

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

SARA BRINATI VALENTIM

INSUMOS BIOLÓGICOS NO CRESCIMENTO DE CAPIM
MARANDU E ESTILOSANTES cv. CAMPO GRANDE

ALEGRE – ES
2018

SARA BRINATI VALENTIM

**INSUMOS BIOLÓGICOS NO CRESCIMENTO DE CAPIM
MARANDU E ESTILOSANTES cv. CAMPO GRANDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal na área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas

Orientador: Prof. Eduardo de Sá Mendonça

**ALEGRE – ES
2018**

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

B858i Brinati Valentim, Sara, 1991-
INSUMOS BIOLÓGICOS NO CRESCIMENTO DE CAPIM
MARANDU E ESTILOSANTES cv. CAMPO GRANDE / Sara
Brinati Valentim. - 2018.
95 f. : il.

Orientador: Eduardo Mendonça.

Coorientadores: Diego Burak, Anderson Peçanha.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e
Engenharias.

1. Insumos Biol'gicos. 2. Bioestimulantes na agricultura. 3.
Substâncias Húmicas. 4. Óleos Essenciais. 5. Pastagens
Degradadas. 6. Crescimento Vegetal. I. Mendonça, Eduardo. II.
Burak, Diego. III. Peçanha, Anderson. IV. Universidade Federal
do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.
V. Título.

CDU: 63

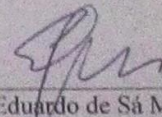
SARA BRINATI VALENTIM

**INSUMOS BIOLÓGICOS NO CRESCIMENTO DE CAPIM MARANDU E
ESTILOSANTES cv. CAMPO GRANDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Produção Vegetal na Área de Concentração em Solos e Nutrição de Plantas.

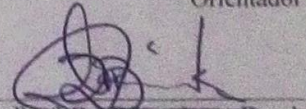
Aprovada em 26 de abril de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Eduardo de Sá Mendonça
Universidade Federal do Espírito Santo

Orientador



Prof. Dr. Diego Lang Burak
Universidade Federal do Espírito Santo

Co-orientador



Prof. Dr. Anderson Lopes Peçanha
Universidade Federal do Espírito Santo

Examinador Externo



Prof. Dr. Ivan Jannotti Wendling
Universidade Federal do Espírito Santo

Examinador Externo

**Aos meus pais, Valker e Lúcia,
Aos meus irmãos, Débora e Isaías,
Dedico.**

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus, pelo dom da vida, por me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar. Agradeço a Ele por ter colocado pessoas tão especiais na minha vida.

Aos meus pais, pelo amor, por serem exemplos de fé, por me mostrarem a importância de estudar e por não medirem esforços para que eu realizasse meus sonhos. Aos meus irmãos, pelo amor, apoio e motivação incondicional. Aos meus avós, pela inspiração e orações.

Agradeço aos meus amigos, por entenderem as minhas faltas e sempre me motivarem. Agradeço especialmente aos meus amigos da Pós, Abel, Ariany, Lucas Lucimara, Marjorie, Paulinha, Paulo, Pedro Henrique e Vinícius, por estarem sempre presentes em todos os momentos, me apoiando e alegrando esses dois anos de mestrado. Às minhas companheiras de república, Ana Carolina e Hortência, pela amizade e por se tornarem a minha família alegre.

Aos colegas dos Laboratórios de Matéria Orgânica e de Pesquisa, Camila, Danilo, Diego Matias, Marcelo e Lenita, por me auxiliarem nas avaliações e análises dos experimentos. Aos alunos de graduação, Ana Paula, Francielle e Cássio, pela ajuda na condução do experimento e pela amizade.

Ao Professor Eduardo, pela orientação, confiança, paciência e amizade. Obrigada por todos os ensinamentos que foram muito importantes para a conclusão desta etapa. Agradeço ao Professor Diego, pela coorientação e auxílio das análises estatísticas. Aos professores Paulo César, Anderson e Ivan, pelas contribuições neste trabalho.

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de realizar o meu mestrado. À CAPES e à FAPES, pelo apoio financeiro e concessão da bolsa.

A todos, o meu muito obrigada!

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou
o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou
o que era antes”.*

(Marthin Luther King)

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1** – Atributos químicos e físicos do solo utilizado no experimento.....27
- Tabela 2.** Valores de F, nível de significância e teores médios de macronutrientes da parte aérea de Capim Marandu, para as concentrações 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de eucalipto (OEE), no momento do primeiro e segundo cortes33
- Tabela 3.** Valores médios dos parâmetros fotossintéticos da parte aérea de Capim Marandu em função de concentrações de óleo essencial de eucalipto (OEE), no momento do primeiro e segundo cortes..... 35
- Tabela 4.** Valores médios dos parâmetros fotossintéticos da parte aérea de Capim Marandu em função de concentrações de óleo essência de eucalipto (OEE), no momento do primeiro corte 38
- Tabela 5.** Teores médios de macronutrientes e carbono (C) da parte aérea de Estilosantes cv. Campo Grande, para as concentrações 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de eucalipto (OEE), no momento do primeiro e segundo cortes..... 41

CAPÍTULO 2

- Tabela 1** – Atributos químicos e físicos do solo utilizado no experimento..... 52
- Tabela 2.** Resumo da análise de variância dos atributos morfológicos massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e altura de plantas de estilosantes cv. Campo Grande com e sem inoculação, submetidas à concentrações de substâncias húmicas (SH)55
- Tabela 3.** Resumo da análise de variância do conteúdo de macronutrientes em plantas de estilosantes cv. Campo Grande, submetidas a concentrações de substâncias húmicas (SH) com e sem inoculação..... 56
- Tabela 4.** Valores médios da massa da parte aérea, altura de plantas e conteúdo de macronutrientes de estilosantes cv. Campo Grande em função de concentrações de substâncias húmicas (SH), com e sem inoculação, no momento do segundo corte 58
- Tabela 5.** Resumo da análise de variância dos atributos fotossintéticos e teor de clorofila em plantas de estilosantes cv. Campo Grande, submetidas a concentrações de substâncias húmicas (SH) com e sem inoculação..... 59

