

VARIAÇÃO ESTACIONAL DA FIXAÇÃO DE N₂ E ASSIMILAÇÃO DE NITRATO EM GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS TROPICAIS¹

SEBASTIÃO MANHÃES SOUTO e JOHANNA DÖBEREINER²

RESUMO - Foi feito um experimento de campo com a finalidade de estudar a variação estacional da fixação de N₂, assimilação do nitrato, número de bactérias fixadoras de N₂ e produtividade de cinco cultivares de gramíneas forrageiras tropicais. As gramíneas foram: *Hyparrhenia rufa* (jaraguá), *Digitaria decumbens* cultivares A-21 e Transvala) e *Pennisetum purpureum* (cultivares Napier e Cameron). Observou-se uma correlação altamente significativa ($r = 0,76^{**}$) entre precipitação e atividade da nitrogenase, sendo mais evidente essa influência na cv. Cameron. Não houve diferença na atividade da nitrogenase entre genótipos no período seco. Os efeitos do N na redutase de nitrato foram observados, no máximo, até quatro semanas após cada aplicação da adubação. Em todos os genótipos, menos de 10% das bactérias estavam localizadas na parte interna da raiz. Contudo, houve correlação, nas três cultivares, Cameron ($r = 0,66^{**}$), Pangola ($r = 0,45^*$) e Transvala ($r = 0,41^*$), das bactérias no interior das raízes com a atividade da nitrogenase. A população maior de bactérias no exterior das raízes não mostrou correlação nenhuma com a atividade da nitrogenase.

Termos para indexação: atividade da nitrogenase, assimilação de nitrato, atividade da redutase de nitrato, bactéria fixadora de N₂ atmosférico.

SEASONAL VARIATION OF DINITROGEN FIXATION AND ASSIMILATION OF NITRATE IN TROPICAL FORAGE GRASSES

ABSTRACT - A field experiment was carried out to study the seasonal patterns of N₂-fixation, assimilation of nitrate and population of N₂-fixing bacteria on roots of tropical forage grasses under frequent nitrate applications. The grasses used were: *Hyparrhenia rufa* (Jaraguá), *Digitaria decumbens* (cvs. Pangola A-21 and Transvala) and *Pennisetum purpureum* (cvs. Napier and Cameron). Rainfall and nitrogenase activity were positively correlated ($r = 0,76^{**}$), especially with the cultivar Cameron, the genotype which showed in general highest nitrogenase activities. There was no difference in nitrogenase activity among cultivars during the dry season. The effects of fertilization with nitrogen on nitrate reductase activities lasted up to four weeks after each fertilizer application. All genotypes contained less than 10% of the bacteria inside the root, which however in three cultivars, Cameron ($r = 0,66^{**}$), Pangola ($r = 0,45^*$) and Transvala ($r = 0,41^*$), were significantly correlated with nitrogenase activity of the roots. The larger external population showed no correlation with the nitrogenase activity.

Index terms: biological nitrogen fixation, nitrogenase activity, assimilation of nitrate, nitrate reductase activity, N₂-fixing bacteria.

INTRODUÇÃO

Um dos grandes problemas de produção de leite das principais bacias leiteiras brasileiras é a oscilação estacional com uma queda na produção muito acentuada no período seco. Por outro lado, o nitrogênio foi indicado como uma das soluções para o aumento de produção animal neste período (Quinn et al. 1961, Henzell 1962). Entretanto, como os fertilizantes nitrogenados oneram os custos da produção, e a demanda de alimentos cresce ano

a ano, tem-se enfatizado a necessidade de maior exploração do potencial da fixação biológica de N₂ atmosférico em gramíneas tropicais. Dados promissores têm sido obtidos com cereais, (Döbereiner & Day 1976, Neyra & Döbereiner 1977, Berkum & Bohlool 1980, Baldani & Döbereiner 1980, Rennie 1980, Nur et al. 1980, Cohen et al. 1980, Kapulnik et al. 1981a, b, Rao 1981, Baldani et al. 1983) e forrageiras (Neves et al. 1976, De-Polli et al. 1977, Smith et al. 1978, Baltensperger et al. 1978, Bouton et al. 1979, Bouton & Zuberer 1979, Taylor 1979, Döbereiner 1980, Boddey et al. 1982, em várias partes do mundo.

O ganho de N através da fixação biológica de N₂, alidada à aplicação ou não de baixos níveis de adubação nitrogenada, deverá ser a saída racional para obter altos rendimentos com custos relativa-

¹ Aceito para publicação em 16 de janeiro de 1985. Parte da tese apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Doutorado em Agronomia.

² Eng. - Agr., Dr., Programa Nacional de Pesquisa em Biologia do Solo-EMBRAPA, km 47, CEP 23460 Seropédica, Rio de Janeiro, RJ.

mente baixos. Entretanto, a avaliação daquele potencial biológico, no campo, implicará estudos das interações entre a assimilação do nitrato e a fixação biológica de N_2 pelas forrageiras, durante os períodos do ano.

Devido à importância dos fatos citados no balanço de N para gramíneas forrageiras tropicais, objetivou-se, com o presente trabalho, estudar a variação estacional das atividades da redutase de nitrato e nitrogenase, bem como o número de bactérias fixadoras de N_2 localizadas no solo, no interior e exterior das raízes, além de N acumulado na parte aérea das plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em campo, em solo Podzólico Vermelho-Amarelo série Itaguaí, localizado próximo ao Setor de Solos da EMBRAPA, RJ. A análise química revelou a seguinte composição (camada superficial de 20 cm): N, 0,09%; P, 2 ppm; K, 72 ppm; Ca + Mg, 2,7 meq/100 cm^3 ; Al^{+++} , 0,1 meq/100 cm^3 ; pH 5,7. Determinou-se a curva de neutralização do solo e fez-se calagem com 2 t/ha de calcário dolomítico (CaO 29,22%; MgO 16,37%), para elevar o pH de 5,7 para 6,7.

Fez-se uma adubação básica em toda a área experimental, compreendendo: 100 kg/ha de P_2O_5 (metade na forma solúvel e metade na forma de fosfato de rocha); 50 kg/ha de K_2O e 40 kg de F.T.E. Br-12. O calcário e a adubação básica foram misturados uniformemente com o solo, com grade de discos, em agosto e setembro de 1979, respectivamente. Foram usadas as seguintes gramíneas: jaraguá (*Hyparrhenia rufa* cv. Deodoro), pangola (*Digitaria decumbens* cv. Taiwan A-21), transvala (*Digitaria decumbens* cv. Transvala UF 547), napier (*Pennisetum purpureum* cv. Napier) e cameron (*Pennisetum purpureum* cv. Napier).

As cultivares introduzidas, 'Transvala' e 'Cameron', têm demonstrado, em experimentos de campo, aumentos marcantes de proteína/ha, durante o período seco, quando comparadas com suas respectivas festemunhas (pangola e napier), normalmente exploradas em pastagens brasileiras (Souto 1978). O jaraguá entrou como controle, pois domina toda a área onde foi realizado o experimento.

O esquema experimental foi de blocos ao acaso, com quatro repetições, cinco cultivares e três níveis de N, obtendo-se, assim, quinze tratamentos. A área bruta de cada parcela mediu 20 m^2 (4 m x 5 m).

As mudas com raízes, no caso do jaraguá, pangola e transvala, e as estacas com três gemas, no caso do napier e cameron, foram plantadas em outubro de 1979, de maneira que o estande por parcela contivesse o mesmo número de plantas.

A adubação com N foi feita em cobertura com $Ca(NO_3)_2$ (27% N). Os três níveis de N foram: 0,25 kg/ha e 50 kg/ha. A aplicação foi efetuada imediatamente após os cortes de avaliação da produtividade das forrageiras nos dias 15.10.80, 15.01.81, 15.04.81 e 15.07.81.

Apesar da declividade mínima da área experimental, tomou-se todo cuidado para evitar que houvesse a lixiviação do nitrato para as parcelas dos blocos situados na parte mais baixa do terreno. Para isso, foram feitos sulcos (50 cm largura x 30 cm de profundidade) entre os blocos subsequentes.

As avaliações das atividades da redutase de nitrato e nitrogenase foram feitas com intervalos de quinze dias, a partir de 30.10.80 até 15.10.81. Neste mesmo período, porém com intervalos de 30 dias, foi avaliado o número de bactérias fixadoras de N_2 .

Em cada coleta, todos os parâmetros medidos, exceto a produtividade das forrageiras, foram feitos na mesma amostra. As colheitas foram feitas em dois blocos de cada vez, alternando sistematicamente com os outros dois, nas coletas subsequentes.

Atividade da redutase de nitrato

No preparo das amostras para a avaliação da atividade da redutase de nitrato, todas as folhas foram destacadas da planta no campo e colocadas em gelo até a determinação no laboratório. As amostras foram tomadas no campo, duas repetições para cada tratamento, sempre as 9 horas e com intervalos de quinze dias, a partir de 30.10.80 até 15.10.81. As condições climáticas nos dias das coletas são mostradas na Fig. 1A.

A atividade da redutase de nitrato foi determinada pelo método usado por Klepper et al. (1971) e Neyra & Hageman (1978). Folhas foram cortadas tipo couve, em pedaços pequenos, e estes foram pesados (200 mg) e colocados em 5 ml do meio de incubação contendo: K_2HPO_4 0,1 M (pH 7,5); NO_3^- 0,1M; 0,05% neutronix, 1% propanol. O meio com as folhas foi incubado a 30°C, durante uma hora, em câmara escura. Foram feitas determinações da redutase de nitrato na presença (potencial) e ausência (real) de NO_3^- no meio de incubação.

