sobre o Pampa também se concentram na recuperação de áreas degradadas e no uso sustentável do campo. A restauração ecológica envolve o uso de espécies nativas para reverter danos, mas enfrenta desafios devido à falta de oferta comercial de sementes apropriadas. Estudos mostram que muitas plantas nativas apresentam bom potencial de germinação, sugerindo que agricultores poderiam usá-las sem recorrer a produtos químicos ou insumos externos.

No entanto, é crucial ressaltar a importância da conservação e manejo adequado dessas áreas. Estudos como o de Pillar *et al.* (2009) enfatizam a necessidade de políticas públicas e práticas de gestão que valorizem a conservação dos campos nativos do Pampa, garantindo sua preservação a longo prazo e o equilíbrio entre a produção agropecuária e a conservação da biodiversidade.

2.2 Importância do nitrogênio para plantas forrageiras

Alguns minerais são reconhecidos como essenciais para o crescimento vegetal, definidos como aqueles intrínsecos à estrutura ou metabolismo da planta, cuja ausência pode resultar em anormalidades severas no crescimento, desenvolvimento e reprodução vegetal, chegando até a impedir a conclusão do ciclo de vida da planta (Taiz *et al.* 2017).

O nitrogênio (N) é amplamente reconhecido como um desses elementos essenciais. Epstein (1972, 1999 *apud* Taiz *et al.* 2017) sugere que a maioria das plantas requer aproximadamente 1,5% da concentração de nitrogênio na matéria seca para um desenvolvimento saudável. Esse elemento desempenha um papel fundamental na síntese de proteínas e pigmentos nos tecidos vegetais, contribuindo significativamente para a produtividade das culturas (Freitas *et al.* 2019).

Carámbula (2003) observa que o nitrogênio é frequentemente o elemento limitante para a produtividade agrícola em diferentes sistemas, incluindo sistemas agrícolas-pecuários e pastagens. Lemaire e Chapman (1996) destacam a importância da disponibilidade de nitrogênio na produção de plantas forrageiras, ressaltando sua influência nas características morfogênicas e estruturais das plantas.

Dada a tendência de solos brasileiros apresentarem baixos teores de nitrogênio disponível, a adubação nitrogenada torna-se uma prática essencial. Os fertilizantes inorgânicos se destacam como a principal forma de suplementação desse nutriente no solo (Dartora *et al.* 2013).

Existem três fontes principais para aporte de nitrogênio às plantas: mineralização do solo e de resíduos vegetais e animais, aplicação de fertilizantes nitrogenados e consórcio com leguminosas (Carámbula, 2003). A resposta à adição de nitrogênio varia entre espécies forrageiras, com algumas tropicais respondendo positivamente a doses específicas, enquanto outras têm uma faixa de resposta mais ampla (Reis; Bernardes; Siqueira, 2023).

Estudos como o de Lupatini *et al.* (1998) demonstram os efeitos positivos da adubação nitrogenada em consórcios de aveia e azevém, evidenciando aumentos na taxa de acúmulo de matéria seca e na carga animal. Resultados similares foram encontrados em experimentos com campo nativo, onde adubações e sobressemeaduras resultaram em significativos incrementos na produção de forragem (Ferreira *et al.* 2011).

Entretanto, é importante notar que apenas uma fração dos fertilizantes aplicados é efetivamente utilizada pelas plantas, devido a processos de perda como volatilização, lixiviação e desnitrificação (Taiz *et al.* 2017). A recuperação de nitrogênio é ainda mais limitada por tais perdas, com estratégias como aplicação em solo seco e o uso de inibidores de urease sendo recomendadas para minimizar esses efeitos (Prado, 2008).

O ciclo do nitrogênio em pastagens envolve diversas etapas, incluindo a decomposição da serrapilheira, a excreção animal, a amonificação, a nitrificação, a imobilização por microrganismos e a utilização pelas plantas (Reis; Bernardes; Siqueira, 2023). Essa complexidade ressalta a importância de estratégias de manejo adequadas para otimizar a disponibilidade e utilização do nitrogênio em sistemas agrícolas.

2.3 Bioinsumos e fixação biológica de nitrogênio

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é um processo crucial que se estabelece por meio de uma simbiose entre plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio. Essa interação promove a conversão do nitrogênio atmosférico em uma forma utilizável pelas plantas, garantindo um suprimento constante deste nutriente essencial.

O nitrogênio é captado do ar e fixado por bactérias conhecidas como diazotróficas, as quais são naturalmente encontradas em diversos tipos de solo. Essas bactérias apresentam especificidade em relação às espécies vegetais, sendo exemplos comuns as simbioses entre plantas da família *Leguminosae* e bactérias diazotróficas, denominadas rizóbios (Embrapa, 1990).

Cerca de 78% dos gases atmosféricos consistem em nitrogênio gasoso (N^2), o qual não pode ser diretamente utilizado como nutriente por animais ou plantas, devido à sua tripla ligação. No entanto, alguns microrganismos presentes no solo, como arqueobactérias e principalmente bactérias, conseguem utilizar o N^2 atmosférico, graças à enzima dinitrogenase, capaz de quebrar essa tripla ligação e convertê-lo em amônia, uma forma assimilável pelas plantas. Essas bactérias, também conhecidas como diazotróficas ou fixadoras de N^2 , estabelecem associações com diversas espécies de plantas em diferentes graus de especificidade, sendo classificadas como bactérias associativas, endofíticas ou simbióticas (Hungria; Campo; Mendes, 2007).

A FBN representa uma abordagem sustentável para fornecer nitrogênio às culturas, substituindo ou complementando a adubação nitrogenada mineral. Esse processo é particularmente eficiente para suprir o nitrogênio necessário às leguminosas, como a soja, eliminando a necessidade de aplicação de fertilizantes nitrogenados. Isso se deve à capacidade das bactérias simbióticas associadas às leguminosas de fixarem o nitrogênio atmosférico, atendendo à demanda dessas culturas (Hungria, 2011).

A fixação simbiótica desempenha um papel fundamental na disponibilização de nitrogênio biológico em muitos sistemas agrícolas, fornecendo a maior parte do nitrogênio requerido pelas leguminosas. Essa capacidade é encontrada em diversos grupos de microrganismos, muitas vezes acompanhada pela formação de estruturas especializadas, como os nódulos formados pelos rizóbios, que são altamente sensíveis ao oxigênio (Hungria; Campo; Mendes, 2007).

Na associação simbiótica, a fixação biológica do N^2 ocorre principalmente com bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, e suas espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* (Taiz; Zeiger, 2004).

Além das leguminosas, outras plantas não leguminosas, como arroz, trigo, milho, sorgo e cana-de-açúcar, têm demonstrado potencial para a FBN quando inoculadas com bactérias diazotróficas. Por exemplo, o *Azospirillum brasilense*, conforme observado por Nakao *et al.* (2018b), beneficia as gramíneas ao auxiliar no desenvolvimento radicular, o que, por sua vez, favorece a absorção de água e nutrientes do solo.

Em experimentos conduzidos por Hungria; Nogueira; Araujo (2016) a inoculação de *Urochloa brizantha* com *Azospirillum brasilense* resultou em um aumento de 4,6% na produção de biomassa, enquanto a associação com adubação nitrogenada (40 kg N.ha⁻¹) aumentou a produção em 24,7%.

Outro estudo realizado pela Embrapa Soja, envolvendo estirpes de *A. brasilense* e *A. lipoferum* em culturas de milho e trigo, demonstrou aumento significativo de 24 a 30% no rendimento de grãos de milho em comparação com o tratamento controle, sem inoculação (Hungria *et al.* 2010).