Tabela 6. Valores médios dos parâmetros fotossintéticos da parte aérea de estilosantes cv. Campo Grande em função de concentrações de substâncias húmicas (SH), com e sem inoculação, no momento do primeiro corte56

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Atributos químicos e físicos do solo utilizado no experimento..... 69

Tabela 2. Valores médios dos teores de C e macronutrientes N, P, K, Ca e Mg na parte aérea de Capim Marandu para os tratamentos: uso isolado de BD; uso combinado de OEE + SH; associação entre BD + SH; associação entre BD + OEE; associação entre BD + OEE + SH e tratamento controle..... 76

Tabela 3. Valores médios dos parâmetros fotossintéticos da parte aérea de Capim Marandu para os tratamentos: uso isolado de BD; uso combinado de OEE + SH; associação entre BD + SH; associação entre BD + OEE; associação entre BD + OEE + SH e tratamento controle..... 76

Tabela 4. Valores médios dos teores de C e macronutrientes N, P, K, Ca e Mg na parte aérea de estilosantes cv. Campo Grande após os tratamentos: uso isolado de BDE; uso combinado de SH + OEE; associação entre SH + BDE; associação entre BDE + OEE; associação entre BDE + OEE + SH e tratamento controle..... 80

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Produção de massa seca da parte aérea de plantas de Capim Marandu aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto (primeiro corte) e aos 150 dias (segundo corte), tratadas com as concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE.29
- Figura 2.** Altura de plantas de Capim Marandu aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto (primeiro corte) e aos 150 dias (segundo corte), tratadas com as concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE.30
- Figura 3.** Diâmetro do colmo de plantas de Capim Marandu aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto (momento do primeiro corte) e aos 150 dias (momento do segundo corte), tratadas com as concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE..... 31
- Figura 4.** Número de perfilhos de plantas de Capim Marandu aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto (momento do primeiro corte) e aos 150 dias (momento do segundo corte), tratadas com as concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE..... 32
- Figura 5.** Produção de massa seca da raiz de plantas de Capim Marandu aos 150 dias (momento do segundo corte), tratadas com as concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE..... 32
- Figura 6.** Conteúdo foliar de N, P, K, Ca e Mg (A, B, C, D e E, respectivamente), em plantas de Capim Marandu, aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto (momento do primeiro corte) e aos 150 dias (momento do segundo corte), tratadas com as concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE34
- Figura 7.** Taxa Fotossintética em plantas de Capim Marandu, aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto (momento do primeiro corte), tratadas com as concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE 36
- Figura 8.** Produção de massa seca da parte aérea (MSPA) e altura de plantas de estilosantes cv. Campo Grande (A e B, respectivamente) aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto (momento do primeiro corte) e aos 150 dias (momento do segundo corte), tratadas com as concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE..... 37
- Figura 9.** Teor de Mg da parte aérea de plantas de estilosantes cv. Campo Grande aos 45 dias após a última aplicação de OEE (momento do primeiro corte), tratadas com as concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE 39
- Figura 10.** Conteúdo de N, P, K, Ca e Mg (A, B, C, D e E, respectivamente) em plantas de estilosantes cv. Campo Grande no momento do primeiro corte, tratadas com concentrações 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE.....40

Figura 11. Taxa Fotossintética em plantas de estilosantes cv. Campo Grande, aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto (momento do primeiro corte), tratadas com as concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE42

CAPÍTULO 2

Figura 1. Produção de massa seca da parte aérea e altura de plantas de estilosantes cv. Campo Grande, com e sem inoculação (A e B, respectivamente) aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto (primeiro corte), submetidas às concentrações de substâncias húmicas (SH)56

Figura 2. Produção de massa seca da parte aérea e altura de plantas de estilosantes cv. Campo Grande, com e sem inoculação (A e B, respectivamente) aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto (primeiro corte), submetidas às concentrações de substâncias húmicas (SH). 57

CAPÍTULO 3

Figura 1. Produção de massa seca da parte aérea (MSPA) de Capim Marandu após os tratamentos: uso isolado de BD; uso combinado de SH + OEE; associação entre SH + BD; associação entre BD + OEE; associação entre BD + OEE + SH e tratamento controle. 72

Figura 2. Produção de massa seca da raiz (MSR) de Capim Marandu após os tratamentos: uso isolado de BD; uso combinado de OEE + SH; associação entre BD + SH; associação entre BD + OEE; associação entre BD + OEE + SH e tratamento controle. 73

Figura 3 Altura de plantas de Capim Marandu após os tratamentos: uso isolado de BD; uso combinado de OEE + SH; associação entre BD + SH; associação entre BD + OEE; associação entre BD + OEE + SH e tratamento controle 74

Figura 4. Diâmetro do colmo de plantas de Capim Marandu após os tratamentos: uso isolado de BD; uso combinado de OEE + SH; associação entre BD + SH; associação entre BD + OEE; associação entre BD + OEE + SH e tratamento controle.....74

Figura 5. Conteúdo foliar de N, P, K, Ca e Mg (A, B, C, D e E, respectivamente) em plantas de Capim Marandu após os tratamentos: uso isolado de BD; uso combinado de OEE + SH; associação entre BD + SH; associação entre BD + OEE; associação entre BD + OEE + SH e tratamento controle. 75

Figura 6. Produção de massa seca da parte aérea de plantas (MSPA) de estilosantes cv. Campo Grande após os tratamentos: uso isolado de BDE; uso combinado de SH + OEE;

associação entre SH + BDE; associação entre BDE + OEE; associação entre BDE + OEE + SH e tratamento controle. 77

Figura 7. Produção de massa seca da raiz de estilosantes cv. Campo Grande após os tratamentos: uso isolado de BDE; uso combinado de SH + OEE; associação entre SH + BDE; associação entre BDE + OEE; associação entre BDE + OEE + SH e tratamento controle 78

Figura 8. Altura de plantas de estilosantes cv. Campo Grande após os tratamentos: uso isolado de BDE; uso combinado de SH + OEE; associação entre SH + BDE; associação entre BDE + OEE; associação entre BDE + OEE + SH e tratamento controle..... 78

