

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**Fixação Biológica de Nitrogênio em Genótipos de *Pennisetum
purpureum* Schum.**

KARINA RODRIGUES DE MIRANDA

Engenheira Agrônoma

**RECIFE - PE
Fevereiro – 2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**Fixação Biológica de Nitrogênio em Genótipos de *Pennisetum
purpureum* Schum.**

KARINA RODRIGUES DE MIRANDA

**RECIFE - PE
Fevereiro - 2014**

KARINA RODRIGUES DE MIRANDA

**Fixação Biológica de Nitrogênio em Genótipos de *Pennisetum
purpureum* Schum.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Zootecnia (Área de concentração: Forragicultura).

Orientador: Prof^o. José Carlos Batista Dubeux Júnior, PhD.

Co-orientadores: Prof^o. Mário de Andrade Lira, PhD.

Prof^o. Mario de Andrade Lira Júnior, PhD.

**RECIFE - PE
Fevereiro - 2014**

**Fixação Biológica de Nitrogênio em Genótipos de *Pennisetum
purpureum* Schum.**

KARINA RODRIGUES DE MIRANDA

**Dissertação defendida em 26 de fevereiro de 2014 e aprovada pela banca
examinadora:**

Presidente da Banca:

Mário de Andrade Lira, Prof. PhD. Pesquisador do IPA

Examinadores:

Emídio C. A. Oliveira, Prof. DSc., Departamento de Agronomia/UFRPE

José de Paula Oliveira, Prof. DSc., Pesquisador do IPA

Alexandre C. L. de Mello, Prof. DSc., Departamento de Zootecnia/UFRPE

**RECIFE-PE
Fevereiro -2014**

Ficha catalográfica

M672f Miranda, Karina Rodrigues de
Fixação biológica de nitrogênio em genótipos de
Pennisetum purpureum Schum / Karina Rodrigues de
Miranda. – Recife, 2014.
xvi, 56 f. : il.

Orientador: José Carlos Batista Dubeux Júnior.
Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Zootecnia,
Recife, 2014.

Inclui referências e apêndice(s).

1. *Pennisetum purpureum* 2. FBN 3. Abundância natural
de ¹⁵N 4. Produção de matéria seca 5. Associação
endofítica I. Dubeux Júnior, José Carlos Batista, orientador
II. Título

CDD 636

BIOGRAFIA DA AUTORA

KARINA RODRIGUES DE MIRANDA, filha de Leonila Rodrigues de Miranda e Gerson Barbosa de Miranda Filho, nasceu em 18 de Janeiro de 1989, na cidade de Serra Talhada, Pernambuco, Brasil. Em março de 2007, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UAST). Durante a graduação participou de atividades de iniciação científica e monitoria, na qualidade de bolsista, terminando seu curso no segundo semestre de 2011. Em março de 2012 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia na Universidade Federal Rural de Pernambuco (PPGZ/UFRPE), Recife-PE, na área de concentração em Forragicultura, concluindo o curso de mestrado em fevereiro de 2014.

Aos meus amados pais, Leonila Rodrigues de Miranda e Gerson Barbosa de Miranda Filho, exemplos de respeito e dignidade, pelo amor, confiança, incentivo e dedicação.

Aos meus irmãos, Georgia Miranda, Carlota Joaquina, Jéssyka Miranda e Jefferson Augusto, e meus sobrinhos, Ademir Neto e Gabriel, pelo apoio, amor, carinho, amizade e companheirismo.

Ao meu grande amigo Thieres George, por ter me incentivado a seguir essa carreira, por ter acreditado e confiado em mim, pelos ensinamentos, respeito e carinho.

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a meu grande **Deus**, pela benção da vida, por me dar força, saúde e determinação para a realização deste sonho.

Ao meu orientador, professor **José Carlos Batista Dubeux Jr.**, pela oportunidade, ensinamentos, dedicação, paciência, respeito, competência e profissionalismo.

Aos meus coorientadores, professor **Mário de Andrade Lira** e **Mario de Andrade Lira Jr.**, pelas orientações, ensinamentos, conselhos, compreensão, confiança e incentivo.

A todos os professores do **Departamento de Zootecnia** e do **Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRPE**, em especial aos professores de Forragicultura, **Mércia Virgínia Ferreira dos Santos**, **Alexandre Carneiro Leão de Mello** e **Márcio Vieira da Cunha**, pelas sugestões, ensinamentos e ajuda sempre que solicitada.

Aos colegas da Pós-Graduação em Forragicultura, **Suellen**, **Stevens**, **João Tiago**, **Rerisson**, **Valéria**, **Cristiane**, **Hugo**, **Gabriela**, **Tony**, **Eduardo Bruno**, **Ricardo**, **Osniel**, **Carol**, **Joelma**, **Janete**, **Ildja**, **Adeneide**, **Felipe**, **Talita** e **Hiran**, pela convivência, ajuda, aprendizado e companheirismo.

Aos alunos da graduação **Kaline** e **Renan**, pela ajuda durante as análises laboratoriais.

Aos amigos **Maria Gabriela**, **Marcela Barbosa**, **Márcia Menezes**, **Taíza Nogueira**, **Edson Fábio**, **Jackson Meirellys**, **Felipe Diniz**, **Carol Tertto**, **Maria do Carmo**, **Sibele Joise**, **Juliana de Paula**, **Wandemberg Rocha**, **Fabiana**, **Dona Inês** e **Eduardo Barros**, pela ajuda, amizade, companheirismo e por torcerem por pelo meu sucesso.

Aos professores **Alexandre Mello, Emídio Cantídeo** e ao pesquisador do IPA, **José de Paula**, por fazerem parte da banca examinadora e por todas as contribuições dadas.

Aos pesquisadores do IPA **Maria da Conceição Silva e Erinaldo Viana de Freitas**, pelas sugestões e ensinamentos para a realização deste trabalho.

A **Thieres George Freire da Silva**, pela motivação para a realização desta conquista, pelo apoio, ensinamentos, conselhos e amizade.

A **Luciano Novaes**, pela amizade, confiança, conselhos, ajuda e incentivo.

Ao professor **Marcelo Ferreira**, pelos conselhos, incentivo, ensinamentos e confiança.

À **Universidade Federal Rural de Pernambuco** e ao **Programa de Pós-graduação em Zootecnia**, pela oportunidade em realizar o curso de Mestrado.

Ao **Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Estação Experimental de Itambé, PE**, por disponibilizar o espaço físico para condução do experimento, bem como o alojamento, equipamentos, insumos e recursos humanos, quando necessário. Também agradeço a ajuda e apoio dos funcionários **Dr. Aluísio Low** (chefe da estação), **Dr. Erinaldo, Dr. Eric, Dra. Sonia, Neuma, Dona Fátima, Dona Maria, Marilene, Edvaldo Araújo (Nego), Max, Marlon, Tiago e Silvio**.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de estudo para realização do curso.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desse trabalho.

“Seu trabalho vai ocupar grande parte da sua vida, a única forma de estar realmente satisfeito com ele é fazer o que acredites ser um grande trabalho. E a única forma de fazer um trabalho genial é amar o que você faz. Se você ainda não o encontrou, continue procurando, nunca se detenha. Igualmente como todos os assuntos do coração, você saberá quando o encontrares. E, como qualquer grande relação, somente ficará melhor e melhor com o passar dos anos. Então, continue a busca até que o encontres, nunca te detenhas.”

Steve Jobs

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	x
Lista de Figuras.....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xv
Introdução Geral.....	01
Referências Bibliográficas.....	03
CAPÍTULO I – Referencial Teórico.....	05
O capim-elefante (<i>Pennisetum purpureum</i> Schum.).....	05
Importância do N em <i>Pennisetum</i> spp.....	07
Fixação biológica de N em gramíneas forrageiras.....	09
Técnica da abundância natural de ¹⁵ N.....	11
Referências Bibliográficas.....	14
CAPÍTULO II - Fixação Biológica de Nitrogênio em Genótipos de <i>Pennisetum purpureum</i> Schum.....	18
Resumo.....	19
Abstract.....	20
Introdução.....	21
Material e Métodos.....	22
Resultados e Discussão.....	28
Conclusões.....	39
Referências Bibliográficas.....	36

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

	Página
1. Características químicas do solo coletado (0-0,2 m) da área de cultivo dos genótipos de capim-elefante na Estação Experimental do IPA, município de Itambé, Pernambuco.....	22
2. Produção de matéria seca (PMS) da parte aérea dos genótipos de <i>Pennisetum purpureum</i> Schum., cultivados na Estação Experimental do IPA, Itambé, PE. Média de quatro ciclos de avaliação.....	27
3. Produção de matéria seca (PMS) da parte aérea dos genótipos de <i>Pennisetum purpureum</i> Schum. em função dos ciclos de avaliação, cultivados na Estação Experimental do IPA, Itambé, PE.....	27
4. Altura (cm) dos genótipos de <i>P. Purpureum</i> Schum. em função dos ciclos de avaliações, Estação Experimental do IPA, Itambé, PE.....	28
5. Altura (cm) dos genótipos de <i>P. purpureum</i> Schum. em função das doses de nitrogênio (kg de N ha ⁻¹ corte ⁻¹), Estação Experimental do IPA, Itambé, PE.....	29
6. Abundância natural de ¹⁵ N (‰) dos genótipos de <i>P. purpureum</i> , no nível zero de N, em função dos ciclos de avaliação, na Estação Experimental do IPA, Itambé, PE.....	30
7. Estimativa da contribuição de nitrogênio derivado da atmosfera (%N _{dda}) e acúmulo de N (g m ⁻² corte ⁻¹) dos genótipos de <i>P. purpureum</i> , no nível zero de N, em função dos ciclos de avaliação, na Estação Experimental do IPA, Itambé, PE.....	32
8. Abundância natural de ¹⁵ N (‰), teor de N (%), contribuição de nitrogênio derivado da atmosfera (%) e FBN (g m ⁻² corte ⁻¹) da fração colmo e folha dos genótipos de <i>P. purpureum</i> , no nível zero de N, na Estação	33

Experimental do IPA, Itambé, PE.....	
9. Fixação biológica de nitrogênio (g de N m ⁻²) dos genótipos de <i>P. purpureum</i> no nível zero de N, na Estação Experimental do IPA, Itambé, PE.....	33
10. Log do número mais provável (NMP) de células g ⁻¹ de tecido vegetal fresco (TVF) da densidade populacional de bactérias endofíticas associadas à raiz de genótipos de <i>P. purpureum</i> , cultivados no nível zero de N, em duas épocas do ano, na Estação Experimental do IPA, Itambé, PE.....	35
11. Log do número mais provável (NMP) de células g ⁻¹ de tecido vegetal fresco (TVF) da densidade populacional de bactérias endofíticas associadas a genótipos de <i>P. purpureum</i> , cultivados no nível zero de N, nos nichos de colonização de raiz e colmo, durante a época chuvosa, na Estação Experimental do IPA, Itambé, PE.....	35

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

	Página
1. Precipitação pluvial mensal (mm) na Estação Experimental do Instituto Agronômico de Pernambuco, Itambé, PE.....	21

RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) em gramíneas forrageiras pode contribuir com quantidades significativas do nitrogênio acumulado pela planta. Objetivou-se com esse trabalho avaliar cinco genótipos de *Pennisetum purpureum* Schum. quanto ao potencial de FBN e de associação endofítica de bactérias diazotróficas na raiz e colmo, em duas épocas distintas, bem como a produção de matéria seca e altura da planta desses genótipos em função de níveis de nitrogênio. O experimento foi implantado em 2009, na Estação Experimental de Itambé pertencente ao Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), adotando-se o delineamento de parcela subdividida em blocos ao acaso, com três repetições. A parcela principal foi formada pelos níveis de adubação de 0, 30, 60 e 90 kg ha⁻¹ de N corte⁻¹, e a subparcela pelos genótipos Mineirão, Elefante B, IRI 381, Taiwan A-146 e Pioneiro. Foi avaliado o efeito dos níveis de adubação nitrogenada sobre aspectos produtivos e de altura da planta e, nas parcelas com nível zero de adubação, a FBN em quatro ciclos de avaliação. A ocorrência de bactérias endofíticas associadas às raízes e colmos dos genótipos Elefante B, Venezuela e Pioneiro, foram avaliadas nas épocas seca e chuvosa. Os genótipos Taiwan A-146, Elefante B e IRI 381 foram os mais promissores na FBN, com contribuições de até 57,2, 58,0 e 61,9% do N total acumulado pela parte aérea. A presença de bactérias diazotróficas associada às raízes do Pioneiro foi maior no período mais seco do ano. O cultivar Venezuela apresentou as maiores densidades de endofíticos no colmo. Não houve efeito da adubação nitrogenada para a produção de MS, sendo os genótipos Taiwan A-146, Elefante B e IRI 381 os mais produtivos, com 870, 1208 e 899 g m⁻² corte⁻¹ de MS. Para altura foi observada efeito da adubação nitrogenada, em que os genótipos, Pioneiro e Mineirão, apresentaram efeito linear e quadrático,

respectivamente. Os genótipos de capim-elefante estudados são potencialmente fixadores de N. A ocorrência de bactérias endofíticas associadas aos genótipos de capim elefante é influenciada pelo tecido de colonização e estação do ano, sendo necessário que estes isolados sejam caracterizados geneticamente e avaliados quanto ao seu potencial de FBN.