Em um experimento envolvendo *Cynodon* cv Coastcross inoculado com *A. brasilense*, com ou sem adubação nitrogenada (100 kg.ha⁻¹ ano), foi observado aumento na produção de forragem nos tratamentos inoculados, mesmo sem adição de nitrogênio, em cinco dos sete cortes realizados (Aguirre *et al.* 2020a).

2.4 Bactérias fixadoras

As bactérias fixadoras de nitrogênio são categorizadas em três grupos distintos: as de vida livre, que realizam a fixação do nitrogênio para seu próprio uso; as associativas, que incluem as endofíticas, obrigatórias ou facultativas, contribuindo para o desenvolvimento vegetal sem estabelecer simbiose; e por fim, as simbióticas, que mantêm uma relação mais íntima com a planta, formando estruturas especializadas chamadas nódulos (Dionísio *et al.* 2016; Freitas; Rodrigues, 2010; Ladha *et al.* 2022; Reis, Baldani, Baldani, 2006).

Quando essas bactérias residem dentro da planta hospedeira, são referidas como associativas endofíticas, podendo ser obrigatórias ou facultativas, dependendo do nível de interação com a planta. Essas bactérias habitam os tecidos internos das plantas em pelo menos uma fase do seu ciclo de vida, sem causar danos à planta hospedeira.

As bactérias associativas podem ser subdivididas em dois grupos com base em suas especificidades e na intensidade de sua relação com a planta: as endofíticas facultativas, que colonizam tanto a rizosfera quanto o interior das raízes, e as endofíticas obrigatórias, que habitam exclusivamente o interior das raízes e nichos específicos da planta, onde realizam a fixação do N² atmosférico através do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) e compartilham-no com a planta (Mariano *et al.* 2004; Reis, Baldani, Baldani, 2006).

A colonização endofítica das plantas por bactérias confere vantagens ecológicas, oferecendo um ambiente protegido contra condições extremas encontradas na rizosfera. Essa colonização proporciona às bactérias um nicho estável e recursos nutricionais, contribuindo para a saúde e o crescimento das plantas (Lodewyckx *et al.* 2002).

O grupo das bactérias associativas engloba diversos gêneros, incluindo *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* e *Azospirillum*, entre outros, todos capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio (Branco; Júnior, 2022; Freitas *et al.* 2019b).

Na associação não simbiótica, não ocorre penetração das bactérias nas células das raízes nem formação de nódulos. Em vez disso, esses microrganismos colonizam a rizosfera, promovendo o crescimento vegetal, especialmente do sistema radicular, o que tem sido apontado como uma das vantagens dessa associação, particularmente com bactérias do gênero *Azospirillum* (Branco; Júnior, 2022).

O gênero *Azospirillum* compreende as chamadas bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), que consistem em microrganismos procarióticos conhecidos por promoverem o crescimento das plantas. Atualmente, esse gênero é composto por 14 espécies identificadas (Reis; Pedraza; Teixeira, 2010).

De acordo com Hungria; Nogueira; Araujo (2016), a utilização de bactérias diazotróficas, como *Azospirillum brasilense*, é uma estratégia promissora para a recuperação de pastagens e o aumento da produtividade da forragem. Essas bactérias beneficiam as plantas ao incorporar nitrogênio atmosférico no solo via fixação biológica, além de estimular a produção de fitormônios (Freitas *et al.* 2019b).

Os efeitos benéficos da associação entre *Azospirillum* e as plantas incluem o estímulo ao aumento dos pelos radiculares absorventes, o que aumenta a absorção de nutrientes, a produção de nitritos e de hormônios vegetais como giberelinas, citocininas e auxinas, que desempenham papéis importantes no crescimento e desenvolvimento das plantas (Fukami; Cerezini; Hungria, 2018; Guimarães *et al.* 2023).

Entre as bactérias endofíticas obrigatórias está *Herbaspirillum seropedicae*, uma espécie diazotrófica que foi isolada da rizosfera e da superfície de plantas como milho, arroz e sorgo, e mais recentemente foi descrita colonizando bananeiras e abacaxizeiros (Lopes; Schüler, 2019).

Nas fixações simbióticas, os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos que conferem várias vantagens às plantas, como a diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de fitopatógenos através de competição ou produção de compostos antagônicos, o que se mostra uma alternativa eficaz em comparação com os tratamentos químicos (Rodrigues, 2009).

As bactérias do gênero *Bacillus* são abundantes na rizosfera e têm sido extensivamente estudadas por sua capacidade de promover o crescimento vegetal, visando a estimular mecanismos benéficos como a nodulação de leguminosas, a fixação biológica de nitrogênio e a absorção de nutrientes. Algumas espécies desse gênero estão sendo utilizadas como insumos agrícolas (Glick, 2012).

As bactérias do gênero *Enterobacter* são encontradas em diversos ambientes e ganham destaque por suas habilidades, incluindo a fixação de nitrogênio, a produção de fitohormônios como etileno e auxinas, e seu papel no crescimento e desenvolvimento das plantas, tanto como endofíticas quanto na rizosfera (Ramesh *et al.* 2014; Santi Ferrara, 2010).

Dada a importância do nitrogênio, o emprego de técnicas que promovam a fixação biológica de N^2 através de bactérias diazotróficas em gramíneas forrageiras representa uma estratégia eficaz e econômica. Isso possibilita a redução na aplicação de fertilizantes nitrogenados, aumentando a sustentabilidade e diminuindo os custos associados (Sampaio, 2020).

A eficiência na utilização do nitrogênio pela planta considera os processos de absorção e metabolização deste elemento, que pode ser absorvido na forma de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+), sendo incorporado em aminoácidos tanto na raiz quanto na parte aérea da planta, através de transportadores específicos presentes na membrana plasmática das células da epiderme e do córtex radicular (Bredemeier; Mundstock, 2000).

2.5 Fisiologia da fixação biológica de N em gramíneas

A fixação biológica de nitrogênio desempenha um papel crucial no ciclo do nitrogênio, sendo essencial para o crescimento e desenvolvimento de diversas plantas, especialmente as gramíneas, uma família que engloba cereais de importância fundamental, como arroz, milho, trigo e cevada, bem como plantas forrageiras essenciais para a pecuária. As bactérias diazotróficas, dotadas da capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico, desempenham um papel central nesse processo. A fixação de N^2 em NH_3 ocorre através de uma metaloenzima, exigindo considerável gasto energético na forma de ATP, o que estimula o crescimento vegetal e o desenvolvimento radicular, resultando em maior produtividade e concentrações de nitrogênio (Vogel; Martinkoski; Ruzicki, 2014).

Durante a fixação biológica de N, a tripla ligação do N² é rompida, demandando uma quantidade significativa de energia, liberada pela oxidação do ATP, para que os átomos de nitrogênio sejam ligados a átomos de hidrogênio, resultando na formação de amônio (NH₃). A reação é representada pela equação:



Cada molécula de N² produz duas moléculas de amônio (NH₃), consumindo oito elétrons, oito prótons e dezesseis moléculas de ATP para gerar os produtos mencionados (Branco; Júnior, 2022; Prado, 2008).

Na reação catalisada pela nitrogenase, ocorre transferência de elétrons, provenientes de proteínas ferredoxina, que posteriormente são reduzidas com a oxidação do piruvato (Branco; Júnior, 2022; Prado, 2008).