Determinaram-se as atividades da redutase de nitrato, $-NO_3$ e $+NO_3$, pela quantidade de NO_2^- presente em alíquotas de 0,2 ml, tomadas no tempo zero e no final de incubação, quando colocadas em 2 ml da solução de 1:1 (v/v) de 0,02% n-1 naftil-etilenodiamina e 1% de sulfanilamida em 1,5 M HCl. Completou-se o volume para 4 ml com água destilada e, após 15 minutos, determinou-se a absorbância a 540 nm.

Atividade da nitrogenase

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método proposto por Souto (1982). Plantas inteiras foram retiradas do campo e imediatamente tiveram seu sistema radicular mergulhado em um balde com água deionizada. Logo após, retirou-se uma amostra do sistema radicular com 10 cm da parte aérea. As amostras foram colocadas

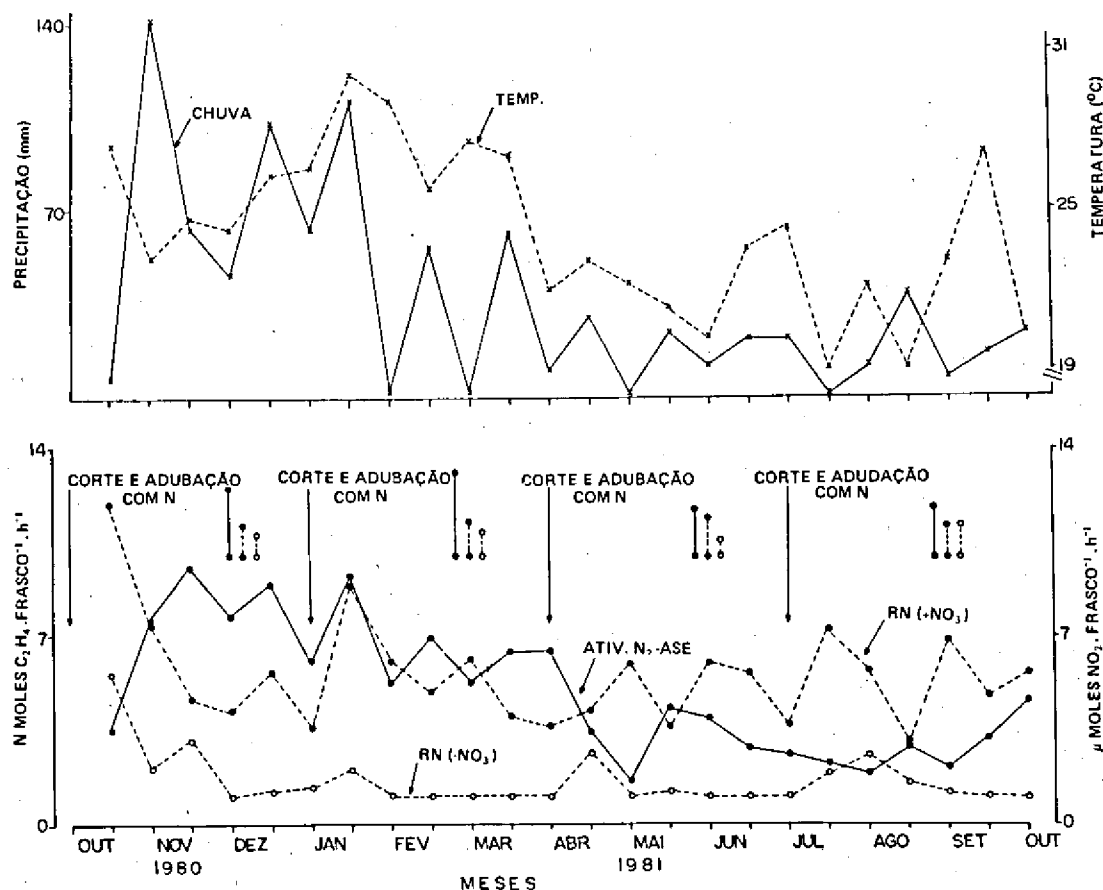


FIG. 1. A Efeito da época de coleta das forrageiras na atividade da nitrogenase (O—O) em raízes extraídas nas atividades da RN (-NO₃) (O—O) e RN (+NO₃) (●—●). Cada ponto é média de 30 parcelas (cinco espécies de planta x 3N x duas repetições) transformado em $\sqrt{n+1}$. As barras verticais no intervalo entre cortes, representam os valores do teste Tukey no nível $p < 0,05$, para as coletas naquele intervalo.
 B Variação da precipitação (X—X), nos intervalos das coletas, e temperatura média (X—X), no dia da coleta, medidas durante o período experimental (15.10.80 a 15.10.81).

em frascos de 3 l também com água deionizada. Em seguida, no laboratório, a água do frasco foi trocada por N₂ contendo 0,25% de O₂, e os frascos fechados hermeticamente com 'suba-seals'. Injetaram-se 12% (v/v) de acetileno e 3% (v/v) de O₂, e fez-se a incubação numa sala com temperatura controlada em 32°C. Com 6 e 8 horas, a partir do tempo de injeção do acetileno, determinou-se a quantidade de etileno produzida.

O etileno produzido foi avaliado injetando-se 0,5 ml da mistura de gases num cromatógrafo de gás Perkin-Elmer (F-11) com detector de ionização de chama de hidrogênio, equipado com coluna Poropak N (100-120 mesh), de 50 cm de comprimento por 0,32 cm de diâmetro. A coluna foi operada isotermicamente a

40°C, tendo o nitrogênio como gás de arraste, ao fluxo de 30 ml/min. Os tempos de retenção foram, aproximadamente, de 24 e 32 segundos para o etileno e acetileno, respectivamente. O padrão de etileno a 110 vpm balanceado com N₂ (mistura especial de White Martins) foi usado para calibrar os instrumentos, durante todo o período experimental. Com cada série de amostras foram analisadas testemunhas contendo 12% de acetileno em ar num vidro vazio, para avaliar a impureza do etileno presente no acetileno usado.

Número de bactérias fixadoras de N₂

Este parâmetro foi obtido mensalmente a partir de 15.11.80 até 15.10.81, em três tipos de amostras diferen-

tes: a do solo entre as plantas, a da raiz não esterilizada e a da raiz esterilizada com cloramina T 1% durante 15 minutos. O tempo de esterilização foi predeterminado em ensaio preliminar como o tempo máximo, após o qual ainda se observou crescimento de bactérias fixadoras de N_2 , quando as raízes foram colocadas em meio de cultura.

Por ocasião da coleta de amostras de plantas no campo para as medições das atividades de redutase de nitrato e nitrogenase, desta mesma amostra, separavam-se duas subamostras com raízes e uma amostra de solo que era retirada entre as plantas, para que fosse determinado o número de bactérias fixadoras de N_2 .

No laboratório, a amostra de raízes esterilizadas seguiu o seguinte esquema: raízes provenientes do campo foram lavadas com água esterilizada, em seguida mergulhadas num frasco contendo solução tampão fosfato (pH = 7,5) durante 5 minutos, depois lavadas com água esterilizada durante 5 minutos, para serem mergulhadas numa solução de 1% de cloramina T durante 15 minutos. Neste caso, houve a preocupação de que a parte cortada das raízes não ficasse em contato com a solução de cloramina. Para isto, mantiveram-se as extremidades cortadas da raiz para cima, só mergulhando o restante da raiz. Finalmente, houve duas lavagens consecutivas das raízes em frascos com água esterilizada, durante 5 minutos cada lavagem.

As amostras de raízes não esterilizadas foram lavadas com água. Porções de raízes (10 g) foram cortadas em pedaços pequenos e macerados em sol. 4% de sacarose previamente esterilizada, completando-se o volume para 100 ml com a mesma solução de sacarose. Amostras (10 g) do solo foram homogenizados em solução de sacarose (4%) e completado também o mesmo volume final. Alíquotas de 1 ml dessa solução foram diluídas consecutivamente em tubos contendo 9 ml de sol. 4% de sacarose, até a concentração de 10^{-8} células/g solo ou raiz fresca. De cada tubo de diluição, alíquotas de 0,1 ml foram transferidas para três frascos de 10 ml cada contendo 5 ml de meio NFB semi-sólido modificado (Baldani & Döbereiner 1981).

Este meio teve a seguinte composição para 1.000 ml: 5 g de ac. málico; 0,5 g K_2HPO_4 ; 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g NaCl; 0,2 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 2 ml sol. de micronutrientes; 2 ml sol. 0,5% de azul de bromotimol em sol. 0,2 N de KOH; 4 ml Fe EDTA (1,64%); 1 ml sol. de vitaminas; 4 g KOH; 1,75 g ágar. A solução de micronutrientes continha em 200 ml: 0,2 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 0,235 g $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,28 g H_3BO_3 ; 0,008 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 0,024 g $ZnSO_4$. A solução de vitaminas continha em 100 ml: 10 mg biotina; 20 mg piridoxina. No final, cada frasco (10 ml = com meio NFB continha duas fontes de C, ou seja, 5 g/l de malato e 0,8 g/l de sacarose, esta última oriunda da solução de sacarose usada nas diluições).