Palavras-chave: *Pennisetum purpureum*, FBN, Abundância natural de ^{15}N , Produção de matéria seca, Associação endofítica

ABSTRACT

Biological nitrogen fixation (BNF) in forage grasses can contribute significant amounts of nitrogen accumulated by the plant. The objective of this study was to evaluate five *Pennisetum purpureum* Schum. about the potential of BNF and endophytic association of diazotrophs in the root and stem, at two different times, as well as the dry matter yield and plant height of these genotypes due to nitrogen levels. The experiment was established in 2009 at the Experimental Station belonging to Itambé Agronomic Institute of Pernambuco (IPA), adopting the split plot design in randomized blocks with three replications. The main plot was formed by N fertilization levels of 0, 30, 60 and 90 kg ha⁻¹ N per cut, and the subplot with genotypes Mineirão Elephant B, IRI 381, Taiwan A- 146 and 'Pioneiro'. The effect of nitrogen fertilization on production aspects and plant height, and in plots with zero fertilizer level, BNF has been reported in four cycles of review. The occurrence of endophytic bacteria associated with the roots and stems of genotypes Elephant B, Venezuela and 'Pioneiro', were evaluated in dry and rainy seasons. Genotypes Taiwan A-146, Elephant B and IRI 381 were the most promising in the BNF, with contributions of up to 57.2 , 58.0 and 61.9 % of the total N accumulated in shoots. The presence of diazotrophs associated with roots of 'Pioneiro' was higher in the dry season. The cultivar Venezuela had the highest density of endophytes in the stem. There was no effect of nitrogen fertilization for the production of MS, with genotypes Taiwan A- 146, Elephant B and IRI 381 the most productive, with 870, 1208 and 899 g m⁻² per cut DM. For height effect of nitrogen fertilization on the Pioneer and legume genotypes showed linear and quadratic effects, respectively was observed. The elephant grass genotypes studied are potentially fixers N. The occurrence of endophytic bacteria associated with elephant grass genotypes is influenced by tissue

colonization and season, being necessary that these isolates were genetically characterized and evaluated for their potential to FBN.

Keywords: *Pennisetum purpureum*, BFN, ¹⁵N natural abundance, dry matter production, endophytic association

INTRODUÇÃO

A intensificação da produção de leite e carne se baseia no uso de forrageiras com elevado potencial de produção (Mota et al., 2010), como por exemplo, o capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.). Essa gramínea tropical é caracterizada por apresentar boa qualidade forrageira, podendo ser utilizada para corte, pastejo, silagem, feno, consórcio e para produção de bioenergia (Pereira et al., 2008; Morais et al., 2009).

O potencial produtivo das plantas forrageiras é determinado geneticamente, porém a produtividade é fortemente influenciada, dentre outros fatores, pela disponibilidade de nutrientes no solo, em especial do nitrogênio (Fagundes et al., 2005). Embora esse elemento corresponda a, aproximadamente, 80% dos gases da atmosfera, as plantas não são capazes de utilizá-lo na forma gasosa, podendo apenas absorvê-lo do solo na forma de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) (Boddey et al., 1992). A adubação mineral com N-inorgânico e a fixação biológica de nitrogênio (FBN) constituem as duas principais fontes fornecedoras de N às plantas. Entretanto, devido ao elevado custo dos fertilizantes nitrogenados, ao preço dos produtos finais obtidos nas pastagens e às grandes perdas desse nutriente no sistema, principalmente por volatilização, a adubação mineral, muitas vezes, torna-se uma prática de baixa rentabilidade (Martha Júnior et al., 2009). Como alternativa, tem-se enfatizado a necessidade de maior exploração do potencial da FBN em gramíneas tropicais (Silva et al., 2010).

A FBN é o processo pelo qual bactérias fixadoras de N (diazotróficas), se utilizam de um complexo enzimático, denominado nitrogenase, para converter o N_2 atmosférico em uma forma disponível para as plantas, a amônia (NH_3^+) (Unkovic et al., 2008). Estudos realizados por Silva et al. (2010) em pastagens de *Brachiaria decumbens*, *B.humidicola* e *P.purpureum*, indicaram que a FBN contribuiu com 10% a 42% do N acumulado na planta. Quesada (2001), em um experimento de campo

utilizando a técnica de abundância natural de ^{15}N , observou que a FBN, associada à *P. purpureum* Schum., foi capaz de contribuir com até 57% do N acumulado pela planta.

Um aspecto que deve ser considerado quando se trata de FBN em espécies não leguminosas, é o efeito que o genótipo da planta pode exercer sobre o processo de fixação de N_2 (Reis Júnior et al., 2000). Morais et al. (2009), avaliando diferentes genótipos de *P. purpureum*, obtiveram contribuições de FBN variando entre 21% a 43% para o cultivar Roxo e, de 32% a 52%, para o acesso CNPGL F06-3. Urquiaga et al. (2012), avaliando diferentes variedades comerciais de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) em condições de campo, por 14 anos, observaram que pelo menos $40 \text{ kg N ha}^{-1}\text{ano}^{-1}$ foram provenientes da FBN.

Dentre as bactérias diazotróficas associadas às plantas não leguminosas, as do gênero *Azospirillum* parecem ser uma das principais responsáveis pelas altas taxas de FBN observadas em capim elefante. Essas bactérias podem ser isoladas através do meio semisólido NFb que, elaborado sem fonte nitrogenada, proporciona um ambiente com baixo nível de oxigênio, semelhantemente ao que ocorre no solo ou na planta, onde estas bactérias se encontram em associação às raízes das plantas (Kuss et al., 2007).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a fixação biológica de N em diferentes genótipos de *P. purpureum* cultivados na Zona da Mata de Pernambuco, sem adubação nitrogenada, bem como o potencial de associação de diazotróficos endofíticos associados a essas plantas, a produção de matéria seca e altura desses genótipos submetidos a diferentes níveis de N.

Referências Bibliográficas

- BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ASSIS, R.L. de; DOBEREINER, J. **Fixação biológica de bactérias associadas à cana-de-açúcar**. EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Biologia do Solo, 1992, p.1-5 (Comunicado Técnico, 6).
- FAGUNDES, J. L.; FONSECA, D. M.; GOMIDE, J. A.; NASCIMENTO JUNIOR, D.; VITOR, C. M. T.; MORAIS, R. V.; MISTURA, C.; REIS, G. C.; MARTUSCELLO, J. A. Acúmulo de forragem em pastos de *Brachiaria decumbens* adubados com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 4, p. 397-403, 2005.
- KUSS, A.V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M.L.; Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.42, n.10, p.1459-1465, out. 2007.
- MARTHA JÚNIOR, G.B.; CORSI, M.; TRIVELIN, P.C.O.; VILELA, L. Recuperação de ¹⁵N-uréia no sistema solo-planta de pastagem de capim-tanzânia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 33:95-101, 2009.
- MORAIS, R.F.; SOUZA, B.J.; LEITE, J.M. et al. Elephant grass genotypes for bioenergy production by direct biomass combustion. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.2, p.133-140, 2009.
- MOTA, V. J. G.; REIS, S. T. dos; SALES, E. C. J. de; ROCHA JÚNIOR, V. R.; OLIVEIRA, F. G. DE; WALKER, S. F.; MARTINS, C. E.; CÓSER, A. C. Lâminas de irrigação e doses de nitrogênio em pastagem de capim-elefante no período seco do ano no norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.6, p.1191-1199, 2010.
- PEREIRA, A.V.; MACHADO, M.A.; AZEVEDO, A.L.S.; NASCIMENTO, C.S. do; CAMPOS, A.L.; LÉDO, F.J. da S. Diversidade genética entre acessos de capim elefante obtida com marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.1216-1221, 2008.
- QUESADA, D.M. **Seleção de genótipos de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) para a alta produção de biomassa e eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN)**. 2001. 119p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- REIS JUNIOR, F.B dos; SILVA, L.G.da; REIS, V.M; DOBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.5, p.985-994, maio, 2000.
- SILVA, L.L.G.G.; ALVES, G.C.; RIBEIRO, J.R.A.; URQUIAGA, S.; SOUTO, S.M.; FIGUEIREDO, M.V.; BURITY, H.A. Fixação biológica de nitrogênio em pastagens com diferentes intensidades de corte. **Archivos Zootecnia**. 59 (225): 21-30. 2010.
- UNKOVICH, M.J.; HERRIDGE, D.F.; PEOPLES, M.B.; CADISCH, G.; BODDEY, R.M.; GILLER, K.E.; ALVES, B.; CHALK, P. **Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems**. Canberra: ACIAR, 2008. 258p.

URQUIAGA, S., XAVIER, R.P., DE MORAIS, R.F., BAPTISTA, R.B., SCHULTZ, N., LEITE, J.M., MAIA ESÁ, J., BARBOSA, K.P., DE RESENDE, A.S., ALVES, B.J.R., BODDEY, R.M., 2012. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, 356, 5–21.

Capítulo I

REFERENCIAL TEÓRICO

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.)

O capim elefante (*P. purpureum* Schum.) é uma gramínea tropical de grande importância forrageira, devido ao seu elevado potencial de produção de biomassa, qualidade, aceitabilidade, vigor e persistência, além de ser adaptado a quase todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. Na produção animal, o capim elefante é comumente utilizado para corte e fornecimento da forragem verde picada no cocho (capineira), mas também pode ser utilizado para pastejo, na forma conservada, como feno e silagem, e em consórcio com outras culturas (Pereira et al., 2010).

Originário da África Tropical (atual Zimbábue), onde ocorre naturalmente em áreas com precipitação acima de 1000 mm/ano, o capim-elefante apresenta grande variabilidade de tipos morfológicos (Brunken, 1977). Os territórios da Guiné, Moçambique, Angola, Zimbábue e Sul do Quênia são apontados como as principais áreas de biodiversidade desta espécie (Ferreira; Pereira, 2005). Seu descobrimento e divulgação como planta forrageira se deu em 1905, pelo Coronel Napier Springer, cujo nome dessa espécie também passou a ser conhecida (Granato, 1924).