No ambiente citoplasmático das bactérias, o NH₃ é convertido em NH₄⁺, cujo acúmulo inibe a fixação de nitrogênio, levando-o a ser exportado para o interior da célula hospedeira, onde é incorporado em moléculas não tóxicas e posteriormente convertido em compostos assimiláveis pelas plantas, como aminoácidos (Branco; Júnior, 2022).

A nitrogenase é extremamente sensível ao oxigênio, requerendo condições anaeróbias para purificação de seus componentes em sua forma ativa. Nas leguminosas, o transporte de O₂ é mediado pela leghemoglobina, análoga à hemoglobina humana, evitando a dispersão de O₂ no citoplasma da célula (Taiz *et al.* 2017).

Considerando o alto custo energético da fixação biológica de N₂ pela planta, práticas de manejo que estimulem esse processo através de bactérias diazotróficas são fundamentais para promover uma produção agrícola mais sustentável (Branco; Júnior, 2022).

2.6 Formas de utilização e aplicação (formas de inoculação)

No contexto dos experimentos envolvendo *Azospirillum*, é comumente empregado o meio de inoculação líquido, com concentrações variáveis, predominantemente em torno de 10⁸ células por mililitro. A aplicação pode ser realizada diretamente nas sementes, no sulco de plantio ou através de pulverização foliar (Beutler *et al.* 2016; Duarte *et al.* 2020; Fukami *et al.* 2016; Hungria, 2011; Oliveira *et al.* 2018; Reis Junior *et al.* 2003).

Matos; Mota; Cunha (2022) conduziram um estudo com *A. brasilense* utilizando a tecnologia de inoculação no sulco de plantio (TISP) de arroz, com ou sem adubação nitrogenada. Utilizaram inoculante líquido nas doses de 300 mL (TISP) e 100 mL por 50 kg de sementes, além de 100 mL de aditivo protetor por 50 kg de sementes, os resultados indicaram que a combinação de 90 kg N.ha⁻¹ com a inoculação produziu resultados equivalentes a 120 kg N.ha⁻¹ sem inoculação.

Na cultura do milho, diferentes métodos de inoculação com bactérias diazotróficas são avaliados. Moreira; Valadão; Valadão Júnior (2019) investigaram dois métodos de inoculação, no sulco de plantio e via semente, com diferentes doses de N. Observou-se que a aplicação de *Azospirillum* no sulco de semeadura, associada a uma dose específica de N, resultou em altura máxima de planta, enquanto a inoculação na semente não apresentou diferenças nas doses de N, sugerindo que a inoculação no sulco de plantio, combinada com 28,55 kg N.ha⁻¹, teve efeito similar a 70 kg N.ha⁻¹ sem inoculação.

Em estudos com soja (*Glycine max*) sobre inoculação com *Bradyrhizobium* via sulco de semeadura, observou-se produção equivalente à inoculação via semente, com melhorias quando a semente foi tratada com fungicida, devido à menor nodulação e conseqüentemente menor produção na inoculação via semente (Zilli *et al.* 2010).

Aguirre *et al.* (2020b) inocularam estolões de Coastcross com estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* durante a implantação e reinocularam no ano seguinte via pulverização foliar. A inoculação durante a implantação melhorou o acúmulo de forragem, enquanto a reinoculação não influenciou a produção.

Em sorgo, vários estudos têm testado diferentes métodos de inoculação, incluindo tratamento de sementes, aplicação no sulco e pulverização em diferentes estádios da planta. Ventura *et al.* (2020) constataram que a inoculação via semente resultou em melhores desempenhos, com maior comprimento de raiz, número de nós, massa verde e massa seca.

Resultados de inoculação em Azevém (*Lolium multiflorum*) também são evidenciados por Bonadiman *et al.* (2018), onde a inoculação de *Azospirillum* via sementes associada a no mínimo 50 kg N.ha⁻¹ dobrou o número de perfilhos do azevém em comparação com apenas adubação nitrogenada, respectivamente, 0,44 e 0,22 perfilhos por unidade de adubação.

Assim, diversas espécies forrageiras são inoculadas por meio de diferentes métodos, todos apresentando resultados positivos. Contudo, a escolha do método ideal

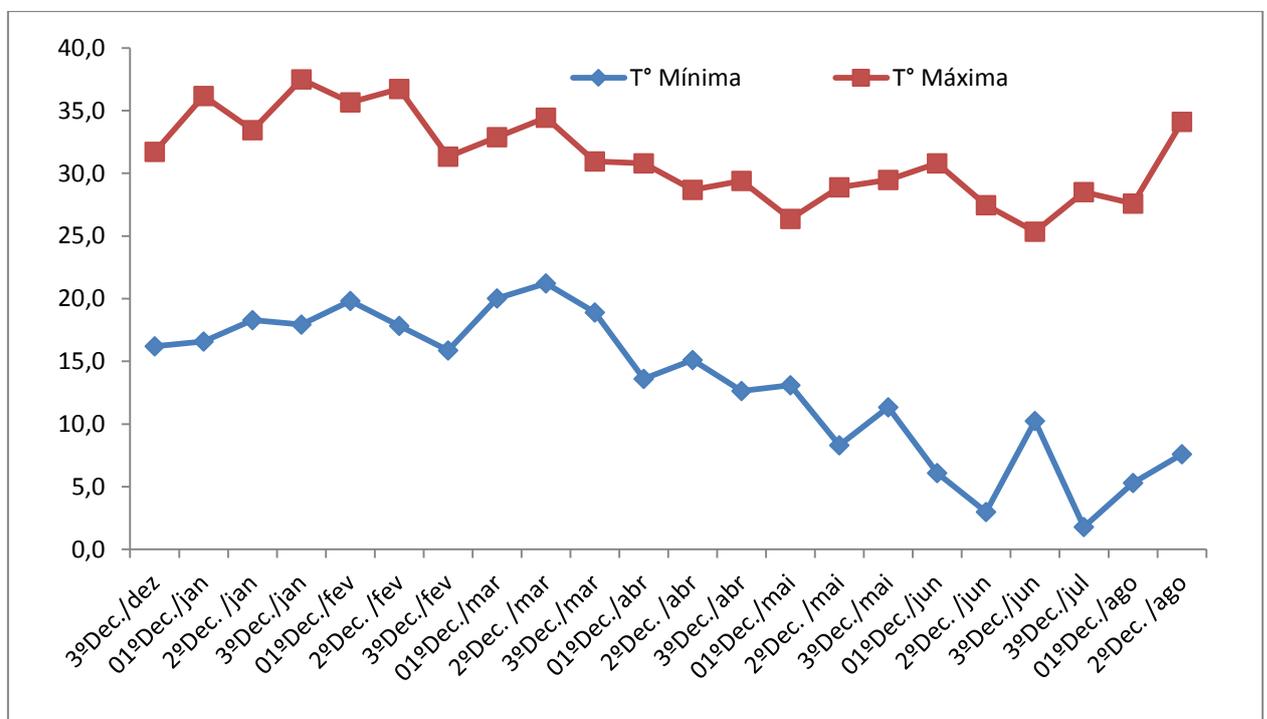
deve considerar as especificidades de cada meio de cultivo e espécie, requerendo a avaliação criteriosa de técnicos e pesquisadores para determinar a melhor abordagem em cada situação.

3 Material e métodos

O experimento foi realizado em casa de vegetação telada 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. Segundo a classificação Köppen, o clima da região é do tipo Cfa (Mota, 1953).