Os frascos foram colocados para incubar durante oito dias em uma sala com temperatura controlada a $32^\circ C$. Durante este período, os frascos onde havia crescimento de bactérias fixadoras de N_2 , foram fechados com 'suba-seals' e foram injetados 12% de acetileno. Após incuba-

ção por uma hora a $32^\circ C$, o etileno produzido foi medido, como descrito anteriormente.

Uma película esbranquiçada e densa na superfície do frasco foi considerada indicação da presença dominante de *Azospirillum brasiliense* e (ou) *A. lipoferum*. Entretanto, apareceram também outras bactérias que formaram uma película menos densa e localizada no meio do frasco, que também produziu etileno. Esta bactéria foi, recentemente, identificada como *Azospirillum amazonense* sp. nov. (Magalhães et al. 1983). Contudo, em ambos os casos, as diluições só foram consideradas positivas quando os valores de etileno produzidos foram cinco vezes maiores do que os encontrados no controle (frasco só com 12% de acetileno). As contagens do número de bactérias foram feitas pelo método do número mais provável (N.M.P.) e para isso usou-se a tabela de MacCrady.

Produtividade de gramíneas forrageiras

Este parâmetro foi avaliado durante um ano, com intervalos de três meses, a partir de 15.10.80 (corte de uniformização).

As plantas da área útil ($6 m^2$) de cada parcela foram cortadas, aproximadamente, a 5 cm do solo, e pesadas, retirando uma amostra para determinação de matéria seca e da percentagem de nitrogênio. O material foi secado em estufa a $65^\circ C$ e, posteriormente, pesado, determinando-se o nitrogênio pelo método semimicro de Kjeldahl.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito da época de coleta das forrageiras nas atividades de nitrogenase e da redutase de nitrato, é mostrado na Fig. 1.

No período de abril a setembro, época de pouca incidência de chuva e de temperaturas mais baixas (Fig. 1A), observa-se que as atividades da nitrogenase foram menores (Fig. 1B). Estas condições climáticas também foram desfavoráveis para o crescimento das plantas. Resultados similares foram encontrados com *Pennisetum purpureum* (Neves et al. 1976) e *Brachiaria* spp. (Pereira et al. 1981b). As temperaturas do solo abaixo $25^\circ C$ foram consideradas o fator limitante mais importante para a expressão da atividade da nitrogenase, em raízes extraídas de *Digitaria decumbens* cv. Transvala (Abrantes et al. 1976).

No presente experimento, as temperaturas médias do ar, nos dias das coletas (Fig. 1A), após o mês de abril, não excederam $25^\circ C$. De maneira geral, as atividades da nitrogenase as acompanharam durante o ano. Isto parece contrariar os re-

sultados encontrados por Weier et al. (1981), que mostraram que a atividade da nitrogenase foi negativamente correlacionada ($r = 0,78^*$) com a temperatura do solo na faixa de 14-30°C. Vlassak et al. (1973), que mediram periodicamente a fixação, de N₂ no campo, durante a estação de crescimento, também não acharam relação entre atividade da nitrogenase e temperatura. Como estas observações não coincidem com a resposta de microorganismos conhecidos a temperaturas, provavelmente, a correlação deve-se a efeitos indiretos através de umidade do solo. Confirmação disto, é o atual experimento no qual encontrou-se uma correlação altamente significativa ($r = 0,76^{**}$) entre a precipitação e a atividade da nitrogenase, independentemente da época de coleta, do genótipo da planta e dos níveis de nitrogênio aplicados.

Correlação semelhante foi obtida com a umidade do solo (Vlassak et al. 1973, Day et al. 1975a, Weier et al. 1981). Estes autores explicaram a dependência da atividade da nitrogenase da umidade, pela sensibilidade ao excesso de O₂ (Schollhorn & Burris 1967), já que a difusão de O₂ na água é 80 vezes menor do que no meio gasoso (Greenwood 1968). Os resultados dos efeitos da precipitação na atividade da nitrogenase podem ser aproveitados no manejo da irrigação; também deveriam ser observados na escolha da época adequada para a amostragem, em outros experimentos que visem estudar a fixação de N₂ de gramíneas forrageiras.

Os resultados mostrados na Fig. 1 A e B sugerem, ainda, que, em experimentos de campo, os efeitos da aplicação do nitrato nas atividades da nitrogenase e da redutase de nitrato (Fig. 1B) têm de ser discutidos à luz da precipitação (Fig. 1A) que ocorre após aplicação da adubação nitrogenada. Assim, na primeira coleta após aplicação do nitrato, a atividade da nitrogenase sempre foi alta e a da redutase de nitrato baixa, quando choveu no intervalo, e vice-versa, independentemente dos níveis de N aplicados e dos genótipos das plantas estudadas. Berkum (1978) estudou os efeitos da aplicação, no campo, de 40 kg/ha de NNO₃ em *Paspalum notatum*, sobre as atividades da nitrogenase e redutase de nitrato. Concluiu que a atividade da nitrogenase é imediatamente reduzida pela aplicação de N, enquanto que foram observadas as

mais altas taxas na atividade da redutase de nitrato, indicando que aumentou o NO₃⁻ no pool metabólico. A recuperação da atividade da nitrogenase, provavelmente, foi devida à lixiviação do nitrato pela chuva (Eira et al. 1968) ou denitrificação, já que algumas estirpes de *Azospirillum* denitrificam além de fixarem N₂ em meio de cultura.

O efeito do genótipo da planta na variação estacional das atividades da nitrogenase e da redutase de nitrato é apresentado nas Tabelas 1 e 2.

De modo geral, as taxas de atividade da nitrogenase foram maiores nos períodos de maior crescimento da planta do que nos períodos de inverno (Tabela 1).

A metodologia usada para avaliar a atividade da nitrogenase, através de raízes extraídas, é sujeita a críticas (Barber et al. 1978, Okon et al. 1977, Berkum 1977). Entretanto, em ensaios paralelos (Souto 1982), foram observadas correlações altamente significativas entre os valores obtidos por este método e os medidos com sistema intacto solo-planta, indicando um valor pelo menos relativo daquele método. Este valor relativo, entretanto, não se aplica na comparação de cultivares, já que os coeficientes de correlação se diferenciaram, sendo perto de um no jaraguá, mas muito mais baixo nas demais gramíneas (pangola, transvala, napier e cameron) (Souto 1982). Isto indica, de um lado, que, nestas gramíneas, as medidas com raízes extraídas subestimam os valores reais, e de outro, que no jaraguá deve estar operando um tipo de associação distinta das demais gramíneas. A possibilidade de diferentes gramíneas terem sido colhidas com diferentes pesos radiculares por frasco foi excluída, já que pesagens de várias amostras mostraram que não diferiam significativamente entre si. Assim, os valores na Tabela 1 precisam ser vistos com restrição. Mesmo assim foram apresentados, visto que o problema acima ainda aumenta a diferença entre o Jaraguá e as demais gramíneas.

A cultivar Cameron mostrou maior atividade da nitrogenase nos dois primeiros períodos de crescimento (out/80 - abr/81). Nenhuma diferença entre genótipos foi observada no terceiro período (abr/81 - jul/81). A cultivar Transvala foi a que apresentou maior atividade de nitrogenase no último período (jul/81 - out/81). Estas

TABELA 1. Efeito do genótipo da planta na atividade da nitrogenase em raízes extraídas, durante quatro períodos do ano.

Gramíneas	nmoles C ₂ H ₄ . frasco ⁻¹ . h ⁻¹ (*)			
	1.º período (15.10.80 - 15.01.81)	2.º período (15.01.81 - 15.04.81)	3.º período (15.04.81 - 15.07.81)	4.º período (15.07.81 - 15.10.81)
Jaraguá	5,50 b	4,30 b	2,80 a	3,20 ab
Pangola	6,90 ab	5,60 b	3,00 a	2,70 b
Transvala	7,80 ab	7,20 ab	3,30 a	4,20 a
Napier	6,70 a	8,00 ab	3,40 a	2,10 b
Cameron	8,90 a	8,50 a	2,90 a	2,20 b

* Atividade da nitrogenase em raízes extraídas.

Os dados são médias de 36 parcelas (seis colheitas x 3N x duas repetições) e transformados em $\sqrt{n+1}$. As médias nas colunas verticais com mesma letra não diferenciaram estatisticamente, segundo o teste Tukey ao nível $p < 0,05$.

TABELA 2. Efeito do genótipo da planta na atividade da RN (+ NO₃) em folhas de gramíneas forrageiras, durante quatro períodos do ano.

Gramíneas	μmoles NO ₂ . frasco ⁻¹ . h ⁻¹ *			
	1.º período (15.10.80 - 15.01.81)	2.º período (15.01.81 - 15.04.81)	3.º período (15.04.81 - 15.07.81)	4.º período (15.07.81 - 15.10.81)
Jaraguá	5,70 b	5,80 ab	3,70 b	6,60 a
Pangola	7,30 a	6,00 ab	6,00 a	6,70 a
Transvala	6,20 b	5,00 b	4,90 ab	5,70 b
Napier	6,70 ab	6,10 a	5,80 a	5,50 b
Cameron	5,30 c	5,10 ab	3,90 b	3,20 c

* Atividade da RN (+ NO₃) nas folhas.