A espécie *P. purpureum* é caracterizada por apresentar plantas vigorosas, de porte variável, com ciclo vegetativo perene, crescimento cespitoso, colmos cilíndricos e cheios, folhas de comprimento e largura variáveis e, inflorescência tipo panícula. (Whyte et al., 1975; Nascimento Júnior, 1975). Uma vez que essa espécie apresenta grande variação dos caracteres morfológicos entre os diferentes ecótipos, Pereira (1993) agrupou essa variabilidade dentro do germoplasma de capim-elefante em cinco grupos distintos:

Grupo Cameroon – representado pelos cultivares Cameroon Piracicaba, Vruckwona, Capim Cana D'África, IAC Campinas e Guaçú IZ-2. Os exemplares deste grupo apresentam touceiras densas, porte ereto, colmos grossos, predominância de perfilhos basais, folhas largas, florescimento tardio ou inexistente;

Grupo Napier – representado pelos cultivares Napier, Mineiro, Taiwan A-146, Gigante de Pinda e Turrialba. Esse grupo é caracterizado por apresentar touceiras abertas, colmos grossos, folhas largas e florescimento intermediário;

Grupo Merker – caracterizado por apresentar cultivares de porte baixo, colmos finos, folhas finas, menores e mais numerosas e florescimento precoce, algumas de suas cultivares são Merker, Merker Comum, Merker Pinda, Merker México e Merkeron;

Grupo Anão – O cultivar Mott é o principal representante desse grupo, apresentando porte baixo (até 1,5 m de altura), internódios curtos e elevada relação folha/caule;

Grupo dos Híbridos Interespecíficos – formado por cultivares resultantes do cruzamento entre espécies de *Pennisetum*, como o *P. purpureum* e o *P. americanum*. Como características, os cultivares desse grupo apresentam florescimento precoce e esterilidade das sementes, como, por exemplo, os cultivares Pusa Gigante Napier, Bana Grass, Mineiro x 23A e Mineiro x 293DA, HV 241, Hexaplóide e Paraíso.

O capim-elefante é uma espécie exigente quanto à fertilidade do solo, não tolera geada e solos encharcados. Desenvolve-se bem entre as latitudes de 10° Norte a 20° Sul, em altitudes variando do nível do mar até 2.200m, com temperaturas médias de 18° C a 30° C e precipitações de 800 a 4.000 mm/ano (Rodrigues et al., 1975; Jacques, 1997). Trata-se de uma espécie sexuada, protogínica (mecanismo que evita a autofecundação) e alógama (alta heterozigose das sementes formadas), facilitando a realização de cruzamentos (Pereira, 1993). Assim, a produção de sementes no capim elefante é

inconsistente, e as sementes apresentam baixa viabilidade. Portanto, o principal meio de propagação do capim elefante é o vegetativo, como partes de colmo (Carvalho, 1985).

Importância do N em *Pennisetum* spp.

Embora o N seja um dos elementos mais abundantes na natureza (aproximadamente 80% dos gases da atmosfera), ele não está diretamente disponível para as plantas, devido à presença da tripla ligação entre os dois átomos de N₂ (N ≡ N), que torna esse gás estável à temperatura ambiente. A fixação do N atmosférico requer a quebra dessa tripla ligação, que pode ser obtida, principalmente, por processo industrial e natural (Taiz; Zeiger, 2006).

O processo industrial, conhecido por processo de Haber-Bosch, é um processo de alto custo energético que requer altas temperaturas (300 a 600 °C) e pressões (200 a 800 atm) para realizar a fixação de N e envolve o uso de combustíveis fósseis como o gás natural e petróleo. Em termos globais, estima-se que o processo industrial possa contribuir com, aproximadamente, 25% das entradas de N na Terra (Vitti; Heirinchs, 2007; Hungria et al., 2007).

Já o processo natural é realizado por meio de bactérias fixadoras de N₂, denominadas diazotróficas, que se associam a diversas espécies vegetais em diferentes graus de especificidade, sendo classificadas como associativas, endofíticas ou simbióticas (Hungria et al., 2007). Estas bactérias utilizam-se da energia celular na forma de adenosina trifosfato (ATP) e do complexo enzimático, denominado nitrogenase, o qual catalisa a conversão de N₂ à NH₃, a temperatura e pressão ambientes (Barbosa et al., 2012). Estima-se que o processo biológico contribua em torno de 65% de todas as entradas de N na Terra, sendo que, quase 50% desta entrada, é atribuída à FBN, que ocorre pela associação simbiótica de plantas da família Leguminosae com

bactérias pertencentes a diversos gêneros (rizóbios). O restante, cerca de 10%, é oriundo de processos naturais, como a reação de descargas elétricas com o N₂, a combustão e o vulcanismo (Hungria et al., 2007).

No Brasil, e na maioria dos países tropicais, a baixa disponibilidade de nutrientes dos solos é responsável, em grande parte, pelos baixos níveis de produtividade das culturas (Resende et al., 2003). O aumento na fertilidade do solo, principalmente de N-fertilizante, é um dos principais fatores que aumentam a produção de matéria seca e proteína bruta do capim-elefante. Vários trabalhos na literatura evidenciam a importância do N para o capim elefante. Vitor et al. (2009) em estudos com o cultivar Napier adubado com doses crescentes de N (100, 300, 500 e 700 kg ha⁻¹ ano⁻¹) e lâminas de irrigação (0, 20, 40, 80, 100 e 120% da evapotranspiração de referência), os autores observaram efeito linear para a produção de MS, obtendo 21.128,43 kg ha⁻¹ de MS no período chuvoso e 8.066,73 kg ha⁻¹ de MS no período seco, com a dose de 700 kg de N ha⁻¹ ano. Mota et al. (2010), também trabalhando com os mesmos tratamentos de Vitor et al. (2009) no norte de Minas Gerais, observaram efeito linear para a produção de MS do cv. Pioneiro, atingindo o maior valor (6.445,72 kg/corte) quando foi aplicada lâmina de irrigação de 100% da evapotranspiração com 500 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N, no período seco do ano. Flores et al. (2012), avaliando o efeito da aplicação de quatro níveis de N (0, 50, 100 e 150 kg ha⁻¹) e três idades de corte (120, 150 e 180 dias após o brotamento) do cv. Paraíso para produção de bioenergia, observaram efeito linear para a produção total de MS no corte realizado aos 180 dias, atingindo 41,2 t ha⁻¹ na dose de 150 kg ha⁻¹ de N.

Fixação biológica de N em gramíneas forrageiras

A FBN representa uma importante fonte de N para a nutrição mineral dos sistemas agrícolas, em que a associação entre bactérias fixadoras de N e plantas cultivadas acontece (Zanetti, 2010), principalmente, quando se trata de culturas produtoras de biomassa utilizadas como fontes alternativas de energia, onde se faz necessário que o balanço energético seja positivo (Quesada et al., 2001).

Ao contrário da simbiose dos rizóbios com plantas leguminosas, as bactérias diazotróficas associadas às gramíneas não formam nódulos e localizam-se, de preferência, na região rizosférica, na superfície das raízes ou dentro do tecido vegetal, sendo denominadas como bactérias endófitas ou endofíticas (Faleiro et al., 2011). Segundo Pereira (1995), o termo endofítico se refere a microrganismos que vivem a maior parte de suas vidas no interior dos tecidos vegetais sem promover sintomas de patogenicidade à planta hospedeira. Além de fixar N₂, estes microrganismos também são capazes de produzir fitohormônios de crescimento vegetal (auxinas, giberelinas e citoquininas), antibiótico natural (lisozima), bem como promover atividade antifúngica e aumentar a solubilidade do fosfato e do zinco (Solano et al., 2008; Richardson et al., 2009).

De acordo com Baldani & Baldani (2005), o início do trabalho com bactérias fixadoras de N não simbióticas em uma gramínea forrageira tropical foi descrita por Döbereiner em 1966, com *Paspalum notatum* e *Azotobacter paspali*. Boddey et al. (1983), utilizando a técnica da diluição isotópica de ¹⁵N, demonstraram que *P. notatum* cv. Batatais conseguiu obter, aproximadamente, 10% do seu N via fixação biológica, o que resultou em 20 kg de N ha⁻¹ ano⁻¹. Boddey & Victoria (1986), também utilizando a técnica de diluição isotópica de ¹⁵N, observaram que *Brachiaria humidicola* e *B. decumbens* obtiveram de 30 a 40% de N através da FBN, resultando em contribuições

de 30 e 45 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N, respectivamente. Miranda et al. (1990) em diferentes ecótipos de *Panicum maximum*, encontraram que a FBN foi capaz de contribuir entre 16 a 39% de todo o N acumulado pelas plantas.

No que se refere à contribuição da FBN associada a genótipos de *P. purpureum*, alguns trabalhos foram relatados na literatura, como Silva et al. (2010a), que avaliaram a contribuição da FBN e a ocorrência de bactérias diazotróficas em plantas de capim-elefante manejado sobre três intensidades de corte (5, 25, 50 e 50 cm + 80 kg N ha⁻¹) em Itambé, PE. Estes autores observaram a presença de bactérias do gênero *Azospirillum* spp. e da espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados ao capim-elefante, com contribuição da FBN variando entre 18,4% e 32,0%, para as intensidades de corte de 5 e 50 cm, respectivamente. Quesada (2001), utilizando a técnica da abundância natural de ¹⁵N em condições de campo, observou que a FBN associada a *P. purpureum* contribuiu com até 57% do N acumulado pela planta.

Quando se aborda o processo de FBN em plantas não leguminosas, são comuns relatos de que o genótipo da planta exerce influência no processo (Urquiaga et al., 1992; Reis Junior et al., 2000; Urquiaga et al., 2012). Morais et al. (2009) trabalharam com cinco genótipos de *P. purpureum* (CNPGL F06-3, Gramafante, BAG 02, Roxo e Cameroon) em dois tipos de solo de baixa fertilidade (Planossolo e Argissolo) para a produção de bioenergia. Os resultados demonstraram que os genótipos Cameroon, CNPGL F06-3 e BAG 02 foram os mais promissores, obtendo acúmulo de nitrogênio entre 232 e 343 kg ha⁻¹ e contribuições da FBN de até 47, 52 e 41%, respectivamente. Morais et al. (2011) conduziram três experimentos a campo em solos de baixa fertilidade, dois no Rio de Janeiro e um no Espírito Santo, com as variedades Gramafante, Cameroon, BAG 02, CNPGL F06-3, CNPGL F79-2 e Roxo, e quatro dos genótipos avaliados obtiveram de 18% a 70% do N derivado da FBN. Estas diferenças

entre genótipos de gramíneas em relação à FBN mostram um grande potencial para a sua melhor exploração através de melhoramento vegetal (Döbereiner, 1990).

Assim, pode-se dizer que a FBN pode contribuir, consideravelmente, com grandes quantidades de N para plantas, principalmente em solos com baixa disponibilidade desse nutriente, reduzindo a necessidade de aplicação de N-fertilizantes e contribuindo para a preservação do meio ambiente (Zanetti, 2010).

Técnica da abundância natural de ^{15}N

Nas últimas décadas têm sido desenvolvidos e adaptados uma série de métodos com o objetivo de quantificar a contribuição da FBN na nutrição das plantas. Dentre esses métodos, as técnicas isotópicas apresentam a importante vantagem de permitir a discriminação e quantificação das fontes de N que contribuem para a nutrição nitrogenada das plantas de forma indireta, possibilitando saber qual fração do N acumulado pela planta é proveniente do solo, do fertilizante nitrogenado quando aplicado e/ou do processo de FBN quando associado às plantas. Além disso, as técnicas isotópicas são as únicas que apresentam elevada precisão da contribuição da FBN para a nutrição de plantas ao nível de campo, em culturas de plantas não leguminosas (Boddey et al., 2001).

Dentre os métodos isotópicos, a técnica da abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) têm se destacado, principalmente com o aperfeiçoamento da sensibilidade dos espectrômetros de massa (Resende et al., 2003).