Figura 9. Diâmetro do colmo de plantas de estilosantes cv. Campo Grande após os tratamentos: uso isolado de BDE; uso combinado de SH + OEE; associação entre SH + BDE; associação entre BDE + OEE; associação entre BDE + OEE + SH e tratamento controle. 79

Figura 10. Conteúdo foliar de N, P, K, Ca e Mg (A, B, C, D e E, respectivamente) em plantas de estilosantes cv. Campo Grande após os tratamentos: uso isolado de BD; uso combinado de OEE + SH; associação entre BD + SH; associação entre BD + OEE; associação entre BD + OEE + SH e tratamento controle 81

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	16
GENERAL ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO GERAL	18
CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE ÓLEO ESSENCIAL DE EUCALIPTO NO CRESCIMENTO DE CAPIM MARANDU E ESTILOSANTES CV. CAMPO GRANDE	22
RESUMO	22
ABSTRACT	23
1 INTRODUÇÃO	24
2 MATERIAL E MÉTODOS	26
2.3 Obtenção do óleo essencial de Eucalipto	27
2.4 Atributos Morfológicos, Fisiológicos e Análise Nutricional	27
2.4.1 Trocas gasosas	28
2.4.2 Teor de clorofila	28
2.4.3 Análise Nutricional e Determinação de Carbono	28
2.4.4 Análises estatísticas	28
3 RESULTADOS	29
3.1 Capim marandu	29
3.1.1 Atributos Morfológicos	29
3.1.2 Análise nutricional foliar	33
3.1.3 Trocas gasosas e teor de clorofila	35
3.2 Estilosantes cv. Campo Grande	37
3.2.1 Atributos Morfológicos	37
3.2.2 Análise nutricional foliar	37
3.2.3 Atributos Fisiológicos	41
4 DISCUSSÃO	43
4.1 Capim Marandu	43
4.2 Estilosantes cv. Campo Grande	45
5 CONCLUSÕES	47

CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DOSES DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EM ESTILOSANTES cv. CAMPO GRANDE, COM E SEM INOCULAÇÃO.....	48
RESUMO	48
ABSTRACT	49
1 INTRODUÇÃO.....	50
2 MATERIAL E MÉTODOS	51
2.2 Caracterização química do solo	51
2.3 Obtenção das substâncias húmicas	52
2.4 Atributos Morfológicos, Fisiológicos e Análise Nutricional.....	53
2.4.1 Trocas gasosas	53
2.4.2 Teor de clorofila	53
2.4.3 Análise Nutricional e Determinação de Carbono	53
2.4.4 Análises estatísticas	54
3 RESULTADOS	55
3.1 Atributos Morfológicos	55
3.2 Análise nutricional.....	56
3.3 Atributos Fisiológicos.....	59
4 DISCUSSÃO	61
5 CONCLUSÕES	64
CAPÍTULO 3: EFEITO DA COMBINAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS, SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E ÓLEO ESSENCIAL DE EUCALIPTO EM CAPIM MARANDU E ESTILOSANTES cv. CAMPO GRANDE.....	65
RESUMO	65
1 INTRODUÇÃO.....	67
2 MATERIAL E MÉTODOS	68
2.2 Obtenção do óleo essencial de Eucalipto	69
2.3 Caracterização química do solo	69
2.4 Condições de cultivo	70

2.5 Atributos Morfológicos, Fisiológicos e Análise Nutricional.....	70
2.5.1 Trocas gasosas	70
2.5.2 Teor de clorofila	70
2.5.3 Análise Nutricional e Determinação de Carbono	70
2.5.4 Análises estatísticas	71
3 RESULTADOS	72
3.1 Capim Marandu	72
3.1.1 Atributos Morfológicos	72
3.1.2 Análise nutricional foliar	75
3.1.3 Trocas gasosas e teor de clorofila.....	76
3.2 Estilosantes cv. Campo Grande	77
3.2.1 Atributos Morfológicos	77
3.2.2 Análise nutricional.....	80
4 DISCUSSÃO	82
4.1 Capim Marandu	82
4.2 Estilosantes cv. Campo Grande	83
5 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	86
ANEXOS	95

RESUMO GERAL

Os principais fatores responsáveis pela degradação das áreas cultivadas com pastagens estão relacionados ao manejo incorreto e desmatamento para a expansão agropecuária. Dentro dos princípios da conservação do solo, a ciclagem de nutrientes pela adubação verde, fixação biológica de nitrogênio (FBN) por bactérias diazotróficas e uso de bioestimulantes do crescimento vegetativo avançaram como promissores para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o uso de bactérias diazotróficas, substâncias húmicas e óleo essencial de eucalipto em Capim Marandu e Estilosantes cv. Campo Grande como estratégia inovadora para maximização da produtividade e qualidade do solo. Os 3 capítulos foram desenvolvidos em casa de vegetação. No capítulo 1, os tratamentos consistiram em cinco concentrações de óleo essencial de eucalipto (OEE): 0, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ e, no capítulo 2, em cinco concentrações de substâncias húmicas (SH): 0, 20, 40, 60, 80 mg C L^{-1} , aplicadas em três épocas: 15, 30 e 45 dias após a emergência, antes e após o primeiro corte das plantas. O volume de OEE e SH pulverizados, nos dois capítulos, em cada época de aplicação, foi de 1 mL por planta. No capítulo 3, foi analisada a combinação da melhor concentração de OEE e SH, encontradas nos capítulos 1 e 2, com bactérias diazotróficas endofíticas. Utilizou-se um delineamento em blocos casualizados, com os tratamentos: controle; substâncias húmicas e óleo essencial de eucalipto; substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas; óleo essencial de eucalipto e bactérias diazotróficas endofíticas; substâncias húmicas, óleo essencial de eucalipto e bactérias diazotróficas endofíticas; e bactérias diazotróficas. Os parâmetros analisados foram massa seca da parte aérea e da raiz, altura de plantas, diâmetro do colmo, medidas de trocas gasosas e análise nutricional. No capítulo 1, o óleo essencial de eucalipto promoveu maior crescimento em plantas de Capim Marandu e maior rebrota em plantas de estilosantes cv. Campo Grande. Os tratamentos com óleo essencial de eucalipto foram eficientes na produção de massa seca da parte aérea de Capim Marandu e estilosantes cv. Campo Grande. No capítulo 2, a utilização de concentrações de substâncias húmicas demonstrou ser eficiente para o aumento da produção de massa seca da parte aérea de estilosantes cv. Campo Grande. No capítulo 3, o tratamento com bactérias diazotróficas demonstrou eficiência na produção de massa seca da parte aérea e raiz de Capim Marandu e incrementou 92% o acúmulo de N em estilosantes cv. Campo Grande em relação ao tratamento controle.