As temperaturas no interior da casa de vegetação durante o período experimental podem ser observadas na figura 1.

Figura 1 - Temperatura mínima e máxima em graus célsius durante o experimento



Amostras de campo natural foram coletadas na forma de monólito no Centro Agropecuário da Palma, Universidade Federal de Pelotas, localizado no município de Capão do Leão - RS, km 535 da BR 116. A área situa-se na região fisiográfica do Rio Grande do Sul denominada Litoral Sul. As coordenadas são: latitude 31°52'00" Sul; longitude 52°21'24" Oeste, e altitude de 7 metros acima do nível do mar.

O solo pertence à unidade de mapeamento Pelotas, classificado como Planossolo Hidromórfico Eutrófico Solódico (Embrapa, 1999). Esta unidade de mapeamento compreende relevos planos, com solos de textura argilosa e medianamente profundos. A maior parte da área apresenta pH ácido (com baixa acidez

nociva), com saturação de bases de baixa a média e teores médios de matéria orgânica. A principal limitação destes solos diz respeito a má drenagem, consequência de um horizonte B impermeável e pouco poroso. A tabela 1 traz a análise química do solo anterior ao início do experimento, bem como sua interpretação.

Tabela 1 - Análise de solo e interpretação realizada anteriormente ao experimento.

pH _{água}	Ca	Mg	Al	H+Al	CTC _{pH7}	Al	V	SMP	MO	Argila	P	K
	cmolc/dm ³					-----%-----			-----%-----		mg/dm ³	
4,5	0,2	1,16	1,0	5,5	7,5	33,3	26	5,8	2,21	14	16,4	44
B	B	A	-	-	B	-	-	-	B	-	A	A

B=Baixo; M=Médio; A=Alto; MA=Muito Alto.

Os monólitos de solo foram acomodados em bandejas plásticas de 50x30x13cm, e mantidos com disponibilidade hídrica próxima a capacidade de campo através de irrigação automática (Anexo A). Para isso utilizou-se um temporizador para irrigação automática ajustado para duas aplicações no intervalo de 12h (5:00 e 17:00) (Anexo B). Com o aumento da temperatura no verão a irrigação passou a ter duração de 15min, reduzindo para 10 ou 5min conforme a troca de estação para o outono (dias mais curtos e temperaturas mais baixas), resultando respectivamente em 0,6mm/vaso 0,4mm/vaso e 0,2mm/vaso por aplicação. Em cada bandeja foram colocados dois gotejadores estaca, para que houvesse adequada distribuição de água na mesma (Anexo C).

O experimento propriamente dito teve início em 01 de dezembro de 2022 quando foi realizado o corte de emparelhamento da vegetação (Resíduo de 5cm) e foram aplicados os tratamentos experimentais, e se encerrou em 30 de março de 2023, quando foi realizado o último corte da forragem, totalizando 119 dias experimentais.

Foram impostos três tratamentos experimentais alocados em delineamento de blocos completos ao acaso com quatro repetições, a saber:

1) Controle (sem aplicação de *Azospirillum brasilense*); 2) *A. brasilense* aplicado na forma de aspersão foliar; 3) *A. brasilense* aplicado na forma de aspersão em sulco no solo.

Utilizou-se *A. brasilense* comercial BiomaMais®, formulado com as cepas Ab-V5 e Ab-V6, na concentração de 4×10^8 células por mL, na forma líquida, aplicado na dosagem de 300ml/ha, conforme recomendação do fabricante para aplicação em pulverização. Para proporcionar um bom molhamento, a aplicação foliar se deu em alto volume, utilizando-se uma dose equivalente a 300 litros de calda/ha, com uso de

pulverizador manual. Para aplicação no solo, abriu-se dois sulcos, de aproximadamente 4cm de profundidade, espaçados 17cm um do outro no sentido longitudinal da bandeja com objeto cortante (Anexo D), de modo a simular a abertura realizada com disco sulcador de uma semeadora. Sobre o sulco foi aspergido o equivalente a 150 litros de calda/ha.

As avaliações eram realizadas em um quadro amostral de 10 x 40cm (Anexo E) demarcado sobre cada monólito com objetivo de contemplar uma população de plantas fitossociologicamente homogênea entre os tratamentos e as repetições. O primeiro corte para avaliação da forragem se deu quando a altura média das plantas nas quatro repetições alcançou 12cm, tendo sido as mesmas rebaixadas para 6cm (Gonçalves, 2007; Souza, 2020). Os cortes subsequentes foram realizados quando a altura média das plantas nas quatro repetições alcançou 10cm, tendo sido as mesmas rebaixadas para 5cm (Gonçalves, 2007; Souza, 2020). Para determinação dessa altura, utilizou-se uma régua graduada posicionada verticalmente em 4 pontos dentro do quadro amostral. Antes do corte, a cobertura vegetal do quadro era estimada visualmente através de percentual (0 a 100%) por 3 avaliadores previamente treinados. Após o corte, toda vegetação do monólito era emparelhada na altura de rebaixamento daquele corte.

As amostras da vegetação eram pesadas, para se obter a massa de forragem verde, e posteriormente eram secas em estufa de ventilação forçada a temperatura de 55 - 60°C por 72h para determinação da massa de forragem seca. Na mesma amostra, após a secagem, era realizada a separação botânica dos componentes da amostra (gramíneas, leguminosas e outras espécies). Também era determinado o teor de matéria seca da amostra, a partir da diferença percentual entre o peso da matéria verde e o peso da matéria seca, e a taxa de acúmulo de forragem está última calculada pelo cociente entre a massa de forragem seca e o número de dias de crescimento entre dois cortes sucessivos.

Os resultados foram analisados por análise de variância e teste de comparação de médias de Tukey ($P \leq 0,05$), considerando-se a possível interação dos três cortes x três tratamentos de aplicação de *A. brasilense*.

4 Resultados e discussão

A massa de forragem verde (MFV) apresentou diferenças significativas para a interação cortes x tratamento ($P=0,0001$). No primeiro corte, maior valor dessa variável foi observada quando o *Azospirillum* (AZ) foi aplicado diretamente no solo (AZ Solo), diferindo da massa produzida quando a aplicação se deu via folhar e do Controle, sendo que estes últimos não diferiram entre si (Tabela 2). No segundo corte, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com amplitude de 1100,62 a 2403,12 kg ha⁻¹ de MFV, observados respectivamente nos tratamentos Controle e AZ Folha. No terceiro corte, também não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, com rendimentos de 1662,50 e 2068,75 kg ha⁻¹, nos tratamentos AZ Folha e Controle, respectivamente. O tratamento AZ Solo não apresentou altura para a realização de um terceiro corte até o final do período experimental.

Tabela 2 - Massa de forragem verde kg ha⁻¹ por corte em cada tratamento.

Variável	1° Corte	2° Corte	3° Corte	Total
Controle	3893,75Ba	1100,62Ab	2068,75Ab	7063,12
AZ Solo	6433,33Aa	1987,50Ab	-	8420,83
AZ Folha	2987,50Ba	2403,12Aa	1662,50Aa	7053,12

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

Embora o tratamento AZ Solo tenha apresentado a maior MFV no primeiro corte, deve-se salientar que o mesmo necessitou 86 dias para alcançar a altura de corte preconizada. Ou seja, quando este tratamento foi cortado pela primeira vez, os demais já estavam recebendo o segundo corte (Tabela 3). Da mesma forma o tratamento Controle também necessitou de um longo período para alcançar a altura para o primeiro corte (79 dias). Estes resultados podem estar relacionados à composição botânica desses tratamentos, predominantemente formada por espécies prostradas, em especial outras espécies que não gramíneas (Tabela 6), que crescem e perfilham próximo ao solo, acumulando massa no extrato inferior com pequeno acréscimo de altura. Nos cortes seguintes houve mudança na arquitetura do dossel da pastagem, de modo que a altura

de corte nestes dois tratamentos foi alcançada, respectivamente, com 14 e 7 dias (Tabela 3). Além disso, a altura preconizada no primeiro corte era de 12cm, a qual foi alterada para 10cm nos cortes seguintes.