O N possui dois isótopos estáveis de ocorrência natural, o ^{14}N e o ^{15}N . A abundância natural do ^{15}N do N_2 atmosférico é de 0,3663% e do ^{14}N , 99,6337%. Esta técnica fundamenta-se no fato de que o N mineral do solo (NO_3^- e NH_4^+) possui uma abundância natural de ^{15}N um pouco maior do que a do N_2 atmosférico, devido ao

fracionamento isotópico entre ^{14}N e ^{15}N que ocorre nos processos físicos, químicos e biológicos que envolvem o N da matéria orgânica e do solo (Unkovich et al., 2008). Essas variações são extremamente pequenas, então se convencionou que cada unidade de $\delta^{15}\text{N}$ seria a abundância natural dividida por mil, ou seja, 0,0003663 átomos % de ^{15}N em excesso (Rezende et al., 2003). Portanto, uma planta que não fixa N_2 da atmosfera, crescendo nessas condições, terá sua composição em ^{15}N semelhante a do N disponível do solo. Já a planta fixadora do N_2 da atmosfera apresentará teores menores de ^{15}N , devido ao efeito de diluição que esse N_2 causará, uma vez que o ^{15}N em excesso da atmosfera é zero. Assim, usando-se uma planta não fixadora como marcadora do ^{15}N do N mineral do solo, a taxa de fixação pode ser determinada pela proporção com que este ^{15}N foi diluído (Shearer; Kohl, 1986).

Para tanto, é necessário que a planta não fixadora de N_2 explore um volume de solo semelhante ao da fixadora, apresentando, ainda, padrões de absorção e assimilação do N parecidos. Como na realidade isso é quase impraticável de ser atendido, usa-se a média do ^{15}N de algumas espécies de plantas que não tenham, reconhecidamente, nenhum histórico comprovado de fixação biológica associada (Miranda et al., 2003). A determinação da proporção de N derivado da FBN (%) é então obtida pela equação de Shearer & Kohl (1986):

$$\% \text{FBN} = \left(\frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{planta referência}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{planta teste}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{planta referência}} - B} \right) \times 100$$

Onde:

$\delta^{15}\text{N}$ da planta referência – Valor de $\delta^{15}\text{N}$ do solo obtido através de plantas não fixadoras;

$\delta^{15}\text{N}$ da planta teste - Valor de $\delta^{15}\text{N}$ da planta fixadora de N_2 ;

B – Valor da discriminação isotópica de ^{15}N feita pelas plantas durante o processo de FBN (Normalmente considerado zero para gramíneas).

As limitações do uso desta técnica incluem o alto custo das análises, a necessidade de um maior cuidado com a manipulação das amostras e de que as plantas fixadoras e não fixadoras de N, crescendo no mesmo solo, absorvam nitrogênio com a mesma marcação de ^{15}N (Rezende et al., 2003). Levando em consideração que existam diferenças na exploração do volume do solo pelas raízes das plantas teste e referência e diferenças na curva de absorção de nutrientes entre elas, o uso de mais de uma planta referência se faz necessário (Shearer; Kohl, 1986). Baptista et al. (2014) avaliando quatro espécies de plantas invasoras como referência (*Panicum miliaceum*, *Eleusine indica*, *Sorghum bicolor*, *Commelina benghalensis*) em diferentes profundidades do solo (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60 e 60-75 cm), observaram maiores valores da abundância natural de ^{15}N nas camadas mais profundas, entre 6,7 e 8,6‰, quando comparado à profundidade de 0-10 cm. Estes resultados demonstram que plantas-referência que explorem volume de solo diferentemente das plantas teste, absorverão N em proporções diferentes, resultando em estimativas errôneas da FBN.

Referências Bibliográficas

- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p.549-579, 2005.
- BAPTISTA, R.B.; MORAIS, R.F. de; LEITE, J.M.; SCHULTZ, N.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. Variations in the ¹⁵N natural abundance of plant-available N with soil depth: Their influence on estimates of contributions of biological N₂ fixation to sugar cane. **Applied Soil Ecology**. 73, 124–129, 2014.
- BARBOSA, J.Z.; CONSALTER, R.; VARGAS MOTTA, A.C. Fixação biológica de nitrogênio em *Poaceae*. **Evidência**, Joaçaba v. 12 n. 1, p. 7-18, 2012.
- BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R.L.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. The use of the ¹⁵N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv. Batatais. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, p.1036-1045, 1983.
- BODDEY, R.M., VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ¹⁵N-labelled organic matter and fertilizer. **Plant Soil**, 90, 265–292, 1986.
- BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugarcane and other grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.889-895, 2001.
- BRUNKEN, A.V. A systematic study of *Pennisetum* Sect *Pennisetum* (graminea). **American Journal of Botany**, New York, v.64, n.2, p.161-176, 1977.
- CARVALHO, M.M. Melhoramento da produtividade das pastagens através da adubação. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, 11: 23-32, 1985.
- DÖBEREINER, J. **Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no Brasil**. *Estud. av.* [online]. 1990, vol.4, n.8, pp. 144-152. ISSN 0103-4014.
- FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M. de; REIS JUNIOR, F.B. dos. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. 729 p.
- FERREIRA, R.P.; PEREIRA, A.V. Melhoramento de forrageiras. In: BORÉM, A. (ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV. 2005. p. 781-812
- FLORES, R.A.; URQUIAGA, S.S.; ALVES, B.J.R.; COLLIER, L.S. MORAIS, R. F. DE, PRADO, R. DE M.. Adubação nitrogenada e idade de corte na produção de matéria seca do capim-elefante no Cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n.12, p.1282–1288, 2012.

GRANATO, L.O. **Capim elefante** (*Pennisetum purpureum* Schum.). São Paulo, Secretaria de Agricultura, 96p, 1924.

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, 283).

JACQUES, A. V. A. Caracteres morfológicos e suas implicações no manejo. In: CARVALHO, M.M. et al. **Capim-elefante**: produção e utilização. Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL, 1997. p. 31-46.

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

MIRANDA, C.H.B.; VIEIRA, A.; CADISCH, G. Determinação da Fixação Biológica de Nitrogênio no Amendoim Forrageiro (*Arachis* spp.) por Intermédio da Abundância Natural de ¹⁵N. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1859-1865, 2003 (Supl. 2)

MORAIS, R.F.; SOUZA, B.J.; LEITE, J.M. et al. Elephant grass genotypes for bioenergy production by direct biomass combustion. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.2, p.133-140, 2009.

MORAIS, R.F.; QUESADA, D.M.; REIS, V.M. et al. Contribution of biological nitrogen fixation to elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Plant and Soil**, v.347, p.1-12, 2011.

MOTA, V. J. G.; REIS, S. T. dos; SALES, E. C. J. de; ROCHA JÚNIOR, V. R.; OLIVEIRA, F. G. DE; WALKER, S. F.; MARTINS, C. E.; CÓSER, A. C. Lâminas de irrigação e doses de nitrogênio em pastagem de capim-elefante no período seco do ano no norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.6, p.1191-1199, 2010.

NASCIMENTO JUNIOR, D. **Informações sobre plantas forrageiras**. Viçosa, MG: UFV/Imprensa Universitária, 1975, 56 p.

PEREIRA, A.V. Escolha de variedade de capim elefante. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 10., 1993, Piracicaba. **Anais**. Piracicaba: ESALQ, 1993. p.47-62.

PEREIRA, J.O. Microrganismos endofíticos em espécies tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 1995. **Anais...** Sociedade Brasileira de Genética, Piracicaba – São Paulo. **Anais**, v. 20, p. 3, 1995.

PEREIRA, A.V.; AUAD, A.M.; LÉDO, F.J. da S.; BARBOSA, S. *Pennisetum purpureum*. In: FONSECA, D.M.; MARTUSCELLO, J.A. (Ed.). **Plantas forrageiras**. Viçosa: UFV, 2010, p. 197-219.

QUESADA, D.M.; BODDEY, R.M.; REIS, V.M.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. **Potencial de genótipos de *Pennisetum purpureum* para a alta produção de biomassa e eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN)**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2001. p.1-9, (Comunicado Técnico, 51).

QUESADA, D.M. **Seleção de genótipos de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) para a alta produção de biomassa e eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN)**. 2001. 119p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

RESENDE, A.S. DE; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. **Técnicas utilizadas na quantificação da fixação biológica de nitrogênio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 26p. (Documentos, 165).

RODRIGUES, L.R. de A.; PEDREIRA, J.V.S.; MATTOS H.B. de. Adaptação ecológica de algumas plantas forrageiras. **Zootecnia**, Nova Odessa, v.13, n.4, p.201-218, 1975.

REIS JUNIOR, F.B. dos; SILVA, L.G. da; REIS, V.M.; DOBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, p.985-994, maio, 2000.

RICHARDSON, A.E.; BAREA, J.M.; McNEILL, A.M.; COMBARET, C.P. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, 321:305–339, 2009.

SHEARER, G.; KOHL, D.H. N₂ fixation in field setting: estimations based on natural ¹⁵N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.13, n.6, p.699-756, 1986.

SILVA, L.L.G.G.; ALVES, G.C.; RIBEIRO, J.R.A.; URQUIAGA, S.; SOUTO, S.M.; FIGUEIREDO, M.V.; BURITY, H.A. Fixação biológica de nitrogênio em pastagens com diferentes intensidades de corte. **Archivos Zootecnia**. 59 (225): 21-30. 2010a.

SOLANO, B.R.; BARRIUSO, J.; MAÑERO, F.J.G. Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGRP). In: AHMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. (Eds.). **Plant-bacteria interactions: Strategies and techniques to promote plant growth**. Weinheim: Wiley-Vch Verlag, 2008. p. 41-52.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Sunderland: Sinauer Associates, 2006. 705p.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugarcane N-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v.56, p.105-114, 1992.

URQUIAGA, S., XAVIER, R.P., DE MORAIS, R.F., BAPTISTA, R.B., SCHULTZ, N., LEITE, J.M., MAIA ESÁ, J., BARBOSA, K.P., DE RESENDE, A.S., ALVES, B.J.R., BODDEY, R.M. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, 356, 5–21, 2012.

UNKOVICH, M.J.; HERRIDGE, D.F.; PEOPLES, M.B.; CADISCH, G.; BODDEY, R.M.; GILLER, K.E.; ALVES, B.; CHALK, P. **Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems**. Canberra: ACIAR, 2008. 258p.

VITOR, C.M.T.; FONSECA, D.M.; CÓSER, A.C. et al. Produção de matéria seca e valor nutritivo de pastagem de capim-elefante sob irrigação e adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.3, p.435-442, 2009.

VITTI, G.C.; HEIRINCHS, R. Formas tradicionais e alternativas de obtenção e utilização do nitrogênio e do enxofre: uma visão holística. In: YAMADA, Tsuioshi; STIPP; ABDALLA, Silvia Regina; VITTI, Godofredo Cesar. **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**. Piracicaba: IPNI Brasil, 2007.

WHYTE, R.O; MOIR, T.R.G.; COOPER, J.P. **Las gramíneas em La agricultura**. Rome, FAO, 1975. 45 p. (FAO – Estudos Universitários, 42).

ZANETTI, J.B. **Identificação de genótipos de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.) de alta produção de biomassa com qualidade para fins energéticos**.2010. p. 73. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica.

Capítulo II

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE *Pennisetum purpureum* Schum.

Fixação biológica de nitrogênio em genótipos de *Pennisetum purpureum* Schum.

Resumo – O objetivo desse trabalho foi avaliar a fixação biológica de nitrogênio (FBN), a ocorrência de bactérias endofíticas, produção de matéria seca da parte aérea (PMSPA) e altura em genótipos de capim elefante cultivados na Zona da Mata de Pernambuco, em diferentes níveis de nitrogênio (N). O delineamento em blocos casualizados, com três repetições, consistiu dos níveis de adubação de 0, 30, 60 e 90 kg de N ha⁻¹ corte⁻¹ e dos genótipos Mineirão, Taiwan A-146, Elefante B, IRI 381 e Pioneiro. No nível zero de adubação de N, avaliou-se a FBN e a densidade bacteriana endofítica nas raízes e colmos dos genótipos Elefante B, Pioneiro e Venezuela na época chuvosa e seca. A PMSPA e altura foram avaliadas em todos os níveis de adubação, em quatro cortes. Os genótipos Taiwan A-146, Elefante B e IRI 381 foram os mais promissores na PMSPA e FBN, indicando contribuições de até 57,2, 58,0 e 61,9%, respectivamente. A densidade de bactérias diazotróficas associada aos genótipos foi influenciada pelo tecido de colonização e época do ano. Os genótipos Pioneiro e Mineirão apresentaram, respectivamente, efeito linear e quadrático em resposta aos níveis de N. Os genótipos de capim elefante estudados são potencialmente fixadores de N.