Os dados são médias de 36 parcelas (seis colheitas x 3N x duas repetições) e transformados em $\sqrt{n+1}$. As médias nas colunas verticais com mesma letra não diferenciaram estatisticamente, segundo o teste Tukey ao nível $p < 0,05$.

diferenças entre as atividades da nitrogenase das forrageiras, durante os períodos mais críticos do ano, já tinham sido encontradas entre genótipos de *Brachiaria* spp. (Pereira et al. 1981b). O efeito do genótipo da planta na atividade da redutase de nitrato, que mede o potencial da enzima, também dependeu do período do ano (Tabela 2). As cultivares Pangola, Napier e Jaraguá, dependendo do período do ano, apresentaram as maiores taxas de atividade da redutase de nitrato. A cv. Cameron, independentemente do período do ano, apresentou a menor taxa de atividade da redutase de nitrato. Estas diferenças entre genótipos nas

atividades da redutase de nitrato foram observadas também em *Brachiaria* spp. (Pereira et al. 1981b).

As variações encontradas nas taxas de atividade da redutase de nitrato dos genótipos de plantas sugerem que principalmente as cultivares Pangola e Napier têm maior potencial de respostas ao nitrato aplicado durante o período mais crítico de crescimento das forrageiras.

O efeito da adubação nitrogenada nas atividades da nitrogenase e da redutase de nitrato, em quatro períodos do ano, é mostrado na Fig. 2.

A adubação nitrogenada aplicada no início de cada um dos quatro períodos mostrou efeito nega-

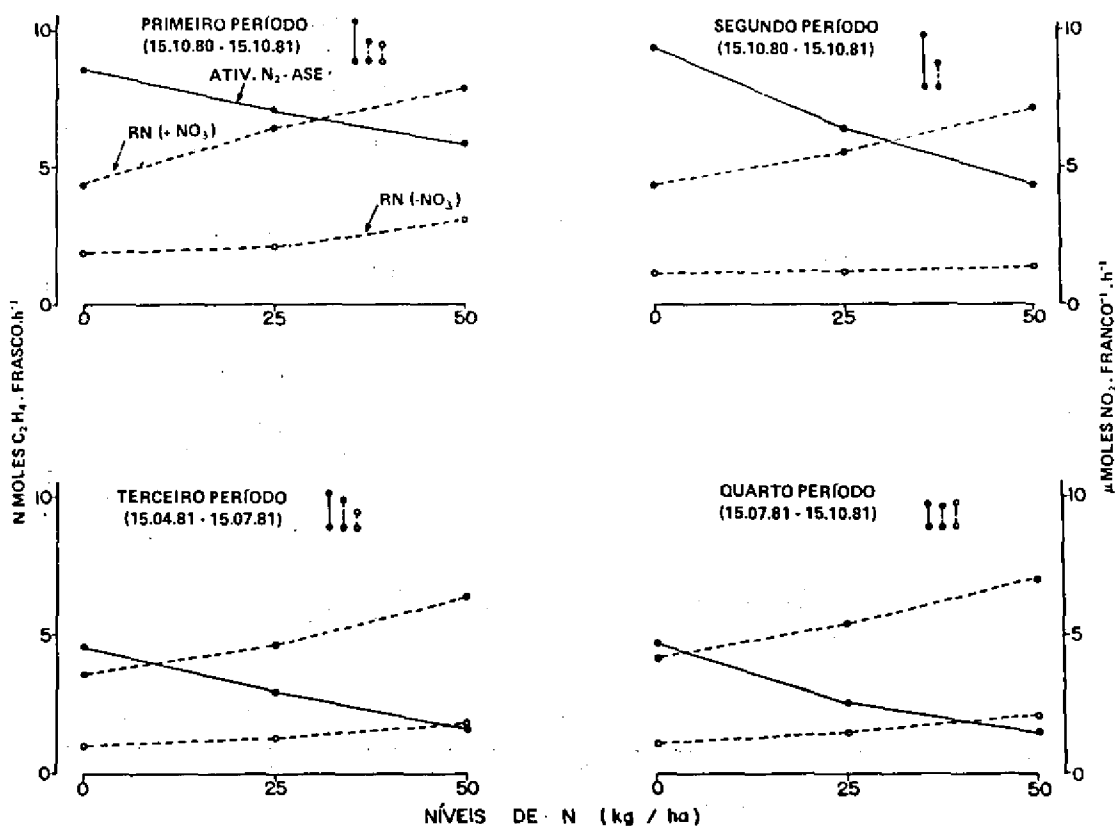


FIG. 2. Efeito da adubação nitrogenada na atividade da nitrogenase (0—0) em raízes extraídas e nas atividades da RN (-NO₃) (○—○) e RN (+NO₃) (●—●) nas folhas, em quatro períodos experimentais. As plantas foram cortadas e adubadas com N no início de cada período. Cada dado é média de 60 parcelas (cinco espécies planta x seis colheitas x duas repetições) transformado em $\sqrt{n + 1}$. Não foram observadas diferenças significativas entre os coeficientes de regressão pelo teste 't' ao nível $p < 0,05$, quando se compararam os valores "b" entre os quatro períodos experimentais para cada parâmetro (atividade da nitrogenase e RN (+NO₃)) estudado. As barras verticais representam os valores do teste Tukey ao nível $p < 0,05$.

tivo na atividade da nitrogenase, e positivo na redução de nitrato, e que não houve diferença significativa entre os valores 'b' das regressões obtidas nos diferentes períodos (Fig. 2). Efeitos negativos da adubação nitrogenada sobre a atividade da nitrogenase já foram demonstrados em cereais (Pereira et al. 1978, Baldani et al. 1979), mas baixos níveis de N tiveram pouco efeito ou até aumentaram a atividade da nitrogenase (Kapulnik et al. 1981a, b). A eliminação quase completa da atividade da nitrogenase, na época crítica, terceiro (abr/81 - jul/81) e quarto (jul/81 - out/81) período, pela dose mais alta de N, agrava ainda mais o problema. O efeito do nitrato na atividade da ni-

trogenase foi atribuído à acumulação transitória de nitrato no sítio onde se encontra a bactéria responsável pela fixação de N₂ (Döbereiner & Boddey 1980, Pereira et al. 1981a).

Os efeitos das épocas de coletas e da adubação nitrogenada na atividade da redução de nitrato, no primeiro (out/80 - jan/81) e no segundo (jan/81 - abr/81) período, são apresentados na Fig. 3. As diferenças significativas entre os coeficientes de regressão lineares pelo teste 't' mostraram que, no primeiro período, as coletas de duas e quatro semanas apresentaram aumentos de atividade da redução de nitrato com a adubação, maiores que as demais. No segundo período, estes efeitos so-

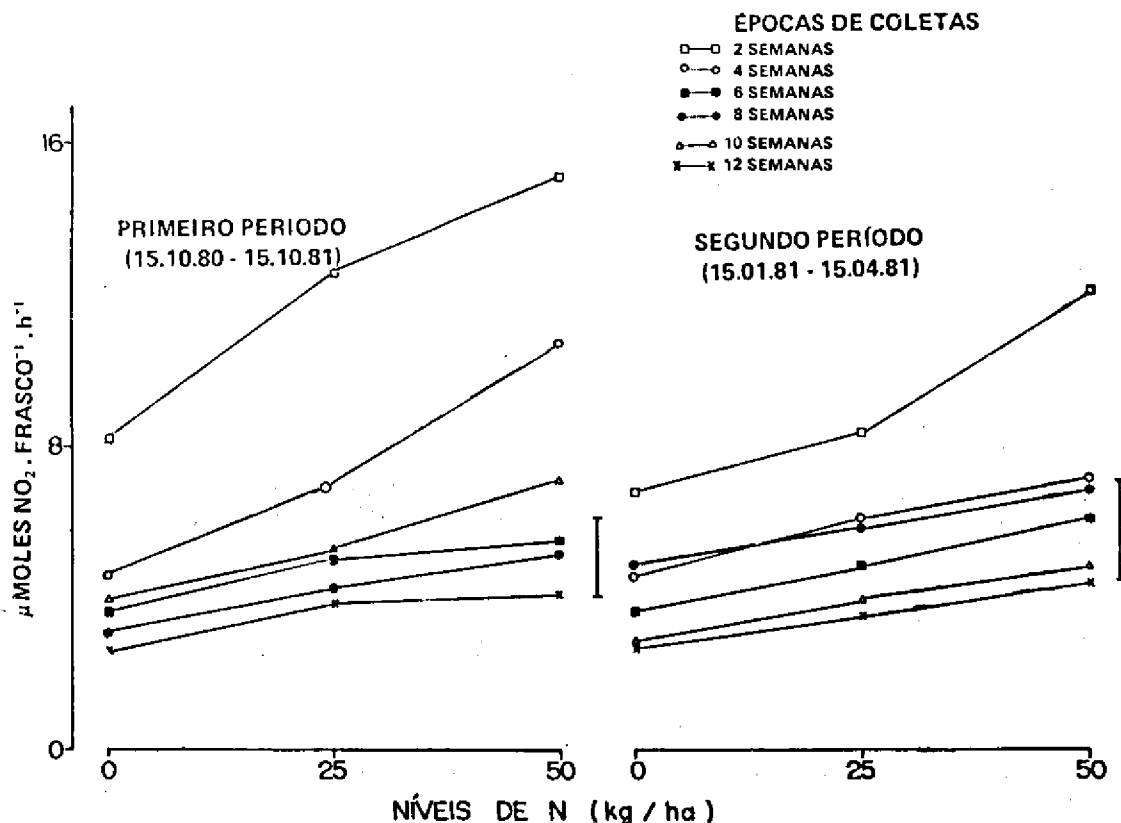


FIG. 3. Efeito das épocas de coleta e adubação nitrogenada nas atividades da RN (+ NO₃) e RN (+ NO₃), no primeiro e segundo período, respectivamente. As plantas foram cortadas e adubadas com N no início de cada período. Atividades da redutase de nitrato (+ NO₃) de cada coleta: duas semanas (□—□), quatro semanas (○—○), seis semanas (■—■), oito semanas (●—●), dez semanas (▲—▲), doze semanas (X—X). Cada dado é média de dez parcelas (cinco espécies planta x duas repetições) transformado em $\sqrt{n+1}$. As barras verticais representam os valores do teste Tukey ao nível $p < 0,05$. As diferenças entre os coeficientes de regressão "b" pelo teste 't', ao nível $p < 0,05$, mostraram que, no primeiro período, as coletas de duas e quatro semanas foram maiores que as demais, e no segundo período, a de duas semanas maior que as demais coletas.