Palavras – chave: promoção de crescimento vegetal, forrageiras, bioestimulantes

GENERAL ABSTRACT

The main factors responsible for the degradation of cultivated areas with pastures are related to the incorrect management and deforestation for agricultural expansion. Within the principles of soil conservation, nutrient cycling by green fertilization, biological nitrogen fixation (BNF) by diazotrophic bacteria and the use of vegetative growth biostimulants have advanced as promising for the development of sustainable technologies. The general objective of this work was to evaluate the use of diazotrophic bacteria, humic substances and eucalyptus essential oil in Capim Marandu and Estilosantes cv. Campo Grande as an innovative strategy to maximize productivity and soil quality. The 3 chapters were developed in greenhouse. In Chapter 1, treatments consisted of five concentrations of eucalyptus essential oil (OEE): 0, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ and, in Chapter 2, five concentrations of humic substances (SH) 20, 40, 60, 80 mg C L^{-1} , applied at three times: 15, 30 and 45 days after emergence, before and after the first cut of the plants. The volume of OEE and SH sprayed in the two chapters at each application time was 1 mL per plant. In Chapter 3, the combination of the best concentration of OEE and SH found in chapters 1 and 2 with endophytic diazotrophic bacteria was analyzed. A randomized complete block design was used, with the treatments: control; humic substances and eucalyptus essential oil; humic substances and endophytic diazotrophic bacteria; eucalyptus essential oil and endophytic diazotrophic bacteria; humic substances, eucalyptus essential oil and endophytic diazotrophic bacteria; and diazotrophic bacteria. The analyzed parameters were aerial and root dry mass, plant height, shoot diameter, gas exchange measurements and nutritional analysis. In chapter 1, eucalyptus essential oil promoted greater growth in Capim Marandu plants and greater regrowth in cv. Large field. The treatments with essential oil of eucalyptus were efficient in the production of dry mass of the aerial part of Capim Marandu and styling cv. Large field. In chapter 2, the use of concentrations of humic substances proved to be efficient for the increase of dry mass production of aerial parts of cv. Large field. In chapter 3, the treatment with diazotrophic bacteria demonstrated efficiency in the dry mass production of shoot and root of Capim Marandu and increased 92% the accumulation of N in estilosantes cv. Campo Grande in relation to the control treatment.

Key words: plant growth promotion, forages, biostimulants

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil apresenta uma área de 260 milhões de hectares ocupadas por pastagens, abrigando aproximadamente 215 milhões de cabeças bovinas. No entanto, a maioria das pastagens encontra-se em algum estágio de degradação, sendo a limitação de N considerada um dos principais fatores responsáveis por esse processo (Ribeiro et al., 2017). Em estudo do Centro de Desenvolvimento do Agronegócio (Cedagro), foi quantificado o total de áreas degradadas no estado do Espírito Santo, sendo que, dos 393.321,55 hectares de áreas agrícolas degradadas, 238.943,66 hectares são áreas cultivadas com pastagem, equivalente a 18,10% da área total (Cedagro, 2012).

Os principais fatores responsáveis pela degradação das áreas cultivadas com pastagens estão relacionados ao manejo incorreto e, principalmente, ao superpastejo. A degradação do solo reduz a sua capacidade produtiva, causando prejuízos financeiros e ambientais em razão da perda de solo e nutrientes pelo processo de erosão, com redução do aporte de C no solo e contaminação de rios e mananciais.

As regiões Sul e do Caparaó, no Estado do Espírito Santo, particularmente, têm grande relevância na agricultura, na pecuária e na produção de serviços ambientais, sendo necessária a recuperação de extensas áreas degradadas. Dentro do balanço de C dos sistemas de produção pecuária, a compensação das emissões de CO₂ (ou gases equivalentes) a partir da recuperação e manejo incorreto das pastagens e sequestro de C no solo demonstrou ser o melhor caminho para mitigação (Oliveira, 2015).

Dos princípios da conservação do solo, a adubação verde, que promove a ciclagem de nutrientes, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) por bactérias diazotróficas e o uso de bioestimulantes do crescimento vegetativo avançaram como promissores para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis. Segundo Russo & Berlyn (1990) alguns compostos vegetais são denominados bioestimulantes, representando produtos sem características nutricionais, que contêm uma ou mais substâncias capazes de estimular a absorção de nutrientes e a eficiência de uso pelas plantas. Segundo Vasconcelos et al. (2009) e Calvo et al. (2014), os bioestimulantes proporcionam maior produção vegetal, resistência a fatores externos, favorecendo a qualidade da cultura quando aplicados em pequenas quantidades.

As bactérias diazotróficas são organismos procariotos que têm a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico tornando-o disponível à planta na forma de amônio (Moreira et al., 2010). Colonizam o interior de tecidos vegetais sem causar sintomas de doenças, podendo contribuir efetivamente para a FBN, já que a troca se faz de forma direta, com menor competição por fontes de C (Döbereiner, 1992; Baldani et al., 1997;).

Tal fato torna-se particularmente importante em pastagens, onde o esgotamento da fertilidade do solo é apontado como uma das principais causas da sua degradação e a adubação nitrogenada destaca-se como prioritária para a recuperação da qualidade do solo (Bonfim-da-Silva, 2004).