O tratamento AZ Folha, embora não tenha apresentado superioridade de MFV em relação ao Controle, no primeiro corte foi o que apresentou o menor intervalo entre cortes (58 dias). Intervalo que aumentou no segundo corte e voltou a se reduzir no terceiro.

Ao comparar a MFV dos cortes dentro de cada tratamento (Tabela 2), observa-se nos tratamentos Controle e AZ Solo superioridade significativa do primeiro corte sobre os demais, que não diferiram entre si. Por sua vez, o tratamento AZ Folha não alterou sua MFV ao longo dos cortes. O intervalo médio entre cortes foi de 33,3 dias nos tratamentos Controle e AZ Folha, média de três cortes, e 50 dias no tratamento AZ Solo, que recebeu somente dois cortes.

Tabela 3 – Data do corte, intervalo entre cortes – IC (dias) e altura (cm) do dossel da pastagem no momento do corte de cada tratamento e preconizada.

Data	16/02/2023			09/03/2023			16/03/2023			30/03/2023		
Tratamento*	CT	AZ S	AZ F	CT	AZ S	AZ F	CT	AZ S	AZ F	CT	AZ S	AZ F
Corte	-	-	1	1	-	-	2	1	2	3	2	3
IC	-	-	58	79	-	-	7	86	28	14	14	14
Altura obtida	-	-	11,63	11,28	-	-	10,34	12,0	11,84	11,19	11,35	11,00
Altura preconizada	12	12	12	12	12	12	10	12	10	10	10	10

*CT: Controle; AZ S: AZ Solo; AZ F: AZ Folha **Uniformização e aplicação dos tratamentos: 15/12/2023

A massa de forragem seca (MFS) também mostrou diferenças significativas para a interação corte x tratamento ($P=0,0001$). No primeiro corte, a MFS apresentou maior valor quando o AZ foi aplicado diretamente no solo, diferindo da massa produzida no AZ Folha e no Controle, que não diferiram entre si (Tabela 4). No segundo corte, a maior MFS ocorreu no tratamento AZ Folha, a qual foi superior ao controle e semelhante a do AZ Solo, que se apresentou intermediária, não diferindo do Controle. No terceiro corte

não se verificou diferenças entre os tratamentos AZ Folha e Controle, e AZ Solo não foi cortado.

Estes resultados sugerem que há efetividade em termos de ganho de MFS no uso de AZ sobre o campo natural, seja este aplicado via folhar ou diretamente no solo, com resultados distintos quanto ao tempo necessário para a resposta das plantas a inoculação.

Tabela 4 - Massa de forragem seca kg ha⁻¹ por corte em cada tratamento.

Tratamento	1° Corte	2° Corte	3° Corte	Total
Controle	1750 Ba	431,87Bb	593,75 Ab	2775,62
AZ Solo	2758,33Aa	781,25ABb	-	3539,58
AZ Folha	1125 Ba	1125,62Aa	518,75 Aa	2769,37

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

Ao analisar os resultados dos cortes em cada tratamento, verificou-se que as maiores MFS no Controle e AZ Solo foram obtidas no primeiro corte, vindo a diminuir nos cortes seguintes. No tratamento AZ Folha, a maior MFS foi verificada no segundo corte, da mesma forma havendo decréscimo no corte seguinte. É possível que o “ambiente do vaso” tenha limitado o potencial produtivo dos tratamentos, em especial aqueles que receberam AZ. Assim, não haveria nutrientes suficientes para atender a demanda das plantas que tiveram sua capacidade de extração aumentada pelo AZ. Segundo Moretti *et al.* (2020), a inoculação com AZ promove maior absorção de nutrientes devido ao desenvolvimento radicular aumentado, sendo necessário, de acordo com Bonadiman *et al.* (2018) e SÁ *et al.* (2019), o aporte principalmente de N, pois as bactérias promotoras de crescimento em plantas não suprem toda necessidade desse nutriente.

Lima *et al.* (2020) avaliando a inoculação de AZ, *Pseudomonas fluorescens* e *Rhizobium tropici*, sobre a produção de biomassa e absorção de nutrientes na parte aérea do capim BRS Zuri (*Megathyrsus maximus*), associados ou não a adubação nitrogenada, e a co-inoculação após cada corte, identificaram que a inoculação sem associação de N não apresentou diferença significativa ao tratamento controle negativo, sem inoculação e sem N. Quando a inoculação foi associada ao N, os resultados também não apresentaram diferenças significativas ao tratamento controle positivo, não

inoculado, porém adubado com N, a co-inoculação também não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Sá *et al.* (2019) ao inocularem campim Mavuno (*Urochloa ruziziensis* × *U. brizantha* cv. Marandu × *U. brizantha apomictic*) com AZ associado a adubação com N ou não, encontraram maior MFS apenas quando o N foi aplicado.

Há que se salientar que o tratamento AZ Folha, embora tenha demonstrado efetividade do AZ sobre a MFS, a resposta a inoculação só foi verificada no segundo corte, sugerindo a necessidade de maior tempo para as plantas expressarem o resultado da inoculação quando está se dá por via folhar.

Hungria *et al.* (2021) realizaram experimento com *Brachiaria ruziziensis* (*Urochloa spp.*) durante 4 safras em duas regiões do Paraná, Londrina e Ponta Grossa, inoculando com cepas de AZ, via sementes e pulverização foliar, adicionando ou não adubação com N, quando avaliado a biomassa aérea os autores relatam que a inoculação via semente foi 3,1% superior ao controle, sem N, e 22,1% quando ambos tratamentos receberam 40 kg N.ha⁻¹, o mesmo foi verificado para a pulverização foliar, gerando um aumento de 20,8% superior, quando adicionado 40 kg N.ha⁻¹.

Caminhos de sinalização sistêmica das partes aéreas para as raízes em resposta à inoculação com *A. brasilense* já foram demonstrados em milho (Fukami *et al.* 2017; Fukami; Cerezini; Hungria, 2018) e Braquiaria (Hungria *et al.* 2021). Esses estudos indicam que a inoculação com *A. brasilense* em plantas já desenvolvidas pode continuar a estimular o sistema radicular, favorecendo o estabelecimento da planta e aumentando a produção de biomassa nas partes aéreas.

Guimarães *et al.* (2016) ao avaliarem *Urochloa brizantha* cv. Marandu submetida a inoculação com AZ associado a *Bacillus sp*, *Burkholderia sp* e *A. amazonense*, também encontraram interação entre corte x tratamento para as variáveis analisadas, que foram, MFS, massa seca de raiz, índice relativo de clorofila, e concentração de nitrogênio na parte aérea e de raízes.

A taxa de acúmulo de forragem (TAF) apresentou diferenças significativas para os fatores principais corte (P< 0,0001) e tratamento (P= 0,0285), sem significância para a interação entre os mesmos (P>0,05). O maior valor de TAF em relação aos cortes foi observado no segundo corte, seguido do terceiro e do primeiro, todos diferentes entre si (Tabela 5).