Termos para indexação: *Pennisetum purpureum*, FBN, ¹⁵N, produção de matéria seca, endofíticos

Biological nitrogen fixation in *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes

Abstract - The aim of this study was to evaluate the biological nitrogen fixation (BNF), the occurrence of endophytic bacteria, dry matter production of shoots (PMSPA) and height in genotypes grown elephant grass in the forest zone of Pernambuco , at different levels of nitrogen (N). The randomized block design with three replications, consisted of fertilizer levels of 0, 30, 60 and 90 kg N ha⁻¹ cutting⁻¹ and legume genotypes, Taiwan A- 146, B Elephant, IRI 381 and Pioneer. At zero level of N fertilization, evaluated the BNF and endophytic bacterial density in the roots and stems of genotypes B Elephant, Pioneer and Venezuela in the rainy and dry season. The PMSPA and height were measured in all fertilization levels in four sections. The genotypes Taiwan A- 146, Elephant B and IRI 381 were the most promising in PMSPA and FBN, indicating contributions to 57.2, 58.0 and 61.9%, respectively. The density of diazotrophic bacteria associated with genotypes was influenced by tissue colonization and time of year. The Pioneer and legume genotypes, respectively, linear and quadratic effect in response to levels of N. The elephant grass genotypes studied are potentially fixers N.

Index terms: *Pennisetum purpureum*, FBN, ¹⁵N, production of dry matter, endophytic

Introdução

O capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) é uma das gramíneas forrageiras tropicais de maior potencial produtivo e, conseqüentemente, de elevada extração de nutrientes do solo, principalmente quando utilizada para corte, pois toda a forragem produzida é removida, reduzindo a ciclagem de nutrientes (Fonseca; Martuscello, 2010).

A produtividade dessa forrageira decorre, dentre outros fatores, do fornecimento de nitrogênio ao solo (Silva et al, 1996). Diversos estudos comprovaram que a adubação nitrogenada pode aumentar a produção de matéria seca de forrageiras com elevado potencial de produção (Magalhães et al., 2006; Flores et al., 2012).

O processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) em plantas de capim elefante tem sido relatado por diversos autores como uma importante fonte de contribuição de N (Souto, 1982; Souto; Takahashi, 1989; Quesada et al., 2001; Morais et al., 2011). Morais et al. (2009), trabalhando com os genótipos CNPGL F06-3, Gramafante, BAG 02, Roxo e Cameroon em solos de baixa fertilidade para produção de bioenergia, observaram que os genótipos Cameroon, CNPGL F06-3 e BAG 02 foram os mais promissores, obtendo contribuições da FBN de até 47, 52 e 41%, respectivamente.

Dentre as bactérias diazotróficas encontradas em associação com plantas de capim elefante, destacam-se aquelas pertencentes aos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum* (Reis et al., 2000). Assim, Kirchhof et al. (1997) isolaram e identificaram bactérias desses dois gêneros do interior de raízes das gramíneas forrageiras *Pennisetum purpureum*, *Miscanthus sinensis*, *Miscanthus sacchariflorus* e *Spartina pectinata*. Silva et al. (2010a) observaram a presença de bactérias do gênero *Azospirillum* spp. e da espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados às raízes de *P. purpureum* na Zona da Mata de Pernambuco, município de Itambé. Entretanto, o

potencial de fixação dessas bactérias depende da interação destas com o genótipo da planta, dos fatores ambientais e da competitividade com os demais microrganismos do local (Bergamaschi et al., 2007). Santos et al. (2013), avaliando a ocorrência de bactérias diazotróficas, em meio Nfb, associadas a forrageiras *Andropogon* (*Andropogon gayanus* Kunth), capim Tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia) e capim Buffel (*Cenchrus ciliari* L.) em duas épocas distintas no Semiárido Paraibano, observaram maior diversidade de espécies do gênero *Azospirillum* associadas às raízes no período mais seco do ano. Segundo estes mesmos autores, a ocorrência destas bactérias foi influenciada pelo genótipo da planta e estação do ano.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a contribuição de N derivado da fixação biológica de nitrogênio entre os diferentes genótipos de capim-elfante cultivados na Zona da Mata de Pernambuco, sem adição de N-fertilizante, bem como a ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas associadas às raízes e colmos de dois dos genótipos estudados, em duas épocas distintas. Também foram avaliadas a altura e produção de matéria seca desses mesmos genótipos submetidos a diferentes níveis de adubação nitrogenada em quatro ciclos de avaliação.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Estação Experimental de Itambé, do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA (7° 24' S, 35° 06' W e altitude de 190 m). O clima, segundo a classificação de Thornthwaite, é do tipo úmido subúmido megatérmico, com pluviosidade anual média de 1.300 mm e temperatura anual média de 25,1°C (CPRH, 2003). Durante o período experimental, de junho de 2012 a junho de 2013, a precipitação acumulada foi de 1246,6 mm (Figura 1) (APAC, 2014).

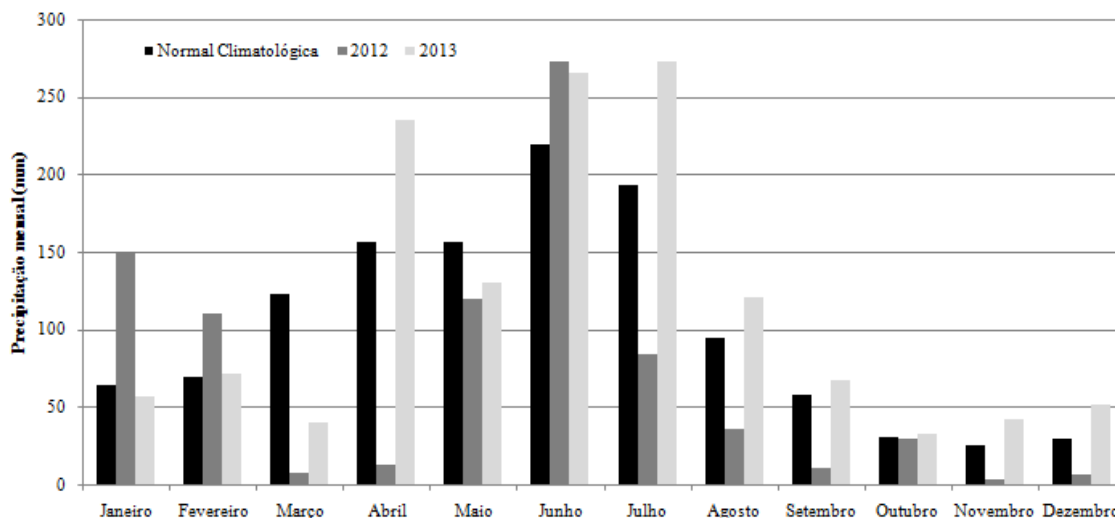


Figura 1. Precipitação mensal (mm) da Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco, Itambé, PE.

Fonte: APAC, 2014

O solo é classificado como Argissolo Vermelho-amarelo distrófico, com horizonte A proeminente de textura média/argilosa, fase florestal tropical subcaducifólia e relevo suave ondulado (Jacomine et al., 1973; Embrapa, 2006).

Os genótipos de capim-elefante foram plantados em maio de 2009, tendo sido aplicado 5 Mg ha⁻¹ de calcário dolomítico (PRNT = 75,6%) 60 dias antes do plantio, e uma adubação fosfatada (44 kg ha⁻¹ de P; superfosfato simples) e potássica (66 kg ha⁻¹ de K; cloreto de potássio) 60 dias após o plantio, com base na saturação de bases desejada (65%) e de acordo com a análise química de solo.

O experimento foi implantado com 30 genótipos de capim-elefante, sendo 6 cultivares de *Pennisetum* spp., 23 híbridos provenientes do cruzamento interespecífico entre os cultivares e milheto (IPA Bulk-1) e, o HV 241 (Elefante B x 23A). Porém, no presente trabalho, optou-se por trabalhar apenas com os cultivares Mineirão, Taiwan A-146, Elefante B, IRI 381 e Pioneiro, pois foram os que sobreviveram em todas as parcelas em quantidade suficiente para realizar a análise estatística. Aqueles genótipos

que foram perdidos devido a não adaptação às condições edafoclimáticas, no início do experimento, foram substituídos pelo cultivar IRI 381.

A área experimental foi disposta em delineamento em blocos ao acaso, com três repetições, em esquema de parcelas subdivididas. As parcelas principais consistiram de quatro níveis de adubação de N (0, 30, 60 e 90 kg de N ha⁻¹ corte⁻¹, na forma de uréia) e, as subparcelas, os genótipos Mineirão, Taiwan A-146, Elefante B, IRI 381 e Pioneiro, representados por uma única touceira (unidade experimental). As parcelas foram compostas por cinco fileiras de onze metros cada, com espaçamento de 1,0 x 2,0m (2 m² touceira⁻¹), sendo a área útil de 10 m², e a bordadura representada pela cultivar IRI 381.

Entre maio de 2009 e agosto de 2011, a área experimental foi utilizada para a tese de Cavalcante (2011), sendo utilizados os mesmos tratamentos experimentais e os genótipos cortados durante seis ciclos de avaliação.

Em março de 2012 foi realizada a amostragem do solo para análise química, coletando-se doze amostras simples e uma amostra composta por bloco, à profundidade de 0-0,2 m (Tabela 1).

Tabela 1. Características químicas do solo coletado (0-0,2 m) da área de cultivo dos genótipos de capim-elefante na Estação Experimental do IPA, município de Itambé, Pernambuco.

pH (H ₂ O)	P mg dm ⁻³	Na	K ⁺	Ca ⁺² + Mg ⁺² cmol _c dm ⁻³	Ca ⁺²	Al ³⁺	H+Al	C.O g kg ⁻¹	M.O.
5,82	12,25	0,15	0,09	5,67	3,93	0,13	6,12	28,3	48,8

C.O: Carbono orgânico

M.O: Matéria orgânica

Em junho de 2011, foi realizado um corte de uniformização rente ao solo, sendo essa produção desconsiderada da estimativa final da produção. Foram realizadas adubações fosfatadas (60 kg ha⁻¹ de P; superfosfato simples), potássicas (120 kg ha⁻¹ de K; cloreto de potássio), e de micronutrientes (20 kg ha⁻¹; B: 1,6%, Cu: 0,8%, Mn: 2%,

Mo: 0,1% e Zn: 9%), juntamente com os tratamentos nitrogenados, após cada corte de avaliação, sendo os adubos aplicados na superfície do solo, ao redor da touceira. Sempre que necessário foram realizadas capinas manuais.

As variáveis analisadas foram: produção de matéria seca da parte aérea (g.m^{-2} corte⁻¹), altura da planta (cm), abundância natural de ¹⁵N (‰), N acumulado (g m^{-2} corte⁻¹), nitrogênio derivado da atmosfera (%), fixação biológica de N (g.m^{-2} corte⁻¹) e densidade de bactérias diazotróficas endofíticas. Foram realizados quatro ciclos de avaliações, num intervalo de 90 dias entre os cortes (setembro/2012, dezembro/2012, março/2013 e junho/2013), devido às baixas precipitações durante o período experimental.