Contudo, a introdução de bactérias diazotróficas diretamente no ambiente de produção ainda permanece desafiadora devido a recorrentes insucessos causados por problemas de competição, dificuldade de persistência do inóculo (Okon & Labandera-Gonzalez, 1994), além dos problemas citados por Hungria & Vargas (2000), como acidez do solo, deficiência de nutrientes, altas temperaturas no solo, luminosidade, baixa precipitação pluviométrica, salinidade e baixa fertilidade do solo. Com o objetivo de amenizar os problemas citados, a associação de microrganismos com substâncias húmicas tem se tornado promissor para introdução, estabelecimento e maximização da atividade das bactérias diazotróficas (Canellas et al., 2002; Marques Jr. et al., 2008; Conceição et al., 2008).

De acordo com Aguiar (2015), o uso de substâncias húmicas via foliar ou no solo, como promotores de crescimento, tem atraído a atenção de agricultores e empresários com a abertura de um mercado crescente para a comercialização de produtos à base de substâncias húmicas. Entretanto, a maioria desses produtos extrai substâncias húmicas de fontes não renováveis, tais como turfas, ou importam de fontes fósseis, como rochas ricas em carbono humificado (leonardita e lignita). Uma alternativa é a obtenção de matéria húmica a partir do produto da transformação de resíduos orgânicos pelos micro-organismos e minhocas, conhecido como vermicompostagem. O produto final é o húmus de minhoca naturalmente enriquecido com ácidos húmicos e com grande capacidade de promoção do crescimento vegetal, especialmente do sistema radicular (Canellas et al., 2002; Aguiar et al., 2013). Em aplicações via solo, a suspensão de substâncias húmicas adere ao tecido vegetal rapidamente (Marques-Júnior, 2006) aumentando a rugosidade e a heterogeneidade da superfície favorecendo a ancoragem da bactéria (Frade et al., 2011), primeiro passo para o estabelecimento e crescimento do biofilme microbiano.

Além de tais efeitos em associação aos microrganismos, a fração humificada da matéria orgânica pode influenciar diretamente o desenvolvimento e o crescimento das plantas (Vaughan e Malcolm, 1985; Nardi et al., 2002; Canellas et al., 2002; Canellas et al., 2005; Zandonadi, 2006). Devido à sua alta capacidade de troca catiônica, as substâncias húmicas possuem a propriedade de complexar e, com isso, disponibilizar cátions, fornecer nutrientes às plantas e atuar como bioestimulante para o seu metabolismo. Estudo conduzido por Caron et al. (2015) demonstrou os efeitos positivos das substâncias húmicas na germinação de sementes, crescimento inicial das raízes, e

produção de biomassa da planta, além do auxílio na defesa da planta contra estresses.

Dentre os diferentes bioestimulantes, os óleos essenciais trazem benefícios ao crescimento vegetal e estimulam o metabolismo energético (Parrado et al., 2007). Uma das principais vantagens desses produtos inclui a sua absorção direta pelos vegetais, resultando em menor utilização de energia por parte das plantas para realizar esse processo. Os óleos extraídos de diversas espécies do gênero *Eucalyptus* estão entre os mais estudados (Mota et al., 2015). Pesquisas confirmam que óleos essenciais de algumas plantas possuem a capacidade de bioestimulação do crescimento vegetal, quando aplicados em baixas concentrações (Ludley et al., 2009; Steffen et al., 2010). A aplicação de óleo essencial de eucalipto proporcionou maior crescimento das raízes e da parte aérea em mudas de eucalipto conferindo maior resistência a condições de stress (Steffen et al., 2010). Dessa forma, torna-se importante conhecer os benefícios do OEE, os quais, aplicados em menores concentrações, assim como outros bioestimulantes, podem estimular o crescimento vegetal e aumentar a população de importantes microrganismos do solo (Blum, 1999).

Complementando os efeitos bioestimulantes e biofertilizantes dos insumos biológicos, o uso de práticas de adição de matéria orgânica tem papel importante na recuperação de pastagens degradadas. Dentre essas práticas, destaca-se a adubação verde, reconhecida como alternativa viável na busca pela sustentabilidade dos solos agrícolas, pois conduz ao aumento ou à manutenção do teor de nitrogênio do solo, diretamente correlacionado com a presença da matéria orgânica (Andrade et al. 1984). Leguminosas e gramíneas podem ter seu desempenho potencializado por bioestimulantes à base de substâncias húmicas e óleos essenciais. Muitos autores estudaram o efeito de ácidos húmicos sobre leguminosas, principalmente a soja, observando que o bioestimulante é capaz de aumentar a nodulação radicular dessa espécie, favorecendo a fixação biológica de N (Tan e Tantiwiranond, 1983). Outros estudos verificaram que a utilização de extratos e óleos essenciais de plantas são alternativas eficientes no bioestímulo do crescimento vegetal de leguminosas (Parrado et al., 2007; Ludley et al., 2009; Steffen et al., 2010).

Muitas espécies de *Stylosanthes* são utilizadas como forrageiras em rotação de cultura, melhorando de forma expressiva a fertilidade e a conservação dos solos (Ramesh et al., 1997), além de melhorar a fixação de N (Reddy et al., 1989). O gênero *Stylosanthes* tem reconhecido potencial na recuperação de solos degradados (Carneiro et al., 1999) que em geral possuem alta acidez e de baixa fertilidade (Williams et al., 1984). Plantas do gênero *Stylosanthes* possuem outras vantagens, como o crescimento rápido, elevada produção de biomassa, boa resistência a condições adversas, abundância de sementes e

fácil cultivo, o que as tornam ótimas candidatas a serem empregadas em programas de recomposição da vegetação e recuperação de áreas degradadas (Xingfeng et al., 2010). Dessa forma, esse gênero tem grande potencial para a recuperação de áreas degradadas tornando-a potencialmente mais eficiente quando bioestimuladas por substâncias húmicas ou óleos essenciais. Diante do exposto e com a hipótese de que as substâncias húmicas e o óleo essencial de eucalipto, associados às bactérias diazotróficas, promovem maior crescimento vegetal, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar e validar biotecnologias integrando o uso de bactérias diazotróficas, substâncias húmicas e óleo essencial de eucalipto em Capim Marandu e Estilosantes cv. Campo Grande, como estratégia inovadora para maximização da produtividade e qualidade do solo.

CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE ÓLEO ESSENCIAL DE EUCALIPTO NO CRESCIMENTO DE CAPIM MARANDU E ESTILOSANTES CV. CAMPO GRANDE

RESUMO

O uso de bioestimulantes provenientes de diferentes fontes tem aumentado de maneira considerável. Esses produtos incluem uma gama de substâncias como os mais diversos óleos essenciais (OE), produtos derivados do metabolismo secundário vegetal. O óleo essencial de eucalipto (OEE) pode gerar alelopatia a outras espécies de plantas, porém essa reação depende da concentração utilizada e de compostos específicos presentes. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito de diferentes concentrações de óleo essencial de eucalipto aplicadas via foliar no desenvolvimento e nutrição de Capim Marandu e estilosantes cv. Campo Grande. O trabalho foi conduzido em casa de vegetação. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com esquema fatorial 5x2, com quatro repetições, totalizando 40 unidades experimentais. Os tratamentos consistiram de cinco concentrações de óleo essencial de eucalipto: 0, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{L L}^{-1}$, aplicadas via foliar em dois períodos: 15, 30 e 45 dias após a emergência das plantas e aos 15, 30 e 45 dias após o primeiro corte. Foram semeadas 10 sementes de estilosantes cv. Campo Grande e 10 sementes da espécie *Urochloa brizantha* cv. Capim Marandu, em vasos de 5 dm³. O experimento foi conduzido durante 150 dias, com medidas semanais de altura e diâmetro do colmo. Aos 45 e 90 dias, foi obtida a massa seca da parte aérea e realizadas as medidas de trocas gasosas, teor de clorofila e análise nutricional. Aos 150 dias foi analisada a produção de massa seca da raiz. Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando significativo, utilizado o teste de Tukey ($p \leq 0.05$) e análise de regressão. Os resultados demonstraram que a utilização de óleo essencial de eucalipto promove maior crescimento em plantas de Capim Marandu e rebrota em plantas de estilosantes cv. Campo Grande. Os tratamentos com óleo essencial de eucalipto demonstraram ser eficientes na produção de massa seca da parte aérea de Capim Marandu e estilosantes cv. Campo Grande.

Palavras – chave: bioestimulantes, crescimento vegetal, massa seca

CHAPTER 1: EVALUATION OF THE EFFECT OF EUCALYPTUS ESSENTIAL OIL DOSES ON THE GROWTH OF CAPIM MARANDU AND ESTILOSANTS CV. CAMPO GRANDE

ABSTRACT

The use of biostimulants from different sources has increased considerably. These products include a range of substances such as the most diverse essential oils (OE), products derived from secondary plant metabolism. Eucalyptus essential oil (OEE) can generate allelopathy to other species of plants, but this reaction depends on the concentration used and specific compounds present. The objective of this work was to analyze the effect of different concentrations of eucalyptus essential oil applied in the development and nutrition of Capim Marandu and estilosantes cv. Campo Grande. The work was conducted in a greenhouse. The experimental design was a randomized complete block design, with a 5x2 factorial scheme, with four replications, totaling 40 experimental units. The treatments consisted of five concentrations of eucalyptus essential oil: 0, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{L L}^{-1}$, applied via foliar in two periods: 15, 30 and 45 days after emergence of the plants and at 15, 30 and 45 days after the first cut. Seeds of 10 cv. Campo Grande and 10 seeds of the species *Urochloa brizantha* cv. Capim Marandu, in pots of 5 dm³. The experiment was conducted for 150 days, with weekly measures of height and stem diameter. At 45 and 90 days, the aerial part dry mass was obtained and gas exchange, chlorophyll content and nutritional analysis were performed. At 150 days the root dry mass production was analyzed. Data were submitted to analysis of variance and, when significant, the Tukey test ($p \leq 0.05$) and regression analysis were used. The results showed that the use of eucalyptus essential oil promotes greater growth in Capim Marandu plants and regrowth in estilosantes cv. Campo Grande. The treatments with essential oil of eucalyptus have been shown to be efficient in the production of dry mass of the aerial part of Capim Marandu and estilosantes cv. Campo Grande.

Key words: biostimulants, plant growth, dry mass

1 INTRODUÇÃO

Para alcançar resultados positivos na recuperação de pastagens degradadas é fundamental a escolha das espécies de plantas forrageiras a serem utilizadas. As gramíneas adaptam-se às diferentes condições edafoclimáticas, sendo importantes na revitalização do solo, proteção e recuperação de áreas degradadas (Fabrice et al., 2015). O gênero *Uruchloa* tem fornecido importantes espécies de gramíneas forrageiras, destacando-se a espécie *Uruchloa brizantha* cv. Marandu, planta originária da região vulcânica da África, onde os solos geralmente apresentam bons níveis de fertilidade, com precipitação pluviométrica anual próximo de 700 mm e cerca de 8 meses de seca no outono e inverno (Rayman, 1983). A cultivar Marandu é proveniente da Estação Experimental de Forrageiras de Marandellas, no Zimbábue, na África, sendo introduzida no Brasil por volta de 1967, por iniciativa do produtor de sementes Paul Rankin Rayman, e do Dr. John Clatworthy, pesquisador da referida Estação Experimental (EMBRAPA, 1984).

O gênero *Stylosanthes*, pertencente à família Fabaceae, está amplamente distribuído e naturalmente presente em regiões tropicais e subtropicais das Américas, África e sudeste da Ásia (Williams et al., 1984). O Brasil é considerado o principal centro de diversidade do gênero, com ocorrência de 25 espécies (Costa & Ferreira, 1984; Edye & Cameron, 1984; Ferreira & Costa, 1979; Manneje, 1984). O estilosantes fixa biologicamente o nitrogênio pela associação simbiótica de suas raízes com bactérias do gênero *Rhizobium*, constituindo o principal processo de adição de nitrogênio exógeno, sendo esse elemento o mais abundante nas plantas e um dos principais fatores limitantes para o seu crescimento (Andrade et al., 2010).