mente se revelaram com duas semanas. Estes resultados indicam que o efeito da adubação nitrogenada, durante os períodos de maior crescimento, só se observa, no máximo, até quatro semanas após a aplicação de nitrato. As precipitações que caíram no primeiro e segundo período (Fig. 1) foram as maiores durante todo o ano experimental. Com isto, a lixiviação rápida do nitrato pela chuva (Eira et al. 1968), a remoção do nitrato reduzido e incorporado à planta e, possivelmente, a denitrificação com aumento da umidade do solo explicam o efeito transitório do nitrato na atividade da redutase de nitrato, como também foi constatado

em condições de campo com *Paspalum notatum* (Berkum 1978).

O efeito do genótipo da planta e das épocas de coleta, no número de bactérias fixadoras de N₂ nas raízes, é mostrado na Tabela 3 e Fig. 4.

O jaraguá foi o genótipo que mostrou maior número total de bactérias fixadoras de N₂ em todos os períodos do ano, sendo que, no último período (jul/81 - out/81), os números nas demais cultivares tenderam a se igualar aos da cv. Jaraguá (Tabela 3). Isto não colabora com explicação pela menor atividade da nitrogenase encontrada nesta cultivar. O comportamento diferente do jaraguá,

TABELA 3. Efeito do genótipo da planta no M. de bactérias fixadoras de N₂, no interior e exterior das raízes de gramíneas forrageiras.

Gramíneas	Log n. bactérias. g raiz fresca ⁻¹ *			
	1º período (15.10.80 - 15.01.81)	2º período (15.01.81 - 15.04.81)	3º período (15.04.81 - 15.07.81)	4º período (15.07.81 - 15.10.81)
Jaraguá	6,40 a	5,40 a	4,80 a	4,00 a
Pangola	4,30 b	3,80 b	3,70 b	4,10 a
Transvala	4,30 b	4,20 b	3,80 b	4,00 a
Napier	4,80 b	3,60 b	4,10 b	3,90 a
Cameron	4,90 b	4,00 b	3,80 b	4,30 a

* Os dados são médias de 36 parcelas (três colheitas x 3N x dois tratamentos na raiz x dois repetições) e transformados em log n. As médias nas colunas verticais com mesma letra não diferenciaram estatisticamente, segundo o teste Tukey ao nível p < 0,05.

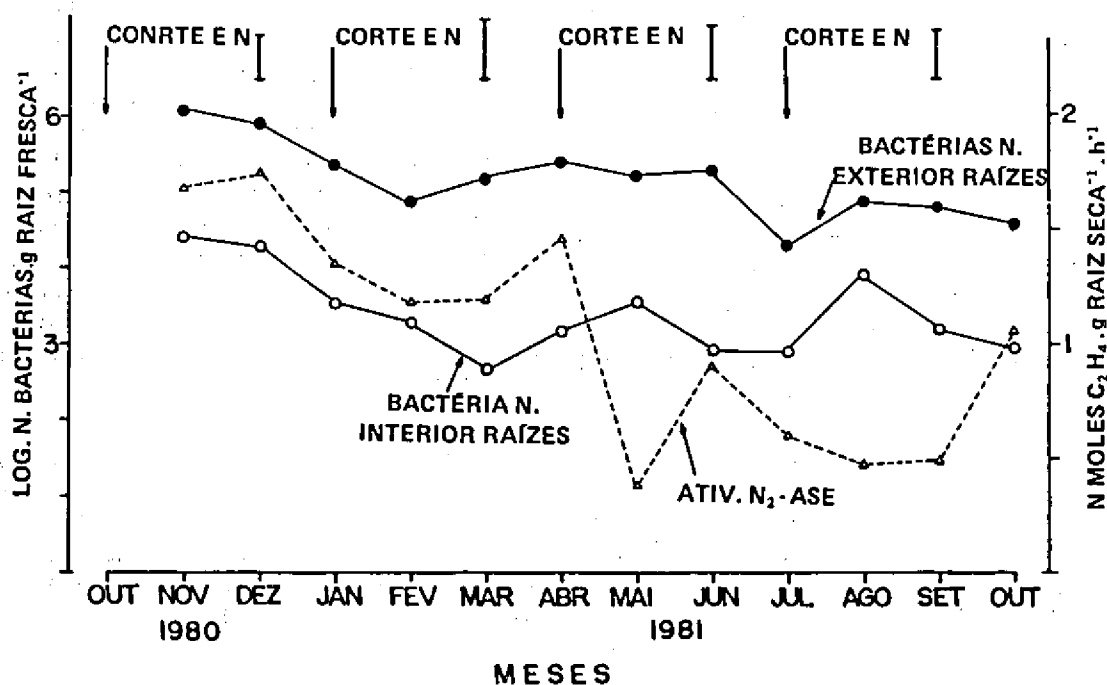


FIG. 4. Efeito da época de coleta no n. de bactérias fixadoras de N₂ e na atividade de nitrogenase em raízes. Antes de cada corte e adubação com N (vide setas) foram coletadas raízes das plantas, para contagem das bactérias e atividade da nitrogenase. Bactérias do interior (0—0) das raízes foram obtidas tratando as raízes com cloramina T (1%) durante 15'. O n. de bactérias localizadas no exterior (●—●) das raízes foi obtido por subtração do n. de bactérias de raízes não esterilizadas das esterilizadas. As barras verticais nos intervalos entre cortes representam os valores do teste Tukey, ao nível p < 0,05. Cada dado é média de 30 amostras (cinco espécies planta x 3N x duas repetições). (Δ—Δ). Atividade da nitrogenase. Cada valor também é média de 30 repetições e transformado em $\sqrt{n+1}$.

nos ensaios sobre a metodologia (Souto 1982), indica-o como um sistema diferente, talvez com localização das bactérias ou mesmo espécies de bactérias diferentes.

O efeito das épocas de coleta no número de bactérias fixadoras de N_2 é mostrado na Fig. 4. O número de bactérias no exterior (raiz lavada) das raízes foi muito maior do que o encontrado no interior (raiz lavada e esterilizada superficialmente). A correlação significativa obtida durante a estação de crescimento das plantas, primeiro (out/80 - jan/81) e segundo (jan/81 - abr/81) período, entre o número de bactérias localizadas internamente nas raízes e a atividade da nitrogenase de algumas plantas (cameron $r = 0,66^{**}$; pangola $r = 0,45^{**}$ e transvala $r = 0,41^*$), sugere que estas bactérias são as principais responsáveis pela fixação de N_2 nas raízes dessas gramíneas. Nenhuma correlação foi achada no jaraguá e napier. O número de bactérias do interior e exterior, bem como durante o período de menor crescimento das forrageiras, também não mostrou correlação com a atividade da nitrogenase.

A infecção do cilindro central do milho, mostrado através da redução de tetrazolium por bactérias diazotróficas, é máxima durante o estágio reprodutivo da planta (Magalhães et al. 1979), quando a atividade da nitrogenase é também mais alta (Pereira et al. 1978, Baldani & Döbereiner 1981). Mais recentemente, Baldani et al. (1983) mostraram, em trigo, correlação ($r = 0,92^{**}$) entre o número de *Azospirillum* localizado internamente nas raízes e N total das plantas, aos 65 dias de idade, época em que se tem observado maior expressão da atividade da nitrogenase nesta cultura.

A maior eficiência das bactérias localizadas no interior das raízes, principalmente no xilema e protoxilema, pode ligar-se à disponibilidade direta de fontes de carbono, pelo qual não competem tantos outros microrganismos como no solo (Döbereiner & De-Polli 1981), e talvez ao fornecimento de N_2 fixado diretamente à planta, como na simbiose das leguminosas. Nas forrageiras cuja época de reprodução acontece no período seco do ano, isto não parece ocorrer, já que tanto o número de bactérias diazotróficas como a atividade da Nitrogenase decresceram (Fig. 4), como já havia

sido observado por Day et al. (1975b), em *Pennisetum* e *Digitaria*.

A interação genótipo da planta e épocas de coleta na população diazotrófica nas raízes foi observada no primeiro (out/80 - jan/81) da estação de crescimento (Fig. 5). As diferenças entre os coeficientes de regressão lineares pelo teste 't', ao nível $p = 0,05$, mostraram que em pangola e cameron houve redução da população de diazotróficos, enquanto que, nas demais gramíneas, os números não foram alterados. Note-se que o jaraguá, neste período (primeiro), além de não apresentar decréscimo do número de bactérias com a idade da planta, exibiu o maior número de bactérias fixadoras de N_2 , em todas as coletas, como já foi mostrado.