Para determinação da produção de matéria seca da parte aérea, as touceiras da área útil das parcelas foram cortadas rente ao solo e pesadas a campo. Três perfilhos, selecionados de forma a representar a touceira, foram retirados e a altura obtida a partir da base do perfilho mais desenvolvido até a extremidade da folha mais alta. Uma subamostra desses três perfilhos foi acondicionada em sacos de papel, pesada e pré-seca em estufa de circulação forçada de ar a 65° C por 72 horas. Posteriormente, estas subamostras foram moídas em moinho de facas tipo Wiley, em malha de 1 mm e uma alíquota retirada para determinação da matéria seca definitiva (Silva e Queiroz, 2002). No caso das parcelas no nível zero de adubação, a fração folha e colmo dos três perfilhos foram pesadas separadamente e, após pré-secagem, alíquotas de aproximadamente 20g foram trituradas em moinho de bola até obtenção de um pó fino e depois encaminhadas ao CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura) para determinação da abundância natural de ¹⁵N e %N, utilizando o espectrômetro de massa acoplado a um auto-analisador de C e N total.

A fixação biológica de nitrogênio nos genótipos estudados foi estimada utilizando-se a técnica da abundância natural de ^{15}N , com o percentual de nitrogênio da planta derivado da atmosfera (%N_{dda}), calculado através da seguinte fórmula (Shearer; Kohl, 1986):

$$\% \text{FBN} = \left(\frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{planta referência}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{planta teste}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{planta referência}} - \text{B}} \right) \times 100$$

Onde:

$\delta^{15}\text{N}$ da planta referência: valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ de plantas de jurubeba (*Solanum paniculatum* L), não fixadoras de N;

$\delta^{15}\text{N}$ da planta-teste: valor de $\delta^{15}\text{N}$ dos cultivares de capim-elefante;

B: valor da discriminação isotópica de ^{15}N feita pelas plantas durante o processo de FBN. Neste estudo, o valor considerado foi igual a zero.

As plantas de Jurubeba (*Solanum paniculatum* L) utilizadas como plantas de referência não fixadoras de N_2 , foram colhidas na mesma área experimental a cada ciclo de avaliação, coletando-se amostras de folha de várias plantas e fazendo-se uma amostra composta.

A quantidade de N fixado foi estimada multiplicando-se o valor de %N_{dda} pelo teor de N e produção de matéria seca de folhas, colmo e total (PMS de folha + PMS de colmo).

Em um experimento realizado à parte, para avaliar a ocorrência e densidade de microrganismos endofíticos associados ao capim-elefante, foram coletadas três amostras de raiz e de colmo dos genótipos Elefante B, Pioneiro e Venezuela, escolhidas aleatoriamente nas parcelas sem adubação nitrogenada. As coletas foram realizadas no período seco (outubro/2012) e no período chuvoso (maio/2013), aproximadamente 45 e 60 dias após o corte, respectivamente. Na primeira coleta (outubro/12), apenas amostras de raízes foram analisadas, sendo estas retiradas de um perfilho nos primeiros 20 cm de

profundidade do solo. As amostras de colmo foram retiradas entre 15 e 30 cm da base da planta. As amostras identificadas foram conservadas em recipiente térmico com bolsas de gelo e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do Solo da UFRPE para determinação da densidade de bactérias diazotróficas endofíticas de raiz e colmo, segundo metodologia de Döbereiner et al. (1995) e Kuklinsky-Sobral et al. (2004). As amostras de raízes e colmos foram lavadas em água corrente para retirada de partículas de solo aderidas e, depois de pesadas 5 g de cada, estas foram submetidas à desinfecção superficial (1 minuto em álcool 70 %; 3 minutos em hipoclorito de sódio; 30 segundos em álcool; e duas lavagens em água destilada estéril). Com auxílio de bisturi descartável, as raízes e colmos foram cortados em tamanhos menores e, posteriormente, procedeu-se com a maceração e a diluição seriada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) em tampão fosfato salino (PBS: 1,44 g L⁻¹ de Na₂HPO₄; 0,24 g L⁻¹ de KH₂PO₄; 0,20 g L⁻¹ de KCl; 8,00 g L⁻¹ de NaCl; pH 7,4), com posterior inoculação em triplicatas, em meio semisólido NFb, específico para *Azospirillum* spp. [5 g L⁻¹ de ácido málico; 0,5 g L⁻¹ de K₂HPO₄; 0,2 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 0,1 g L⁻¹ de NaCl; 0,01 g L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O; 4 mL L⁻¹ de Fe.EDTA (solução 1,64 %); 2 mL L⁻¹ de azul de bromotimol (0,5 %); 2 mL L⁻¹ de solução de micronutrientes (0,2 g L⁻¹ de Na₂MoO₄.2H₂O; 0,235 g L⁻¹ de MnSO₄.H₂O; 0,28 g L⁻¹ de H₃BO₃; 0,008 g L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O); 1,75 g L⁻¹ da ágar; pH 6,8]. Em cada recipiente inoculado foi acrescido 50 µg mL⁻¹ do fungicida Cercobin 700 WP (Tiofanato metílico, 700g/kg) para evitar a contaminação por fungos.

Todos os inóculos foram incubados a 28°C em incubadora BOD, sendo considerados positivos os frascos que apresentaram a formação de um halo de crescimento em forma de véu no interior do meio, no oitavo dia. Utilizou-se a tabela de McCrady para determinar o Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas por grama de tecido fresco de raízes e colmo, segundo Döbereiner et al. (1995).

Os dados de produção de MS, altura e FBN foram analisados utilizando o procedimento mixed do SAS. Foram considerados efeitos fixos os genótipos, avaliações, níveis de N e suas interações. Bloco foi considerado efeito aleatório. Foi utilizado o procedimento ‘repeated’, sendo a avaliação considerada a medida repetida. As médias dos quadrados mínimos foram comparadas utilizando o procedimento PDIFF do SAS, ajustado para Tukey a 5%. Para variáveis que apresentaram efeito significativo dos níveis de N, foi realizado contraste ortogonal polinomial, observado se ocorreu efeito linear ou quadrático ($P < 0,05$). Para a FBN, devido a maior variabilidade, foram considerados significativos os resultados com $P < 0,10$.

As análises quantitativas de densidade populacional foram submetidas à análise de variância (ANOVA) através do programa estatístico SISVAR 5.3[®] e a comparação entre as médias, realizada pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

Não foi observado efeito significativo ($P > 0,05$) da adubação nitrogenada para a produção de matéria seca da parte aérea dos genótipos de capim elefante (Tabela 2), provavelmente devido às baixas precipitações pluviais que ocorreram durante a execução do experimento, resultando em baixa eficiência de utilização do adubo nitrogenado, uma vez que este foi aplicado a lanço e na superfície do solo. Além disso, o erro padrão muito alto pode ter mascarado o efeito das doses de N sobre os genótipos de capim-elefante.

Os genótipos mais produtivos foram o Taiwan A-146, Elefante B e IRI 381, seguido pelo Mineirão, que obteve rendimento intermediário, e o Pioneiro, o rendimento mais baixo. A produção de MS do Taiwan A-146 obtida nesse trabalho foi inferior aos valores observados por Santos et al. (1994) que, ao aplicar 10 t ha^{-1} de

esterco de curral no início de cada período chuvoso, obtiveram produção (média de dois anos) de 1,63 g m⁻² de MS no agreste Pernambucano.

Tabela 2. Produção de matéria seca (PMS) da parte aérea dos genótipos de *Pennisetum purpureum* Schum., cultivados na Estação Experimental do IPA, Itambé, PE. Média de quatro ciclos de avaliação.

Genótipos	PMS (g m ⁻² corte ⁻¹)	Erro Padrão
Mineirão	503 B	139
Taiwan A-146	870 A	131
Elefante B	1208 A	133
IRI 381	899 A	131
Pioneiro	395 C	137

Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Na Tabela 3 é demonstrada a produção de matéria seca dos genótipos de *P. purpureum* por ciclo de avaliação. Os resultados demonstraram que as maiores produções de biomassa dos genótipos ocorreram no ciclo de setembro e junho, devido a maior intensidade de chuvas que ocorreu durante o período crítico de crescimento das plantas nos meses que antecederam o corte, sendo registrada precipitação acumulada de 393,1 e 406,6 mm para os ciclos de setembro e junho, respectivamente.

Tabela 3. Produção de matéria seca (PMS) da parte aérea dos genótipos de *Pennisetum purpureum* Schum. em função dos ciclos de avaliação, cultivados na Estação Experimental do IPA, Itambé, PE.

Ciclos de avaliações	PMS (g m ⁻² corte ⁻¹)	Erro Padrão
Setembro/2012	1075 A	134
Dezembro/2012	553 B	134
Março/2013	445 B	132
Junho/2013	1027 A	137

Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Em relação à altura, houve interação significativa (P<0,05) entre genótipos e ciclos de avaliação (Tabela 4), sendo as maiores alturas verificadas nos genótipos

Taiwan A-146 (ciclo de setembro), Mineirão, Elefante B e IRI 381 (ciclo de dezembro) e Mineirão (ciclo de junho).

De modo geral, todos os genótipos nos ciclos de setembro e junho, exceto o Taiwan A-146 neste último, apresentaram altura da planta acima de 200 cm. A maior intensidade de chuvas que ocorreu nos meses anteriores ao corte favoreceu o crescimento das plantas e, como verificado anteriormente, a produção de MS nestes dois ciclos de avaliação.

Os resultados obtidos neste estudo foram superiores ao de Silva et al. (2010b) e Silva et al. (2008a), que encontraram altura de 147 cm para o Mineirão, e de 130 e 112 cm para o IRI-381 e Elefante B, respectivamente, aos 60 dias de crescimento.

Tabela 4. Altura (cm) dos genótipos de *P. purpureum* Schum. em função dos ciclos de avaliações, Estação Experimental do IPA, Itambé, PE

Genótipos	Ciclos de Avaliação			
	Set/12	Dez/12	Mar/13	Jun/13
Mineirão	210 Bb (10)	160 Ac (10)	147 Ac (10)	247 Aa (10)
Taiwan A-146	233 Aa (9)	158 Bc (10)	141 Ac (9)	198 Cb (10)
Elefante B	200 Ba (10)	168 Ab (10)	156 Ab (9)	220 Ba (10)
IRI 381	205 Ba (9)	180 Ab (9)	157 Ac (9)	221 Ba (10)
Pioneiro	206 Ba (10)	158 Bb (9)	150 Ab (9)	210 Ba (11)

Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os números entre parênteses referem-se ao erro padrão.

Foi observada interação significativa ($P < 0,05$) entre os genótipos e níveis de N na altura das plantas (Tabela 5). De modo geral, não houve diferença entre os genótipos de capim elefante nos tratamentos sem adubação e adubados com 60 e 90 kg de N ha⁻¹ corte⁻¹, exceto para os genótipos Pioneiro, Taiwan A-146 e Mineirão, respectivamente, os quais apresentaram os menores valores de altura. No nível de adubação de 30 kg de N ha⁻¹ corte⁻¹, o Mineirão e o IRI 381 foram os que se destacaram. Estes resultados foram superiores aos de Bhering et al. (2008) que, com o cultivar Napier Roxo,

apresentaram altura média de 127 cm aos 90 dias, durante a época seca, na Depressão Cuiabana.

A análise de regressão revelou significância da adubação nitrogenada sobre a altura das plantas dos genótipos Mineirão e Pioneiro, que apresentaram efeito quadrático e linear, respectivamente. Mota et al. (2010), avaliando a aplicação de lâminas d'água e doses de N no cultivar Pioneiro no norte de Minas Gerais, também observaram resposta linear positiva para a altura de plantas. Cruz et al. (2010), trabalhando com o cv. Cameroon, no Norte de Tocantins, observaram que a altura de plantas no Argissolo, apresentou tendência quadrática em resposta às doses de N, e, no Neossolo, resposta linear. Por outro lado, Cavalcante et al. (2013), em estudos na Zona da Mata de Pernambuco, observaram que a altura dos genótipos Mineirão, Taiwan A-146, Elefante B, IRI 381 e Pioneiro se ajustou a uma função cúbica, cujo ponto de máxima foi 1,54 m com a dose de 75 kg N ha⁻¹ corte⁻¹. Segundo esse autor, os diferentes comportamentos dos genótipos, em função das doses de N, podem ser explicados pela variação genética dos genótipos.