As gramíneas e leguminosas podem ter seu desempenho potencializado pelos bioestimulantes. O uso de bioestimulantes provenientes de diferentes fontes tem aumentado de maneira considerável, visto que esses produtos incluem uma gama de substâncias de origem natural, como os mais diversos óleos essenciais (OE), produtos derivados do metabolismo secundário vegetal. Alguns metabólitos secundários ou óleos essenciais, como os do gênero *Eucalyptus* spp., são utilizados como agentes bioativos no controle de pragas e doenças de espécies vegetais de interesse comercial, assim como no auxílio ao desenvolvimento de técnicas de estimulação do crescimento vegetal (Delasquis et al., 2002; Bonaldo et al., 2004; Sandí & Blanco, 2007; Steffen et al., 2008), ou reduzindo os efeitos negativos às plantas proporcionados pela ação de determinados organismos patogênicos ou adversidades ambientais (Mafia et al., 2005; Andrade et al., 2006; Mafia et al., 2007).

O óleo essencial de eucalipto (OEE) pode gerar alelopatia a outras espécies de

plantas (Cruz et al., 2000; Goetze e Thomé, 2004), porém essa reação depende da concentração utilizada e de compostos específicos presentes. Dessa forma, torna-se importante conhecer os benefícios do OEE que, assim como outros bioestimulantes, quando utilizado em concentrações pequenas pode estimular o crescimento vegetal e aumentar a população de importantes microrganismos do solo (Blum, 1999). Os OE não possuem importância nutricional para o crescimento da planta em si, porém favorecem seu crescimento das mais variadas formas, por exemplo, estimulando seu metabolismo energético e aumentando a atividade das bombas de prótons (Parrado et al., 2007). Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses de óleo essencial de eucalipto aplicadas via foliar no desenvolvimento e nutrição do Capim Marandu e estilosantes cv. Campo Grande.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições de cultivo e manejo

O trabalho foi conduzido durante dois cortes, no período de março a agosto, em casa de vegetação do Departamento de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo. Nesse período, a temperatura média dentro da casa de vegetação apresentou uma média entre 20.2 e 29.8°C, com máximas variando entre 34.4 e 36°C e mínimas entre 15.6 e 18.3°C. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro repetições, no esquema fatorial 5x2, totalizando 40 unidades experimentais. Foram semeadas dez sementes da cultivar Campo Grande, formada pelas espécies *Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala* e dez sementes da cultivar Capim Marandu, espécie *Urochloa brizantha*, em vasos de 5 dm³. Essas cultivares foram escolhidas para este trabalho por serem as forrageiras mais utilizadas em pastagens na região de Alegre-ES.

Os tratamentos consistiram em cinco concentrações de óleo essencial de eucalipto (OEE): 0, 20, 40, 60, 80 µL L⁻¹, baseadas no trabalho de Barroso (2016), e três épocas de aplicação: 15, 30 e 45 dias após a emergência, antes e após o primeiro corte das plantas. O volume de OEE pulverizado, em cada época de aplicação, foi de 1 mL por planta. A parcela experimental foi constituída por quatro plantas por vaso. Por meio do método da proveta, foi obtida a densidade do solo (1.16 kg/dm³), que permitiu definir o volume de solo adicionado aos vasos. Após 15 dias da emergência das plantas foi feito o desbaste, deixando quatro plantas por vaso. A irrigação foi controlada a partir da capacidade de campo do solo, verificada a cada cinco dias, por meio da massa de cada vaso, irrigando, em média, 200 mL de água/vaso/dia. Foi realizado um corte aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto, a uma altura de 3 cm do solo, com auxílio de uma tesoura. O experimento foi conduzido durante 150 dias, tomando-se medidas semanais de altura de planta e diâmetro do colmo.

2.2 Caracterização química do solo

O solo utilizado foi representativo de uma situação de pastagem degradada da região de Alegre-ES. O solo foi seco ao ar e peneirado em peneira com malha de 2.0 mm para obtenção da terra fina seca ao ar (TFSA). Para caracterização química do solo (Tabela 1), foram realizadas as seguintes análises: pH em água e em KCl 1 mol L⁻¹, em suspensão solo: líquido 1:2:5; Al, Ca, Mg e Na trocáveis, extraídos com KCl 1 mol L⁻¹, na proporção 1:10, sendo Al determinado por titulação com NaOH 0,025 mol L⁻¹, Ca e Mg por espectrometria de absorção atômica (EAA) e Na por fotometria de chama; K e P disponíveis por extração com Mehlich (HCl 0,05 mol L⁻¹ + H₂SO₄ 0,0125 mol L⁻¹), na

proporção 1:10, dosados por fotometria de chama e colorimetria, respectivamente; H+Al utilizando $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, ajustado pH 7,0 na proporção 1:15, titulado com NaOH $0,0606 \text{ mol L}^{-1}$, conforme EMBRAPA (1997).

Tabela 1: Atributos químicos e físicos do solo utilizado no experimento

pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	T	V	m	MO	
H ₂ O	--(mg dm ⁻³ --		----- (cmol _c dm ⁻³)-----							----- (%)-----		
4,86	1,75	37	0,23	1,19	0,6	4,04	0,57	4,61	12,38	51,23	1,98	
Ds	Dp		Areia			Silte			Argila			
----- (kg dm ⁻³)-----	----- (kg dm ⁻³)-----		----- (%)-----			----- (%)-----			----- (%)-----			
1.16	2.33		48			5			47			

pH em água: potenciometria em solução solo-água 1:2,5; fósforo disponível: extraído por Mehlich⁻¹ + espectroscopia); alumínio extraível: determinado por titulação com NaOH 0.025 mol L^{-1} , usando-se azul de bromotimol como indicador; cálcio e magnésio: extraídos com solução de KCl 1 mol L^{-1} e determinados por espectrofotometria de absorção atômica; potássio e sódio trocáveis: extraídos pelo extrator Mehlich⁻¹ e determinados por fotometria de chama; SB = Ca + Mg + K + Na; CTC = SB + (H + Al); V% = SN x 100/CTC; MO: teor de C do solo x 1,724. Ds: método da proveta; Dp: método do balão volumétrico: teores de areia, silte e argila: análise granulométrica.

2.3 Obtenção do óleo essencial de Eucalipto

O OEE foi adquirido comercialmente do revendedor BioEssência (Fonte: <http://loja.bioessencia.com.br/index.html>), com garantias de que o OE distribuído é 100% puro, sem modificações ou adições, extraído de todas as partes das folhas de *Eucalyptus globulus* por destilação a vapor.