Os resultados conjuntos de todas as gramíneas, relativos ao número de bactérias diazotróficas no solo, em raízes lavadas e em raízes esterilizadas, são vistas na Tabela 4. Não houve interação cultivares x localização das bactérias; portanto, o efeito da esterilização das raízes foi resumido no conjunto das cultivares. O número de bactérias no solo foi baixo ($10^3 - 10^4$), mas aumentou muito nas raízes ($10^5 - 10^6$). O número de bactérias internas, entretanto, não ultrapassou 10% do número total nas raízes, independentemente das coletas feitas durante o período experimental, como já discutido (Fig. 4).

A relação R/S (n. total de bactérias diazotróficas na raiz/n. total de bactérias diazotróficas no solo), que dá uma indicação da multiplicação das bactérias nas raízes (Tabela 4), foi muito alta, com valores até 80 vezes mais altos nas raízes do que no solo, como média das cinco cultivares. Se se calcular o efeito R/S, separado para cada cultivar, o valor R/S máximo obtido foi de 5.000 no jaraguá e 50 no transvala, sendo intermediário nos demais (Souto 1982).

No período de menor crescimento das forrageiras, terceiro período (abr/81 - jul/81), esta relação foi menor do que nos demais períodos, mostrando que o crescimento ativo da planta é necessário para a multiplicação das bactérias fixadoras de N_2 nas raízes.

O efeito do genótipo da planta e sua interação com adubação nitrogenada, no N total de cinco

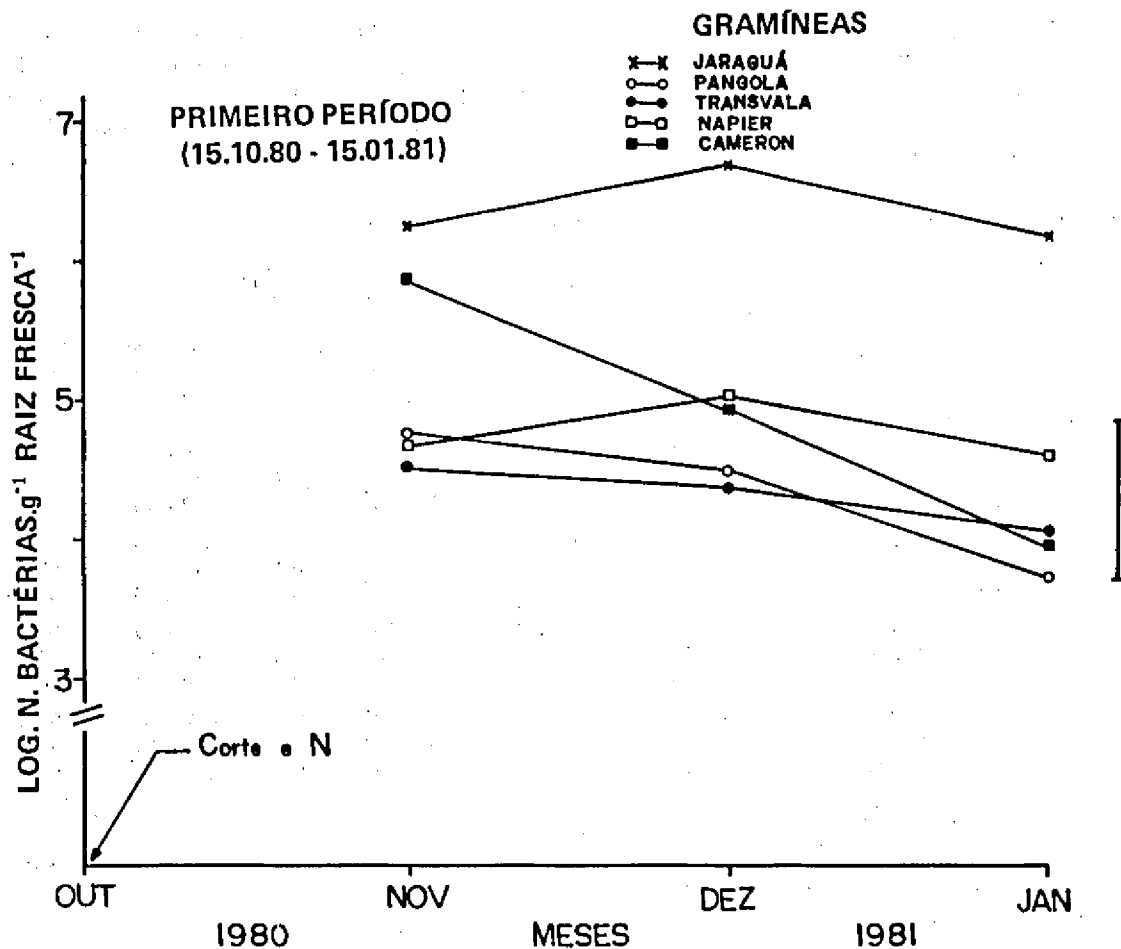


FIG. 5. Efeito do genótipo planta e da época de coleta do primeiro período (15.10.80 - 15.01.81), no n. de bactérias fixadoras de N₂ do interior mais exterior nas raízes de cinco gramíneas forrageiras tropicais, jaraguá (X—X), pangola (O—O), transvala (●—●), napier (□—□) e cameron (■—■). Cada dado é média de doze parcelas (3N x dois tratamentos nas raízes x duas repetições) transformado em log n. A barra vertical representa o valor do teste Tukey, ao nível p < 0,05. As diferenças entre coeficientes de regressão "b" pelo teste 't', ao nível p < 0,05, mostraram que o pangola (-0,1427) não diferenciou do cameron (-0,2302), porém ambos foram maiores que as demais gramíneas, que não foram significativas.

gramíneas forrageiras, são apresentados na Tabela 5 e Fig. 6.

O efeito do genótipo dependeu do período do ano (Tabela 5 e Fig. 5). Assim, no primeiro período (out/80 a jan/81) da estação de crescimento, não se observaram diferenças entre os genótipos, porém, no segundo período (jan/81 - abr/81), o cameron superou as demais cultivares em relação à produtividade medida como N total. No período de menor crescimento, terceiro período (abr/81 -

jul/81), as digitárias pangola e transvala produziram mais N do que as demais gramíneas, ao passo que, no último período, todas tiveram produções similares, exceto jaraguá, que também, nos outros períodos, produziu menos N.

O efeito da interação genótipo e adubação nitrogenada sobre o N total é mostrado na Fig. 6. As diferenças entre os coeficientes de regressão lineares das gramíneas dentro de cada período, pelo teste 't', ao nível p = 0,05, mostraram que

no primeiro e quarto período não houve diferenças entre os genótipos em relação ao acréscimo devido à adubação nitrogenada. Por outro lado, no segundo período o cameron e o transvala responderam mais ao N do que as demais gramíneas, e

no período de menor crescimento das forrageiras (terceiro), o pangola e o transvala foram as cultivares que deram maiores respostas à adubação nitrogenada, confirmando outro estudo (Souto 1977) em que a adubação nitrogenada

TABELA 4. Número de bactérias fixadoras de N₂ no solo e raiz (interior e exterior).

Período*	Mês	N.º bactérias/ g solo fresco	N.º bactérias . g raiz fresca ^{1**}					
			Raiz (total)*	R/S	Raiz (interior) ^x		Raiz (exterior) ^{xx}	
					N.º	% R	N.º	% R
I	nov	2,08 x 10 ⁴	1,06 x 10 ⁶	51,0	2,51 x 10 ⁴	2,4	1,04 x 10 ⁶	97,6
	dez	1,32 x 10 ⁴	0,83 x 10 ⁶	62,8	1,99 x 10 ⁴	2,4	0,81 x 10 ⁶	97,6
	jan	0,79 x 10 ⁴	0,29 x 10 ⁶	37,0	0,35 x 10 ⁴	1,2	0,28 x 10 ⁶	98,8
II	fev	2,63 x 10 ³	0,97 x 10 ⁵	37,0	2,18 x 10 ³	2,2	0,95 x 10 ⁵	97,8
	mar	5,01 x 10 ³	1,48 x 10 ⁵	30,0	0,52 x 10 ²	0,1	1,47 x 10 ⁵	99,9
	abr	3,31 x 10 ³	2,75 x 10 ⁵	83,0	2,63 x 10 ³	0,9	2,72 x 10 ⁵	99,1
III	mai	2,69 x 10 ⁴	1,67 x 10 ⁵	6,2	3,63 x 10 ³	2,2	1,63 x 10 ⁵	97,8
	jun	2,08 x 10 ⁴	1,77 x 10 ⁵	8,7	0,87 x 10 ³	0,5	1,76 x 10 ⁵	99,5
	jul	0,30 x 10 ⁴	0,19 x 10 ⁵	6,3	0,72 x 10 ³	3,9	0,18 x 10 ⁵	96,1
IV	ago	3,02 x 10 ³	0,85 x 10 ⁵	28,0	0,74 x 10 ⁴	8,7	0,77 x 10 ⁵	91,3
	set	2,18 x 10 ³	0,67 x 10 ⁵	31,0	1,58 x 10 ³	2,3	0,66 x 10 ⁵	97,7
	out	0,85 x 10 ³	0,39 x 10 ⁵	46,0	0,83 x 10 ³	2,1	0,38 x 10 ⁵	97,9

* Corte e adubação nitrogenada foram feitos no início de cada período.