Estes resultados influenciaram o intervalo entre cortes dos tratamentos (Tabela 3), assim o primeiro corte apresentou o maior período de crescimento, com valor médio

de 74,3 dias. O segundo corte, com maior valor de TAF, apresentou intervalo médio de 16,3 dias, seguido pelo terceiro, que teve o menor intervalo (14 dias). Há que se considerar, que além da TAF, a estrutura do dossel e as alturas preconizadas para corte também influenciaram no intervalo entre cortes, conforme já discutido na MFV.

As TAFs observadas no presente estudo foram superiores as relatadas na literatura para o campo nativo, que é de 25,4 kg ha⁻¹ dia, no mesmo período em que o experimento foi realizado, verão e outono (Asuaga; Berterretche, 2019; Carvalho *et al.* 2019).

Em relação aos tratamentos, a TAF foi superior para no Controle e AZ Solo que não apresentaram diferenças significativas, enquanto AZ Folha apresentou o menor valor, diferindo dos demais (Tabela 6), resultados que também influenciaram o intervalo entre cortes dos tratamentos (Tabela 3).

Tabela 5 - Taxa de acúmulo de forragem (TAF) e conteúdo de matéria seca (MS) por corte.

Variável	Primeiro Corte	Segundo Corte	Terceiro Corte	Média
TAF (Kg MS/dia)	24,54 c	52,57a	39,73 b	38,95
MS (g/Kg)	424,55 a	419,01 a	305,41 b	382,99

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, não diferem significativamente para o teste de Tukey (P≤0,05).

O conteúdo de matéria seca apresentou diferenças significativas para o fator corte (P= 0,0058), sendo superior no primeiro e segundo cortes, que não diferiram entre si, e foram superiores ao terceiro (Tabela 5).

Embora não tenha se verificado significância dos tratamentos sobre o conteúdo de matéria seca, é possível inferir que o grande período de acúmulo observado no corte 1, em especial nos tratamentos Controle e AZ Solo, influenciou o resultado desta variável. Com valor médio de 74,3 dias de acúmulo e forragem predominantemente no extrato inferior do dossel, a massa de forragem desse corte provavelmente se apresentava mais envelhecida e com maior quantidade de material senescente, o que elevou o conteúdo de MS. O tratamento AZ Folha alcançou a altura para o primeiro corte com 58 dias, e provavelmente suas as folhas eram mais jovens, apresentando menor conteúdo de matéria seca e menor senescência. Contudo, isso não foi suficiente para baixar o conteúdo médio de matéria seca dos tratamentos.

No segundo corte, apesar do menor intervalo médio entre cortes apresentado pelos tratamentos (16,3 dias) o conteúdo de matéria seca não se reduziu significativamente, o que resultou em sua equivalência ao obtido no primeiro corte.

O conteúdo de matéria seca, medido em g/kg, está intimamente relacionado com a idade das folhas, de modo que folhas mais velhas tendem a apresentar maior conteúdo de matéria seca, enquanto folhas mais jovens apresentam menor. Isso se deve ao conteúdo celular da planta; à medida que a planta amadurece, ocorre redução do espaçamento celular, diminuindo a concentração de nutrientes na célula, que são transportados para novas folhas, resultando na morte de folhas mais velhas e, conseqüentemente, gerando maior quantidade de material senescente (Taiz *et al.* 2017).

A cobertura do solo e o percentual de leguminosas não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) para as variáveis corte e tratamento, apresentando valores médios entre os tratamentos de 70,21 e 2,78%, respectivamente (Tabela 6). Esse resultado pode estar relacionado a baixa fertilidade do solo que foi utilizado pois, segundo Itzigsohn *et al.* (2000) o AZ tende a apresentar resultados melhores em solos com baixo nível nutricional e sob déficit hídrico. Neste trabalho, o solo apresentava baixo nível nutricional (Tabela 1), porém a disponibilidade hídrica não era um fator limitante, considerando que os vasos permaneciam na proximidade da capacidade de campo.

O percentual de gramíneas apresentou diferenças entre tratamentos ($P = 0,0299$), sendo maior no Controle e no AZ Folha, que não se diferenciaram entre si. Conforme descrito por Hungria *et al.* (2010); Moreira *et al.* (2010) e Sabundjian *et al.* (2013), o AZ tende a favorecer gramíneas, todavia no presente estudo isso não se verificou. É possível que a curta duração do experimento e sua realização em ambiente de vaso, tenham limitado essa expressão, não sendo possível o recrutamento de novas plantas com sementes no banco do solo e maior colonização por gramíneas.

O benefício do AZ para as gramíneas foi observado por Guimarães *et al.* (2023) que ao inocular diferentes cultivares de *Megathyrsus maximus*, com AZ, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* e *Rhizobium tropici*, verificaram que as cultivares Tamani e Quênia se mostraram mais responsivas ao AZ, já as cultivares Mombaça, Massai e Tanzânia, mais a inoculação com *P. fluorescens*, e a cultivar Zuri, a inoculação com *B. subtilis*. Isso implica que os resultados não ocorrem de forma semelhante em todas as gramíneas, e que algumas espécies podem apresentar resposta superior ou inferior a inoculação com AZ.

Tabela 6 – Taxa de acúmulo de forragem – TAF(Kg MS/ha/dia) e percentuais de cobertura do solo e presença de gramíneas, leguminosas e outras espécies nos tratamentos experimentais (média dos cortes).

Variável	Controle	AZ Solo	AZ Folha	Média
TAF	42,09a	43,94a	32,22b	39,42
Cobertura do solo	71,25	70,62	68,75	70,21
Gramíneas	93,8 a	79,03 b	95,10 a	89,31
Leguminosas	4,25	0,73	3,35	2,78
Outras sp.	1,9 b	20,23 a	1,54 b	7,89

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

O percentual de outras espécies também apresentou diferenças significativas entre tratamentos ($P = 0,0045$), nesse caso com superioridade do tratamento AZ Solo sobre os demais. Esse resultado é importante, tendo em vista a grande diversidade de espécie que coexistem em áreas de pastagens nativas, sendo estas pastejáveis ou não. Ou seja, o uso do AZ tende a aumentar a diversidade vegetal, promovendo melhoria do ecossistema.

Itzigsohn *et al.* (2000) avaliaram a inoculação com AZ, associado ou não a adubação com fósforo, em pastagem nativa em Israel. Os autores, ao mensurarem a produção de forragem e o percentual de gramíneas, leguminosas e outras espécies, verificaram que o tratamento controle foi igual ao tratamento inoculado com AZ para a variável gramíneas. Porém houve enriquecimento de leguminosas e outras espécies quando o AZ foi associado ao fósforo, porém, nenhuma variável apresentou diferença significativa.

5 Conclusões

A inoculação de *Azospirillum brasilense* em campo nativo via aspersão foliar ou diretamente no solo foi efetiva, alterando a massa de forragem produzida.

A inoculação diretamente no solo influencia a frequência de espécies de diferentes famílias botânicas, aumentando a diversidade vegetal.

O uso de *Azospirillum brasilense* sobre campo nativo é perfeitamente expectável, contudo, devido à complexidade vegetal presente nesse ambiente outros estudos devem ser conduzidos de modo a detalhar seus efeitos.