Tabela 5. Altura (cm) dos genótipos de *P. purpureum* Schum. em função das doses de nitrogênio (kg de N ha⁻¹ corte⁻¹), Estação Experimental do IPA, Itambé, PE

Genótipos	Adubação nitrogenada (kg de N ha ⁻¹ corte ⁻¹)				Efeito
	0	30	60	90	
Mineirão	166 A (12)	219 A (11)	205 A (11)	174 B (12)	Q
Taiwan A-146	178 A (11)	194 B (11)	177 B (11)	180 A (11)	NS
Elefante B	184 A (11)	182 B (11)	181 A (11)	197 A (10)	NS
IRI 381	182 A (11)	195 A (11)	197 A (11)	187 A (11)	NS
Pioneiro	153 B (11)	169 B (11)	195 A (12)	206 A (11)	L

Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Q = quadrático (P = 0,0114); L = linear (P = 0,0107) e NS = não significativo (P > 0,05). Os números entre parênteses referem-se ao erro padrão.

Houve interação significativa (P<0,05) entre genótipos de *P. purpureum* e ciclos de avaliação para a abundância natural de ¹⁵N (Tabela 6). Com exceção dos genótipos

Mineirão e Taiwan A-146 no ciclo de março, os valores da abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ observados nos genótipos de *P. purpureum* foram inferiores aos obtidos da planta referência (Jurubeba), não fixadora de N (6,48‰), possibilitando a aplicação da técnica do $\delta^{15}\text{N}$ para a estimativa da contribuição da FBN nas plantas de capim-elefante. Silva et al. (2010a), em experimento na Zona da Mata de Pernambuco, utilizando Jurubeba como planta referência não fixadora de N, encontraram abundância natural de ^{15}N em média de 5,8‰.

Tabela 6. Abundância natural de ^{15}N (‰) dos genótipos de *P. purpureum*, no nível zero de N, em função dos ciclos de avaliação, na Estação Experimental do IPA, Itambé, PE.

Genótipos	Ciclos de avaliação			
	Set/12	Dez/12	Mar/13	Jun/13
	^{15}N			
Mineirão	2,76 Bc (0,33)	2,45 Ac (0,40)	6,85 Aa (0,40)	3,64 Ab (0,33)
Taiwan A-146	2,77 Bc (0,33)	2,83 Ac (0,33)	6,85 Aa (0,33)	4,15 Ab (0,33)
Elefante B	2,92 Ac (0,33)	2,72 Ac (0,39)	5,23 Ba (0,33)	3,80 Ab (0,33)
IRI 381	3,68 Ac (0,33)	2,47 Ad (0,33)	6,06 Aa (0,33)	4,07 Ab (0,33)
Pioneiro	3,01 Ac (0,39)	2,34 Ac (0,33)	6,17 Aa (0,33)	3,98 Ab (0,33)

Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os números entre parênteses referem-se ao erro padrão. Jurubeba = 6,48‰.

Foram observadas diferenças significativas entre os genótipos nos ciclos de setembro e março, com valores variando entre 2,76 a 3,68 (Mineirão e IRI 381) e 5,23 a 6,85 (Elefante B e Mineirão), respectivamente (Tabela 6). Os maiores valores da abundância natural de ^{15}N no ciclo de março podem estar relacionados à menor diluição do ^{15}N devido à absorção do N-mineral do solo pela planta. Considerando que foi realizada uma capina manual, as precipitações durante este ciclo favoreceram a decomposição e mineralização da matéria orgânica aumentando, desta forma, a disponibilidade de N no solo e, conseqüentemente, inibindo a fixação de N por bactérias diazotróficas. Já nos ciclos de dezembro e junho, não houve diferença significativa

entre os genótipos. Os menores valores da abundância de ^{15}N ocorreram nos dois primeiros ciclos (setembro e dezembro), possivelmente devido à associação de bactérias diazotróficas associadas às plantas de capim-elefante (Tabela 6).

Quanto à contribuição do N derivado da atmosfera (Tabela 7), diferenças significativas foram observadas no ciclo de setembro, em que a menor contribuição de N foi obtida pelo IRI 381 (43,2%), e, a maior, pelo Mineirão (57,4%), que não diferiu significativamente do Taiwan A-146, Elefante B e Pioneiro. Já no ciclo de março, os maiores valores foram observados no Elefante B (19,3%) e IRI 381 (6,4%), que foram superiores aos demais genótipos. Não houve diferença significativa entre os genótipos nas avaliações de dezembro e junho.

As maiores contribuições ocorreram nos dois primeiros ciclos de avaliação para todos os genótipos, o que era esperado, devido aos menores valores da abundância natural de ^{15}N nesses ciclos. Considerando que estes genótipos não foram adubados com N-fertilizante há mais de quatro anos de cultivo, pode-se dizer que a matéria orgânica do solo e a FBN foram as principais fontes fornecedoras de N nas parcelas zero de adubação. A FBN contribuiu com até 63,9% de N derivado da FBN.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Morais et al. (2009) e Morais et al. (2011) que, trabalhando com diferentes genótipos de capim elefante e utilizando o valor médio de ^{15}N das espécies de referência *Emilia sonchifolia*, *Tradescantia fluminensis*, *Arnica Montana* e *Richardia brasiliensis*, encontraram contribuições entre 21% e 52% e 18% e 70% da FBN, respectivamente.

Em relação ao acúmulo de N (Tabela 7), foi verificada interação significativa ($P < 0,05$) entre os genótipos e ciclos de avaliação. Diferenças entre os genótipos foram observadas nos ciclo de março e junho, sendo os maiores valores observados nos genótipos Elefante B, IRI 381 e Taiwan A-146. Diferenças significativas também foram

observadas nestes mesmos genótipos e no Mineirão em relação aos ciclos de avaliação, que também obtiveram o maior acúmulo de N nos ciclos de março e junho.

Considerando a média dos quatro ciclos de avaliação, os genótipos Elefante B, IRI 381 e Taiwan A-146 obtiveram, após 12 meses, o equivalente a 22,29, 31,34 e 30,5 g m⁻² de N acumulado pelas plantas, respectivamente. O elevado acúmulo de N nesses genótipos, aliado ao alto desempenho destes quanto à produção de matéria seca, pode ser um forte indicativo de contribuições da FBN, uma vez que nenhum N-fertilizante foi adicionado nessa área. Morais et al. (2009), trabalhando com cinco genótipos em dois tipos de solo (argissolo e planossolo), obtiveram, em três cortes, médias de 29,6 e 28,7 g m⁻² de N acumulado em 22 meses, respectivamente. Morais et al. (2011), em experimento em Seropédica, RJ, observaram que o maior acúmulo de N, em 34 meses, foi obtido nos os genótipos Bag 02, CNPGL F06-3 e Cameroon, com 51,5, 45,9 e 43,3 g de N m⁻², respectivamente.

Tabela 7. Estimativa da contribuição de nitrogênio derivado da atmosfera (%Ndda) e acúmulo de N (g m⁻² corte⁻¹) dos genótipos de *P. purpureum*, no nível zero de N, em função dos ciclos de avaliação, na Estação Experimental do IPA, Itambé, PE.

Genótipos	Ciclos de avaliação			
	Set/12	Dez/12	Mar/13	Jun/13
	%Ndda			
Mineirão	57,4 Aa (5,14)	62,2 Aa (6,12)	0,0 Bc (6,11)	43,7 Ab (5,14)
Taiwan A-146	57,2 Aa (5,14)	56,4 Aa (5,14)	0,0 Bc (5,14)	35,9 Ab (5,14)
Elefante B	55,0 Aa (5,14)	58,0 Aa (6,05)	19,3 Ac (5,14)	41,4 Ab (5,14)
IRI 381	43,2 Bb (5,14)	61,9 Aa (5,14)	6,4 Ac (5,14)	37,2 Ab (5,14)
Pioneiro	53,4 Aa (5,95)	63,9 Aa (5,14)	4,8 Bc (5,14)	38,6 Ab (5,14)
	Acúmulo de N (g m ⁻² corte ⁻¹)			
Mineirão	1,98 Ab (1,83)	0,58 Ab (2,10)	1,03 Bb (2,10)	5,80 Ba (1,83)
Taiwan A-146	5,08 Ab (1,83)	3,46 Ab (1,83)	5,98 Ba (1,83)	7,77 Aa (1,83)
Elefante B	6,29 Ab (1,83)	2,85 Ab (2,08)	11,3 Aa (1,83)	10,9 Aa (1,83)
IRI 381	6,76 Ab (1,83)	4,15 Ab (1,83)	10,7 Aa (1,83)	8,89 Aa (1,83)
Pioneiro	1,82 Aa (1,94)	1,32 Aa (1,83)	3,10 Ba (1,83)	3,02 Ba (1,83)

Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os números entre parênteses referem-se ao erro padrão.

Houve efeito significativo das frações colmo e folha dos genótipos de capim elefante sobre as variáveis $\delta^{15}\text{N}$, teor de N, %Ndda e FBN (Tabela 8). Quanto à abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$), os menores valores foram obtidos na fração colmo, que, conseqüentemente, apresentou o maior percentual de contribuição de N derivado da atmosfera. Porém, a quantidade de N fixado pela contribuição da FBN foi maior nas folhas, provavelmente devido ao maior acúmulo de N nesses tecidos, seja esse proveniente da FBN ou da absorção de N do solo.

Tabela 8. Abundância natural de ^{15}N (‰), teor de N (%), contribuição de nitrogênio derivado da atmosfera (%) e FBN ($\text{g m}^{-2}\text{corte}^{-1}$) da fração colmo e folha dos genótipos de *P. purpureum*, no nível zero de N, na Estação Experimental do IPA, Itambé, PE.

Tecido da planta	^{15}N	%N	%Ndda	FBN*($\text{g m}^{-2}\text{corte}^{-1}$)
Colmo	3.57 B (0.16)	0.74 B (0.07)	44.9 A (2.51)	0,67 B (0,16)
Folha	4.31 A (0.16)	1.22 A (0.07)	33.5 B (2.51)	0,89 A (0,16)

Médias seguidas por letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. * Significativo a 10% de probabilidade. Os números entre parênteses referem-se ao erro padrão.

No que se refere à quantidade de N fixado biologicamente, os maiores valores foram encontrados nos genótipos Elefante B, IRI 381 e Taiwan A-146 (Tabela 9), provavelmente devido às maiores produções de matéria seca dos mesmos (Tabela 2) e ao %Ndda dos genótipos (Tabela 7), que está relacionada à presença de bactérias diazotróficas endofíticas associadas aos tecidos das plantas.

Tabela 9. Fixação biológica de nitrogênio (g de N m^{-2}) dos genótipos de *P. purpureum* no nível zero de N, na Estação Experimental do IPA, Itambé, PE.

Genótipos	FBN ($\text{g m}^{-2}\text{corte}^{-1}$)	Erro Padrão
Mineirão	0.90 B	0.68
Taiwan A-146	1.89 A	0.65
Elefante B	3.12 A	0.66
IRI 381	2.19 A	0.65
Pioneiro	0.71 B	0.66

Médias seguidas por letras iguais, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 10% de probabilidade.

O genótipo Pioneiro foi o que obteve os menores valores da FBN, não diferindo do Mineirão. Estes resultados evidenciam o forte efeito que o genótipo exerce sobre a contribuição de N proveniente da associação não simbiótica com bactérias diazotróficas.

Na Tabela 10 são demonstrados os resultados quanto à densidade populacional de endofíticos de raiz em duas épocas do ano. Houve interação significativa ($P < 0,05$) entre os genótipos de capim elefante e o período de ano, sendo que não houve diferença entre genótipos dentro de cada período. Silva et al. (2010a) em plantas de capim elefante na Zona da Mata de Pernambuco, detectaram bactérias do gênero *Azospirillum* spp. na intensidade de corte de 25 cm de altura, na época das águas.