** Cada valor para o tratamento solo (S) e raiz é média de 10 (cinco espécies planta x duas repetições) e 30 (cinco espécies planta x 3N x duas repetições) parcelas, respectivamente.

+ Raiz lavada e não esterilizada (= R)

x Raiz lavada e esterilizada com cloramina T (1%) por 15'

xx Raiz (total) - Raiz (interior).

TABELA 5. Efeito do genótipo da planta em N total da rebrota de cinco gramíneas forrageiras.

Gramíneas	N total (kg. ha ⁻¹)*			
	1.º período** (15.10.80 - 15.01.81)	2.º período** (15.01.81 - 15.04.81)	3.º período** (15.04.81 - 15.07.81)	4.º período** (15.07.81 - 15.10.81)
Jaraguá	47,5 a	31,3 b	19,2 b	11,7 b
Pangola	52,9 a	32,8 b	29,5 a	21,4 ab
Transvala	61,7 a	41,3 b	25,4 ab	26,1 a
Napier	48,7 a	39,7 b	15,1 b	28,3 a
Cameron	53,5 a	52,3 a	16,7 b	29,3 a

* Determinação de N total na parte aérea da planta foi feita em amostras secas em estufa a 65°C, pesadas, determinando-se N pelo método semimicro Kjeldahl.

Valores representam médias de doze parcelas (3N x quatro repetições). As médias nas colunas verticais com mesma letra não diferenciaram estatisticamente, segundo o teste Tukey, ao nível p < 0,05.

** Corte e adubação nitrogenada foram feitos no início de cada período.

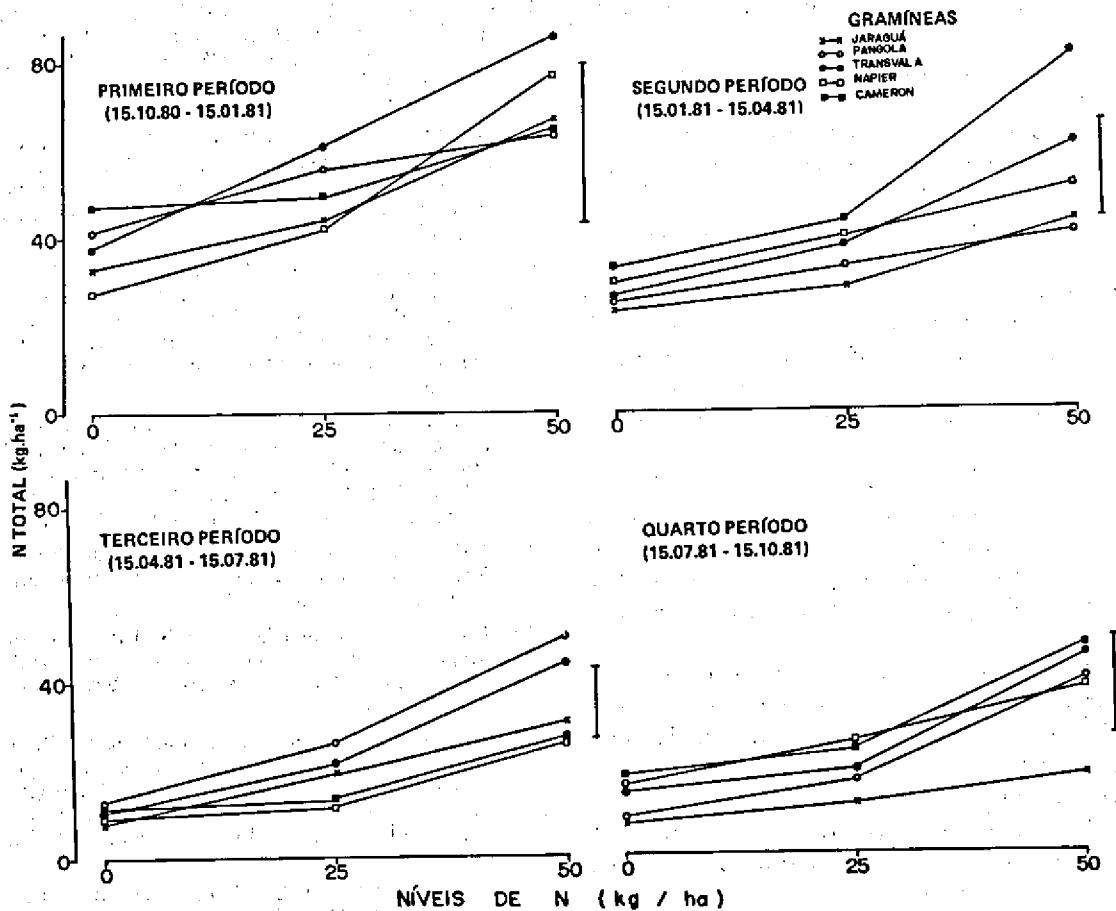


FIG. 6. Efeito do genótipo da planta e da adubação nitrogenada no N total (vide Tabela 5) de cinco gramíneas forrageiras, jaraguá (X—X), pangola (O—O), transvala (●—●), napier (□—□) e cameron (■—■). Adubação nitrogenada e corte de avaliação foram feitos no início de cada período. As diferenças entre os coeficientes de regressão pelo teste 't', ao nível $p < 0,05$, das gramíneas dentro de cada período foram as seguintes: segundo período, cameron = transvala > demais; terceiro período, pangola = transvala > demais; primeiro e quarto período, não foram observadas diferenças significativas entre "b". As barras verticais representam os valores do teste Tukey ao nível $p < 0,05$. Cada ponto é média de quatro repetições.

(100 kg N.ha⁻¹), durante o período seco do ano, proporcionou maior acréscimo da produtividade de proteína do pangola (sete vezes) e transvala (sete vezes) quando comparado aos de *Cynodon nlemfuensis* (quatro vezes) e *Brachiaria brizantha* (0,4 vez). Isto sugere que estas digitárias, com altas respostas à adubação nitrogenada, podem, em alguns casos em que não haja limitação pelo custo do adubo, ser aproveitadas com sucesso nas pastagens, durante o período seco, para produção intensiva de leite e carne.

Houve uma tendência do cameron de produzir

mais N total, quando comparado com as demais forrageiras, nas parcelas sem adubação nitrogenada, dando margem a trabalhos de melhoramento e, talvez, inoculação para obter uma forrageira menos dependente de fertilizantes e com perspectivas de suprir parte de suas exigências com nitrogênio do ar.

CONCLUSÕES

1. A precipitação aumenta a atividade da nitrogenase associada às raízes de gramíneas forrageiras,

principalmente no período de crescimento (chuvoso).

2. Os efeitos da adubação nitrogenada nas atividades da redutase de nitrato e nitrogenase perduraram, no máximo, por quatro semanas após a aplicação da adubação e se manifestaram opostas nas duas atividades.

3. Nos períodos de menor crescimento das plantas, a dose mais elevada de N inibiu a atividade da nitrogenase mais severamente do que durante a estação de crescimento.

4. Em todas as gramíneas se observa um pronunciado efeito da rizosfera que apresenta números muito maiores de bactérias fixadoras de N_2 que o solo.

5. Em todos os genótipos menos de 10% das bactérias fixadoras de N_2 se localizavam na parte interna da raiz e mesmo assim foram só elas que apresentaram correlação significativa com a atividade da nitrogenase no cameron, pangola e transvala.

6. A cv. Jaraguá foi a que apresentou o maior número total de bactérias fixadoras de N_2 , o que não foi acompanhado de alta atividade da nitrogenase e N total da planta, indicando uma associação diferente das demais.