6 Considerações finais

Este experimento é pioneiro na área de campo nativo com uso de *Azospirillum Brasilense*, sendo que muitos fatores podem influenciar a presença ou ausência de resultados significativos. A alta diversidade vegetal do campo nativo dificulta o isolamento de alguns fatores, tornando necessário entender o comportamento do *A. brasilense* e suas formas de aplicação dentro de uma comunidade heterogênea de espécies. A partir dos resultados e avaliações, podemos compreender seu comportamento para isolar ou acrescentar fatores, como a co-inoculação após cada corte, associação da adubação nitrogenada, diferentes formas de inoculação, sulco e pulverização foliar em cada espécie, maior número de inoculações. Muitas variáveis precisam ser estudadas dentro desse tema para que tenhamos resultados mais consistentes.

Referências

- AGUIRRE, P. F. et al. Biological nitrogen fixation and urea-N recovery in “coastcross-1” pasture treated with azospirillum brasilense. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 55, 2020a.
- AGUIRRE, P. F. et al. Biological nitrogen fixation and urea-N recovery in “coastcross-1” pasture treated with azospirillum brasilense. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 55, 2020b.
- ASUAGA, A.; BERTERRETICHE, M. **USO SOSTENIBLE DEL CAMPO NATURAL: FPTA Nº 73**. Montevideo, UY.: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.inia.uy>>.
- AZAMBUJA, J.C.R. et al. Adubação como ferramenta para intensificação da produção de forragem. **Boletim do Nativão**, Seção 2, p.32-34, 2019.
- BALDANI, J. I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biol. Biochem.**, v. 29, n. 5/6, p. 911–922, 1997.
- BEUTLER, A. N. et al. EFFECT OF NITROGEN-FIXING BACTERIA ON GRAIN YIELD AND DEVELOPMENT OF FLOODED IRRIGATED RICE. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 1, p. 11–17, 1 jan. 2016.
- BOLDRINI, I. I. Campos do Rio Grande do Sul: Caracterização fisionômica e problemática ocupacional. **Boletim do Instituto de Biociências**, v. n.56, p. 1–39, 1997.
- BONADIMAN, R. et al. Efeito da adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* sobre as características estruturais de azevém anual. **REDVET Revista Eletrônica de Veterinaria**, v. 19, n. 3, p. 1–12, 2018.
- BRANCO, J. DOS S.; JÚNIOR, P. P. Fixação biológica de nitrogênio na produção sustentável de forragem. **Revista Edutec**, v. 03, n. 2447–7680, p. 101–114, 2022.
- BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. REGULAÇÃO DA ABSORÇÃO E ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO NAS PLANTAS. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 30, n. 2, p. 365–372, 2000.
- CARAMBULA, M. **Pasturas y forrajes - Potenciales y alternativas para producir forraje**. Montivideo - Uruguay.: Hemisferio Sur, 2003. v. 1
- CARVALHO, P. C. D. F. et al. Produção Animal no Bioma Campos Sulinos. **Brazilian Journal of Animal Science**, v. 35, p. 156–202, 2006.
- CARVALHO, P. C. DE F. et al. **Nativão: + de 30 anos de pesquisa em campo nativo**. Uruguaiana, RS: Viapampa, 2019. v. 1

DARTORA, J. et al. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 10, p. 1023–1029, 28 jun. 2013.

DIONÍSIO, J. A. et al. **GUIA PRÁTICO DE BIOLOGIA DO SOLO**. Curitiba, Paraná.: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo / Núcleo Estadual Paraná, 2016.

DUARTE, C. F. D. et al. Inoculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal em *Urochloa Ruziziensis*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, 21 jul. 2020.

FAGAN, E. B. et al. FISILOGIA DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM SOJA-REVISÃO. **Revista da Faculdade de Zootecnia e Veterinária e Agronomia**, v. 14, n. 1, p. 89–106, 2007.

FEDRIGO, J. K. et al. Spring deferment and N-P fertilization in natural grasslands vulnerable to summer water deficit. **Agrociencia Uruguay**, v. 25, n. 2, 17 maio 2021.

FERREIRA, E. T. et al. Fertilization and oversowing on natural grassland: Effects on pasture characteristics and yearling steers performance. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 9, p. 2039–2047, set. 2011.

FISHER, F.M. Estrutura funcional das comunidades vegetais. **Boletim do natívão**, seção IV, p.48-49. 2019.

FREITAS, P. V. D. X. DE et al. PRODUÇÃO DE GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS INOCULADAS COM *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* ASSOCIADA À ADUBAÇÃO NITROGENADA. **Revista Científica Rural**, v. 21, n. 2, p. 31–46, 2 ago. 2019a.

FREITAS, P. V. D. X. DE et al. PRODUÇÃO DE GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS INOCULADAS COM *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* ASSOCIADA À ADUBAÇÃO NITROGENADA. **Revista Científica Rural**, v. 21, n. 2, p. 31–46, 2 ago. 2019b.

FREITAS, I. C. V.; RODRIGUES, M. B. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO NA CULTURA DO MILHO. **Agropecuária Técnica**, v. 31, n. 2, p. 143–154, 2010.

FUKAMI, J. et al. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2016.

FUKAMI, J. et al. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

FUKAMI, J.; CERZINI, P.; HUNGRIA, M. **Azospirillum: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation**. **AMB Express** Springer Verlag, 1 dez. 2018.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1–15, 2012.

GONÇALVES, E. N. **COMPORTAMENTO INGESTIVO DE BOVINOS E OVINOS EM PASTAGEM NATURAL DA DEPRESSÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL**. Tese de Doutorado—Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

GUIMARÃES, G. S. et al. Inoculation with Plant Growth-Promoting Bacteria Improves the Sustainability of Tropical Pastures with *Megathyrus maximus*. **Agronomy**, v. 13, n. 3, 1 mar. 2023.

GUIMARÃES, S. L. et al. Nutritional characteristics of marandu grass (*Brachiaria brizantha* cv. marandu) subjected to inoculation with associative diazotrophic bacteria. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 24, p. 873–882, 28 jun. 2016.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS EM ARROZ DE SEQUEIRO. **Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 25–30, 2003.

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**. Documentos, 283 ed. Londrina: Embrapa Soja, 2007.

HUNGRIA, M. et al. 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, p. 413–425, jun. 2010.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. 325. ed. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2011. v. 325

HUNGRIA, M. et al. Seed and leaf-spray inoculation of PGPR in brachiarias (*Urochloa* spp.) as an economic and environmental opportunity to improve plant growth, forage yield and nutrient status. **Plant and Soil**, v. 463, n. 1–2, p. 171–186, 1 jun. 2021.

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

ITZIGSOHN, R. et al. Plant-Growth Promotion in Natural Pastures by Inoculation with *Azospirillum brasilense* Under Suboptimal Growth Conditions. **Arid Soil Research and Rehabilitation**, v. 13, p. 151–158, 2000.

LADHA, J. K. et al. **Biological nitrogen fixation and prospects for ecological intensification in cereal-based cropping systems**. **Field Crops Research** Elsevier B.V., 1 jul. 2022.

LIMA, G. C. DE et al. Yield, yield components and nutrients uptake in Zuri Guinea grass inoculated with plant growth-promoting bacteria. **International Journal for Innovation Education and Research**, v. 8, n. 4, p. 103–124, 1 abr. 2020.

LODEWYCKX, C. et al. **Endophytic bacteria and their potential applications. Critical Reviews in Plant Sciences** CRC Press LLC, 2002.

LOPES, E. S.; SCHÜLER, M. A. DE O. **EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA VARIANTE TRUNCADA DA PROTEÍNA GLNE DE HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE**. Maringá, PR: [s.n.].