Não foi observada diferença entre os períodos de avaliação, com exceção do cultivar Pioneiro, que apresentou as maiores densidades no período seco. Resultados semelhantes também foram observados por Santos et al. (2013), que trabalhando com *Andropogon* (*Andropogon gayanus* Kunth), capim tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia) e capim buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) no Semiárido Paraibano, observaram maior densidade de bactérias do gênero *Azospirillum* associadas às raízes das forrageiras, no período mais seco do ano e, por Brasil et al. (2005) que, trabalhando com *Brachiaria humidicola*, *Elyonurus muticus* (capim-corona) e *Axonopus purpisii* (capim-mimoso) no Pantanal Sul Matogrossense, encontraram menor número de bactérias nas raízes e solo na época chuvosa. Reis Junior et al. (2004) também observaram influência da espécie vegetal e da época do ano sobre a população de bactérias associadas as raízes de *Brachiaria* spp. Segundo os autores, esse efeito pode ser explicado pela influência de fatores ambientais, principalmente estresse hídrico, sobre as populações de microrganismos diazotróficos.

Tabela 10. Log do número mais provável (NMP) de células g⁻¹ de tecido vegetal fresco (TVF) da densidade populacional de bactérias endofíticas associadas à raiz de genótipos de *P. purpureum*, cultivados no nível zero de N, em duas épocas do ano, na Estação Experimental do IPA, Itambé, PE.

Genótipos	Log do NMP de células g ⁻¹ de TVF		CV (%)
	Período chuvoso (Mai/13)	Período seco (Out/2012)	
Elefante B	4,06Aa	4,47Aa	19,53
Venezuela	3,68Aa	4,00Aa	
Pioneiro	3,95Ab	5,14Aa	
CV (%)	23,86	23,86	

Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Houve interação significativa ($P < 0,05$) entre genótipos de capim elefante e nichos de colonização (Tabela 11), sendo que não foi observada diferença entre os genótipos para cada nicho de colonização, exceto para o cultivar Venezuela, em que as maiores densidades populacionais foram obtidas no colmo. Estes resultados divergem dos obtidos por Pariana-Llanos et al. (2010), que avaliando a influência da fertilização orgânica em cana de açúcar, observaram maior número de bactérias diazotróficas endofíticas no nicho de raiz e por Mendes et al. (2007) que, trabalhando com cana-de-açúcar encontraram menor densidade de bactérias endofíticas isoladas no colmo, quando comparadas a endofíticas de raiz e da rizosfera.

Tabela 11. Log do número mais provável (NMP) de células g⁻¹ de tecido vegetal fresco (TVF) da densidade populacional de bactérias endofíticas associadas a genótipos de *P. purpureum*, cultivados no nível zero de N, nos nichos de colonização de raiz e colmo, durante a época chuvosa, na Estação Experimental do IPA, Itambé, PE.

Genótipos	Log do NMP de células g ⁻¹ de TVF	
	Nicho de Raiz	Nicho de Colmo
Elefante B	4,06 Aa	4,18 Aa
Venezuela	3,68 Ab	4,78 Aa
Pioneiro	3,95 Aa	4,18 Aa
CV (%)	11,99	9,46

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna e letras minúsculas iguais na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Apesar de ter sido observada a ocorrência de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum*, colonizando raízes e colmos de genótipos de capim-elefante cultivados em solo sem adubação nitrogenada, é necessário que esses isolados sejam caracterizados, fisiologicamente e geneticamente, e avaliados quanto ao seu potencial em fixar nitrogênio eficientemente.

Conclusões

A contribuição da FBN em capim-elefante é influenciada pelo genótipo da planta e ciclos de avaliação.

Os genótipos Taiwan A -146, Elefante B e IRI 381 foram os mais promissores na FBN e os que apresentaram os maiores valores de PMS e acúmulo de N.

Bactérias diazotróficas endofíticas ocorrem em associação com os genótipos de capim-elefante. A densidade populacional, no entanto, é influenciada pelo tipo de tecido da planta e época do ano.

Faz-se necessária a realização de estudos mais aprofundados, para que estes isolados sejam caracterizados geneticamente e avaliados quanto ao seu potencial de FBN.

Referências Bibliográficas

APAC, Agência Pernambucana de Águas e Clima. Disponível em: <http://www.apac.pe.gov.br/meteorologia/monitoramento-pluvio.php>. Acesso em: 15 de janeiro de 2013.

BERGAMASCHI, C.; ROESCH, L.F.W.; QUADROS, P.D de, CAMARGO, F.A. de O. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 37, n. 3, p.727-733, mai-jun, 2007.

BRASIL, M. da S.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal sul matogrossense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 29:179-190, 2005

BHERING, M.; CABRAL, L. da S.; ABREU, J.G. de; SOUZA, A.L. de; ZERVOUDAKIS, J.T.; RODRIGUES, R.C.; PEREIRA, G.A.C.; REVERDITO, R.; OLIVEIRA, Í.S. de. Características agronômicas do capim-elefante roxo em diferentes idades de corte na Depressão Cuiabana. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, v.9, n.3, p. 384-396, jul/set, 2008.

CPRH, Companhia Pernambucana do Meio Ambiente. **Diagnóstico sócio ambiental do litoral norte de Pernambuco**. Recife, 2003. 214p.

CAVALCANTE, M. **Aspectos produtivos e genéticos de *Pennisetum* spp. sob níveis de nitrogênio na zona da mata de Pernambuco**. 2011. 84p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

CAVALCANTE, M.; LIRA, M.A.; SANTOS, M.V.F.; SANTORO, K.R.; FERREIRA, R.L.C.; LEÃO NETO, J.M.C. Potencial produtivo de *pennisetum* spp. sob níveis de nitrogênio na Zona da Mata de Pernambuco. **Archivos de Zootecnia**. v.62, p.2. 2013.

CRUZ, R.S. da; SANTOS, A.C. dos; CASTRO, J.G.D.; ALEXANDRINO, E.; CARAÇA, D.C.; DINIZ, J.P. Produtividade do Capim-Cameroon estabelecida em duas classes de solos e submetido a doses crescentes de nitrogênio no norte tocantinense. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, 32: 393-399, 2010.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 60p.1995.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 2006, 306 p.

FONSECA, D.M. da; MARTUSCELLO, J.A. Adubação e fertilidade do solo em capim-elefante. In: LIRA, M. de A.; SANTOS, M.V.F. dos; DUBEUX JÚNIOR, J.C.B.; MELLO, A.C.L. de (Ed.). **Capim-elefante: fundamentos e perspectivas**. Recife: IPA: UFRPE, 2010. p.113-142.

FLORES, R.A.; URQUIAGA, S.S.; ALVES, B.J.R.; COLLIER, L.S. MORAIS, R. F. DE, PRADO, R. DE M.. Adubação nitrogenada e idade de corte na produção de matéria

seca do capim-elefante no Cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n.12, p.1282–1288, 2012.

JACOMINE, P. K. T.; CAVALCANTI, A. C.; BURGOS, N.; PESSOA, S. C. P.; SILVEIRA, C. O. **Levantamento exploratório - reconhecimento de solos do Estado de Pernambuco**. Boletim Técnico 26 Série Pedologia, 14: Recife, SUDENE, 1973, p. 359.

KIRCHHOF, G.; SCHLOTTER, M.; AbMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biology & Biochemical**, 29:853-862, 1997.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v.6, p.1244-1251, 2004.

MAGALHÃES, J.A.; LOPES, E.A.; RODRIGUES, B.H.N.; COSTA, N. de L.; BARROS, N.N.; MATTEI, D.A. Influência da adubação nitrogenada e da idade de corte sobre o rendimento forrageiro do capim-elefante. **Revista Ciência Agronômica**, v.37, n.1, p.91-96, 2006.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ARAUJO, W.L.; RAAIJMAKERS, J.M. Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates. **Applied and environmental microbiology**, Nov., p. 7259–7267. 2007.

MORAIS, R.F.; SOUZA, B.J.; LEITE, J.M. et al. Elephant grass genotypes for bioenergy production by direct biomass combustion. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.2, p.133-140, 2009.

MORAIS, R.F. de; QUESADA, D.M.; REIS, V.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. Contribution of biological nitrogen to Elephant Grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Plant Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 23-34, 2011.

MOTA, V. J. G.; REIS, S. T. dos; SALES, E. C. J. de; ROCHA JÚNIOR, V. R.; OLIVEIRA, F. G. DE; WALKER, S. F.; MARTINS, C. E.; CÓSER, A. C. Lâminas de irrigação e doses de nitrogênio em pastagem de capim-elefante no período seco do ano no norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.6, p.1191-1199, 2010.

PARIONA-LLANOS, R.; FERRARA, F.I.S.; GONZALES, H.H.S.; BARBOSA, H. R. Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. **European Journal of Soil Biology**, v.46, p.387-393, 2010.

QUESADA, D.M.; BODDEY, R.M.; REIS, V.M.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. **Potencial de genótipos de *Pennisetum purpureum* para a alta produção de biomassa e eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN)**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2001. p.1-9, (Comunicado Técnico, 51).

REIS JUNIOR, F.B.; SILVA, M.F.; TEIXEIRA, K.R.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados à *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 28:103-113, 2004

REIS, V.M.; REIS JÚNIOR, F.B. dos; SALLES, J.F.; SCHLOTTER, M. Characterisation of different polyclonal antisera to quantify *Herbaspirillum* spp. in elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schun.). **Symb.** 29 (2), 139-150, 2000.

SANTOS, M.C.M.; SANTOS, D.R.; BAKKE, O. A.; BAKKE, I.A. Ocorrência e atividade de bactérias diazotróficas em forrageiras cultivadas na região Semiárida no Brasil. **Revista caatinga**, v.26, p.27-34, 2013.

SILVA, L.L.G.G.; ALVES, G.C.; RIBEIRO, J.R.A.; URQUIAGA, S.; SOUTO, S.M.; FIGUEIREDO, M.V.; BURITY, H.A. Fixação biológica de nitrogênio em pastagens com diferentes intensidades de corte. **Archivos Zootecnia**. 59 (225): 21-30. 2010a.

SILVA, A.L.C. da; SANTOS, M.V.F. dos; DUBEUX JÚNIOR, J.C.B.; LIRA, M. de A.; FERREIRA, R.L.C.; FREITAS, E.V. de; CUNHA, M.V. da; SILVA, M. da C. Variabilidade e herdabilidade de caracteres morfológicos em clones de capim-elefante na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.10, p.2132-2140, 2010b

SILVA, D. J. e QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos (Métodos químicos e biológicos)**. 3ª ed. Viçosa-MG, UFV, Editora UFV, 235p. 2002.

SILVA, M.A da; LIRA, M. de A.; SANTOS, M.V.F. dos; DUBEUX JUNIOR, J.C.B.; CUNHA, M.V. da; FREITAS, E.V. de. Análise de trilha em caracteres produtivos de *Pennisetum* sob corte em Itambé, Pernambuco. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.37, n.7, p.1185-1191, 2008a

SILVA, S.C. da; CORSI, M.; FARIA, V.P. de. Correção do solo e adubação de pastagens de Capim elefante. In: PEIXOTO, A.M.; MOURA, J.C. de; FARIA, V.P. de (Ed.). **Pastagens de capim elefante: utilização intensiva**. Piracicaba: FEALQ, 1996. p. 29-49.

SOUTO, S.M. & TAKAHASHI, N.T. Efeito do manejo de forrageiras na fixação biológica de nitrogênio. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 26, 1989, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: SBZ. Porto Alegre, 1989. p. 407.

SOUTO, S.M. 1982. **Variação estacional da fixação de N₂ e desnitrificação em gramíneas forrageiras tropicais**. 1982. 268 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica.

SHEARER, G.; KOHL, D.H. N₂ fixation in field setting: estimations based on natural ¹⁵N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.13, n.6, p.699-756, 1986

SANTOS, M. do C.S.; TABOSA, J.N.; DIAS, F.M.; FREITAS, E.V.; LIRA, M. de A. Comportamento de clones de capim-elefante e de híbridos de capim-elefante x milheto

no Semi-árido do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**.v.29, n.10, p.1609-1615, out. 1994.