7. O cameron e transvala, de maneira geral, mostram maior atividade da nitrogenase e a maior produção de proteína, durante o período experimental.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, G.T.V.; DAY, J.M.; CRUZ, C.V. & DÖBEREINER, J. Fatores limitantes da fixação de nitrogênio em campo de *Digitaria decumbens* cv. transvala. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 15., Campinas, SP, 1975. Anais . . . s.l., Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1976. p.171-6.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Can. J. Microbiol.*, 29(8):924-9, 1983.
- BALDANI, J.I.; BLAÑA, R.A.G. & DÖBEREINER, J. Efeito do genótipo do milho na atividade da nitrogenase e da nitrato-redutase. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 14(2):165-73, abr. 1979.
- BALDANI, V.L.D. & DÖBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol. Biochem.*, 12:433-40, 1980.
- BALDANI, V.L.D. & DÖBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of maize, wheat and rice with *Azospirillum* spp. In: VOSE, P.B. & RUSCHEL, A.P. Associative N_2 fixation. s.l., CRC Press, 1981. v.1, p.131-6.
- BALTENSPERGER, A.A.; SCHANK, S.C.; SMITH, R.L.; LITTELL, R.C.; BOUTON, J.H. & DUDECK, A.E. Effect of inoculation with *Azospirillum* and *Azotobacter* on turf-type Bermuda genotypes. *Crop Sci.*, 18:1043-5, 1978.
- BARBER, L.E.; TJEPKEMA, J. & EVANS, H.J. Acetylene reduction in the root environmental of some grasses and other plants in Oregon. In: GRANHALL, U., ed. Nitrogen-fixing blue-green algae and symbiotic bacteria. Stockholm, 1978. p.366-72. (*Ecol. Bull.*, 26).
- BERKUM, P. van. Nitrogenase activity associated with tropical grass roots and some effects of combined nitrogen on *Spirillum lipoferum* Beijerinck. s.l., s.ed., 1978. 184p. Tese Doutorado - Filosofia pela Faculdade de Ciências da Universidade de Londres.
- BERKUM, P. van. Relatório para o programa de fixação biológica de nitrogênio; convênio CNPq-EMBRAPA. Rio de Janeiro, UFRJ, 1977.
- BERKUM, P. van & BOHLOOL, B.B. Evaluation of nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses. *Microbiol. Rev.*, 44(3): 491-517, 1980.
- BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R. & MATSUI, E. The ^{15}N isotope dilution technique applied to the estimation of biological nitrogen fixation associated with *Paspalum notatum* cv. Batatais in the field. *Soil Biol. Biochem.*, 15:25-32, 1982.
- BOUTON, J.H.; SMITH, R.L.; SCHANK, S.C. BURTON, G.W.; TYLER, M.E.; LITTELL, R.C.M.; GALLAHER, R.N. & QUESENBERY, K.H. Response of pearl millet inbreds and hybrids to inoculation with *Azospirillum brasiliense*. *Crop Sci.*, 19:12-6, 1979.
- BOUTON, J.H. & ZUBERER, D.A. Response of *Panicum maximum* Jacq. to inoculation with *Azospirillum brasiliense*. *Plant Soil*, 52:585-90, 1979.
- COHEN, E.; OKON, Y.; KIGEL, J.; NUR, I. & HENIS, Y. Increase in dry weight and total nitrogen in *Zea mays* and *Setaria italica* associated with nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. *Plant Physiol.*, 66:746-9, 1980.
- DAY, J.M.; HARRIS, D.; DART, P.J. & BERKUM, P. van. The broadbalk experiment; an investigation of nitrogen gains from non-symbiotic fixation. In: STEWART, W.D.P. Nitrogen fixation by free-living microorganisms. Cambridge, Gt. Brit., Cambridge Univ. Press, 1975a. p.71-84.
- DAY, J.M.; NEVES, M.C.P. & DÖBEREINER, J. Nitrogenase activity in the roots of tropical grasses. *Soil Biol. Biochem.*, 7:107-12, 1975b.

- DE-POLLI, H.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. & SALATI, E. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by ¹⁵N₂ incorporation. *Soil Biol. Biochem.*, 9:119-23, 1977.
- DÖBEREINER, J. Forage grasses and grain crops. In: BERGERSEN, F.J. *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. s.l., J. Wiley & Sons, 1980. p.535-55.
- DÖBEREINER, J. & BODDEY, R.M. Nitrogen fixation in association with graminæ. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION, 4., Canberra, Austrália, 1980. *Proceedings...* s.l., Australian Academy of Science, 1980. p.19.
- DÖBEREINER, J. & DAY, J.M. Associative symbioses in tropical grasses; characterization of micro-organisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W.E. & NYMAN, C.J. *Proc. of the 1st Int. Symp. on Nitrogen Fixation*. Pullman, Washington State Univ. Press, 1976. p.518-38.
- DÖBEREINER, J. & DE-POLLI, H. Nitrogen fixing rhizocoenoses. In: RUSSEL, R.S.; IGNE, K. & MEHTA, Y.R. *The soil root system in relation to Brazilian agriculture*. Londrina, IAPAR, 1981. p.175-98.
- EIRA, P.A. da; ALMEIDA, D.L. de & ALVAHYDO, R. Movimento do fon nitrato, em solo da série Itaguaí, nas condições naturais de campo. *Pesq. agropec. bras. Sér. Agron.*, Rio de Janeiro, 3:267-73, 1968.
- GREENWOOD, D.J. Effect of oxygen distribution in the soil on plant growth. In: WHITTINGTON, W.J., ed. *Root growth*. Butterworth, 1968. p.202-23.
- HENZELL, E.F. The use of nitrogen fertilizers on pastures in the subtropics and tropics. In: COMMONWEALTH AGRICULTURAL BUREAUX, Bucks, Inglaterra. *A review of nitrogen in the tropics with particular reference to pastures*. Berkshire, Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops, 1962. p.161-72. (Bulletin, 46).
- KAPULNIK, Y.; OKON, Y.; KIGEL, J.; NUR, I. & HENIS, Y. Effect of temperature, nitrogen fertilization and plant age of nitrogen fixation by *Setaria italica* inoculated with *Azospirillum brasiliense* (strain cd). *Plant Physiol.*, 68:340-3, 1981a.
- KAPULNIK, Y.; SARIG, S.; NUR, I.; OKON, Y.; KIGEL, J. & HENIS, Y. Yield increases in summer cereal crops of Israel in field inoculated with *Azospirillum*. *Exp. Agric.*, 17:179-87, 1981b.
- KLEPPER, L.; FLESCHER, D. & HAGEMAN, R.H. Generation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide for nitrate reduction in green leaves. *Plant Physiol.*, 48:580-90, 1971.
- MAGALHÃES, F.M.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R. & DÖBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. *An. Acad. Bras. Ci.*, 55:417-30, 1983.
- MAGALHÃES, F.M.M.; PATRIQUIN, D. & DÖBEREINER, J. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. *R. bras. Biol.*, 39:587-96, 1979.
- NEVES, M.C.P.; DAY, J.M.; CARNEIRO, A.M. & DÖBEREINER, J. Atividade da nitrogenase na rizosfera de gramíneas tropicais forrageiras. *R. Microbiol.*, 7(3):59-63, 1976.
- NEYRA, C.A. & DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation in grasses. *Adv. Agron.*, 29:1-38, 1977.
- NEYRA, C.A. & HAGEMAN, R.H. Pathway for nitrate assimilation in corn (*Zea mays* L.) leaves; cellular distribution of enzymes and energy sources for nitrate reduction. *Plant Physiol.*, 62:618-21, 1978.
- NUR, I.; OKON, Y. & HENIS, Y. An increase in nitrogen content of *Setaria italica* and *Zea mays* inoculated with *Azospirillum*. *Can. J. Microbiol.*, 26:482-5, 1980.
- OKON, Y.; HOUCHINS, J.P.; ALBRECHT, S.L. & BURRIS, R.H. The growth of *Spirillum lipoferum* at constant partial pressures of oxygen and the properties of its nitrogenase in cell-free extracts. *J. Gen. Microbiol.*, 98:87-93, 1977.
- PEREIRA, P.A.A.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. & NEYRA, C.A. Nitrate reduction and nitrogenase activity in excised corn roots. *Can. J. Bot.*, 59(12): 2445-9, 1981a.
- PEREIRA, P.A.A.; BÜLOW, J.F.W. von & NEYRA, C.A. Atividade da nitrogenase, redutase de nitrato e acumulação de nitrogênio em milho braquítico *Zea mays* (cv. Pirãão) em dois níveis de adubação nitrogenadas. *R. bras. Ci. Solo*, 2:29-33, 1978.
- PEREIRA, P.A.A.; DÖBEREINER, J. & NEYRA, C.A. Nitrogen assimilation and dissimilation in five genotypes of *Brachiaria* spp. *Can. J. Bot.*, 59(8): 1475-9, 1981b.
- QUINN, L.R.; MOTT, G.O. & BISSCHOFF, W.V.A. Fertilização de pastos de capim-colômbio e produção de carne com novilhos zebu. New York, IBEC Res. Inst., 1961. 40p. (Publ., 24).
- RAO, N.S. Response of crops to *Azospirillum* inoculation in India. In: VOSE, A.P. & RUSCHEL, A.P. *Associate N₂ fixation*. s.l., CRC Press, 1981. v.1, p.137-44.
- RENNIE, R.J. ¹⁵N isotope dilution as measure of dinitrogen fixation by *Azospirillum brasiliense* associated with maize. *Can. J. Bot.*, 58(1):21-4, 1980.
- SCHOLLHORN, R. & BURRIS, R.H. Acetylene as a competitive inhibitor of N₂ fixation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 58:213-6, 1967.
- SMITH, R.L.; SCHANK, S.C.; BOUTON, J.H. & QUESENBERRY, K.H. Yield increases of tropical grasses after inoculation with *Spirillum lipoferum*. *Ecol. Bull.*, Stockolm 26:380-5, 1978.
- SOUTO, S.M. Competição de forrageiras. II. Período seco. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 14., Belém, PA, 1978. *Anais...* Belém, Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1978. p.260-1.
- SOUTO, S.M. Resposta de gramíneas forrageiras tropicais à adubação nitrogenada, no período seco. In: REU-

- NIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 19., Recife, PE, 1977. Anais... Recife, Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1977. p.363-4.
- SOUTO, S.M. Variação estacional de fixação de N₂ e denitrificação em gramíneas forrageiras tropicais. Rio de Janeiro, UFRRJ, 1982. 268p. Tese Ph.D.
- TAYLOR, R.W. Response of two grasses to inoculation with *Azospirillum* spp. a Bahamian soil. *Trop. Agric., Trinidad*, 56:361-5, 1979.
- VLASSAK, K.; PAUL, E.A. & HARRIS, R.E. Assessment of biological nitrogen fixation in grassland and associated sites. *Plant Soil*, 38:637-49, 1973.
- WEIER, K.L.; MACRAE, I.C. & WHITTLE, J. Seasonal variation in the nitrogenase activity of a *Panicum maximum* var. Trichoglume pasture and identification of associated bacteria. *Plant Soil*, 63:189-97, 1981.