LUPATINI, G. C. et al. **AVALIAÇÃO DA MISTURA DE AVEIA PRETA E AZEVÉM SOB PASTEJO SUBMETIDA A NÍVEIS DE NITROGÊNIO**. *Pesq.agropec. bras. Brasilia.*, v. 33, p. 1939–1943, 1998.

MARIA DE SOUZA MOREIRA, F. et al. **Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações** *Resumo Comunicata Scientiae*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.ufpi.br/comunicata>.

MARIN, L. **Estrutura de pastagem natural e desempenho de vacas e novilhas em pastoreio rotativo**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Santa Maria, p.57, 2019.

MARIANO, R. D. L. R. et al. **IMPORTÂNCIA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E DE BIOCONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS PARA UMA AGRICULTURA SUSTENTÁVEL**. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*, v. 1, p. 89–111, 2004.

MATOS, M. L. T.; MOTA, M. B.; CUNHA, R. R. DA. **INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* NO SULCO DE PLANTIO DE ARROZ IRRIGADO EM TERRAS BAIXAS DO RIO GRANDE DO SUL**: Resumo Expandido. Santa Maria, RS: [s.n.].

MOREIRA, R. C.; VALADÃO, F. C. DE A.; VALADÃO JÚNIOR, D. D. **Desempenho agrônômico do milho em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada**. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 62, 2019.

MORETTI, L. G. et al. **Bacterial Consortium and Microbial Metabolites Increase Grain Quality and Soybean Yield**. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v. 20, n. 4, p. 1923–1934, 1 dez. 2020.

NAKAO, A. H. et al. **Intercropping *Urochloa brizantha* and sorghum inoculated with *Azospirillum brasilense* for silage**. *Revista Ciencia Agronomica*, v. 49, n. 3, p. 501–511, 1 jul. 2018a.

NAKAO, A. H. et al. **Intercropping *Urochloa brizantha* and sorghum inoculated with *Azospirillum brasilense* for silage**. *Revista Ciencia Agronomica*, v. 49, n. 3, p. 501–511, 1 jul. 2018b.

OLIVEIRA, I. J. et al. **Inoculation with *Azospirillum brasilense* increases maize yield**. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 5, n. 1, 1 dez. 2018.

PILLAR, V. DE P. et al. **CAMPOS SULINOS**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente - MMA, 2009.

PRADO, R. DE M. **Manual de Nutrição de Plantas Forrageiras**. Jaboticabal, SP.: Funep, 2008. v. 1

RAMESH, A. et al. Plant Growth-Promoting Traits in *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* MDSR9 Isolated from Soybean Rhizosphere and its Impact on Growth and Nutrition of Soybean and Wheat Upon Inoculation. **Agricultural Research**, v. 3, n. 1, p. 53–66, 2014.

REIS JUNIOR, F. B. DOS et al. **Associação de bactérias promotoras de crescimento de plantas do gênero *Azospirillum* com diferentes espécies de *Brachiaria brachiaria***. Doc 81 - Embrapa Cerrados, Planaltina - DF: Documentos. Planaltina, DF: [s.n.].

REIS, R. A.; BERNARDES, T. F.; SIQUEIRA, G. R. **Forragicultura Ciencia Tecnologia e Gestao dos Recursos Forrageiros**. 1. ed. Jaboticabal, SP: Gráfica Multipress, 2023. v. 1

REIS, V. M.; PEDRAZA, R. O.; TEIXEIRA, K. R. DOS S. **Diversidade e relação filogenética de espécies do gênero *Azospirillum***. 1. ed. Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia, 2010. v. Documento 273

RODRIGUES, A. A. **Atividade antimicrobiana e produção de enzimas de interesse biotecnológico de bactérias isoladas de diferentes habitats**. Dissertação (Mestrado em microbiologia) —Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 17 mar. 2009.

SÁ, G. C. R. et al. Biomass Yield, Nitrogen Accumulation and Nutritive Value of Mavuno Grass Inoculated with Plant Growth-promoting Bacteria. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 50, n. 15, p. 1931–1942, 2019.

SABUNDJIAN, M. T. et al. Adubação nitrogenada em feijoeiro em sucessão a cultivo solteiro e consorciado de milho e *Urochloa ruziziensis*. **Pesq. Agropec. Trop.**, v. 43, n. 3, p. 292–299, set. 2013.

SAMPAIO, F. A. R. **INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* E *Bacillus subtilis* ASSOCIADA À ADUBAÇÃO NITROGENADA NA NUTRIÇÃO, DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DO CAPIM *Urochloa brizantha* cv. MARANDU**. Tese de Doutorado—Ilha Solteira: Universidade Estadual Paulista, 18 ago. 2020.

SANTI FERRARA, F. I. **INFLUÊNCIA DO TIPO DE ADUBAÇÃO NA PRODUÇÃO DE AMINOÁCIDOS E DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO, ETILENO E POLIAMINAS POR BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO ISOLADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR (*SACCHARUM SP.*)**. Doutorado em Microbiologia—São Paulo, SP: Universidade de São Paulo, 2010.

SOMAVILLA, A. et al. Phosphate fertilization and liming in a trial conducted over 21 years: A survey for greater forage production and pampa pasture conservation. **European Journal of Agronomy**, v. 125, 2021.

SOUZA, A. P. DE. **Composição botânica, estrutura e produção do campo nativo em resposta a diferentes estratégias de manejo em sistema de pastoreio intermitente.** Tese de Doutorado—Pelotas, RS.: Universidade Federal de Pelotas, 31 ago. 2020.

QUADROS, L.F.P. et al. Diferimento: Manejando a estrutura e a composição botânica da vegetação. *Boletim do nativão*, Seção 2, p. 29-31, 2019.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 3. ed. [s.l: s.n.].

VENTURA, M. V. A. et al. Different methods of inoculation of nitrogen-fixing bacteria (*Azospirillum*) specific of grasses in sorghum. **Ipê Agronomic Journal**, v. 4, n. 2, p. 1–8, 3 dez. 2020.

VIANA, J. G. A. et al. Sustainability of livestock systems in the pampa biome of brazil: An analysis highlighting the rangeland dilemma. **Sustainability (Switzerland)**, v. 13, n. 24, 1 dez. 2021.

VIEIRA, R. F. **Ciclo do Nitrogênio em Sistemas Agrícolas.** Brasília, DF: Embrapa, 2017.

VOGEL, G. F.; MARTINKOSKI, L.; RUZICKI, M. Efeitos da utilização de *Azospirillum* brasileiro em poáceas forrageiras - Importâncias e resultados. **AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMIÁRIDO - ACSA**, v. 10, n. 1, p. 01–06, 2014.

ZILLI, J. É. et al. INOCULAÇÃO DA SOJA COM *Bradyrhizobium* NO SULCO DE SEMEADURA ALTERNATIVAMENTE À INOCULAÇÃO DE SEMENTES. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 34, p. 1875–1881, 2010.

Anexos

Anexo A – Foto dos monólitos e distribuição dos blocos experimentais.



Foto: Eduardo Rita

Anexo B – Foto do temporizador para irrigação automática.



Foto: Eduardo Rita

Anexo C – Foto gotejador tipo estaca.



Foto: Eduardo Rita

Anexo D – Foto da aplicação de *Azospirillum* com pulverizador manual.



Foto: Eduardo Rita

Anexo E – Fotos do quadro amostral 10x40cm.



Foto: Eduardo Rita