2.4 Atributos Morfológicos, Fisiológicos e Análise Nutricional

Aos 45 e 150 dias foram analisadas medidas de trocas gasosas, fluorescência e conteúdo de clorofila, produção de massas fresca e seca da parte aérea. Aos 150 dias foi avaliada a produção de matéria fresca e seca da raiz. A parte aérea e a raiz foram coletadas, armazenadas em sacos de papel e colocadas em estufa a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 72 horas (até atingir peso constante) para determinação da massa seca. Após a secagem em estufa, as amostras foram submetidas à trituração em moinho de facas para posterior determinação dos teores de C e dos macronutrientes N, P, K, Ca e Mg.

2.4.1 Trocas gasosas

A análise das trocas gasosas foi realizada nas folhas individuais do 2º par de folhas totalmente expandidas, em uma planta de cada um dos quatro vasos, em cada tratamento, entre 8 horas e 11 horas da manhã, por meio do analisador a gás infravermelho portátil (IRGA), modelo Li 6300 XT (LI-COR, Lincoln, NE, USA), utilizando uma fonte luminosa fixa em $1000 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidade de fluxo de fótons fotossintéticos.

2.4.2 Teor de clorofila

A estimativa do teor de clorofila foi realizada nas folhas individuais do 2º par de folhas totalmente expandidas, em uma planta de cada um dos quatro vasos, em cada tratamento, por meio do clorofilômetro digital (FALKER). Foi feita uma medição por folha, na mesma folha onde foram realizadas as medições das taxas gasosas, entre 8 horas e 40 minutos e 11 horas da manhã, para todos os tratamentos.

2.4.3 Análise Nutricional e Determinação de Carbono

O C foi determinado a partir do método de Walkley-Black, adaptado por Yeomans & Bremner (1988). Para análise química do N foliar foi realizada digestão sulfúrica seguida de destilação Kjeldahl, de acordo com Embrapa (2000). Para análise química foliar de P, K, Ca e Mg foi realizada digestão nítrica. A leitura do P foi realizada por espectrofotômetro a 725 nm; K por fotômetro de chama e as leituras de Ca e Mg por espectroscopia de absorção atômica, de acordo com Johnson e Ulrich, (1959) e Malavolta et al. (1997).

2.4.4 Análises estatísticas

A análise de variância foi realizada por meio do teste F. E para a fonte de variação concentrações de SH aplicou-se também o teste de regressão com o auxílio dos softwares STATISTICA (2007) e Statistical Analysis System (SAS®, 2004).

3 RESULTADOS

3.1 Capim marandu

3.1.1 Atributos Morfológicos

As Figuras 1 e 2 apresentam, respectivamente, os valores de produção de massa seca da parte aérea e altura de plantas de Capim Marandu aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto (OEE) (momento do primeiro corte) e aos 150 dias (momento do segundo corte). Observa-se que os atributos avaliados não foram influenciados pelas diferentes concentrações de OEE. Entretanto, ocorreu maior produção de massa seca da parte aérea no momento do segundo corte (Figura 1) e maior altura de plantas no momento do primeiro corte (Figura 2).

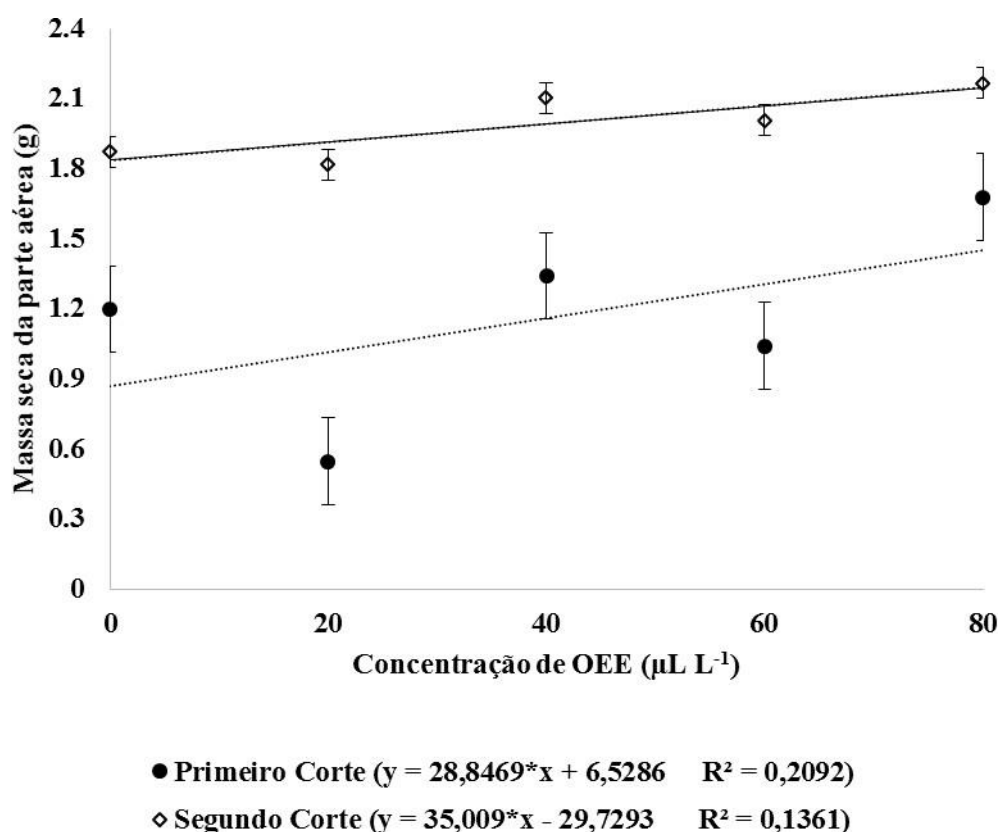


Figura 1. Produção de massa seca da parte aérea de plantas de Capim Marandu aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto (primeiro corte) e aos 150 dias (segundo corte), tratadas com as concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 µL L⁻¹ de OEE.

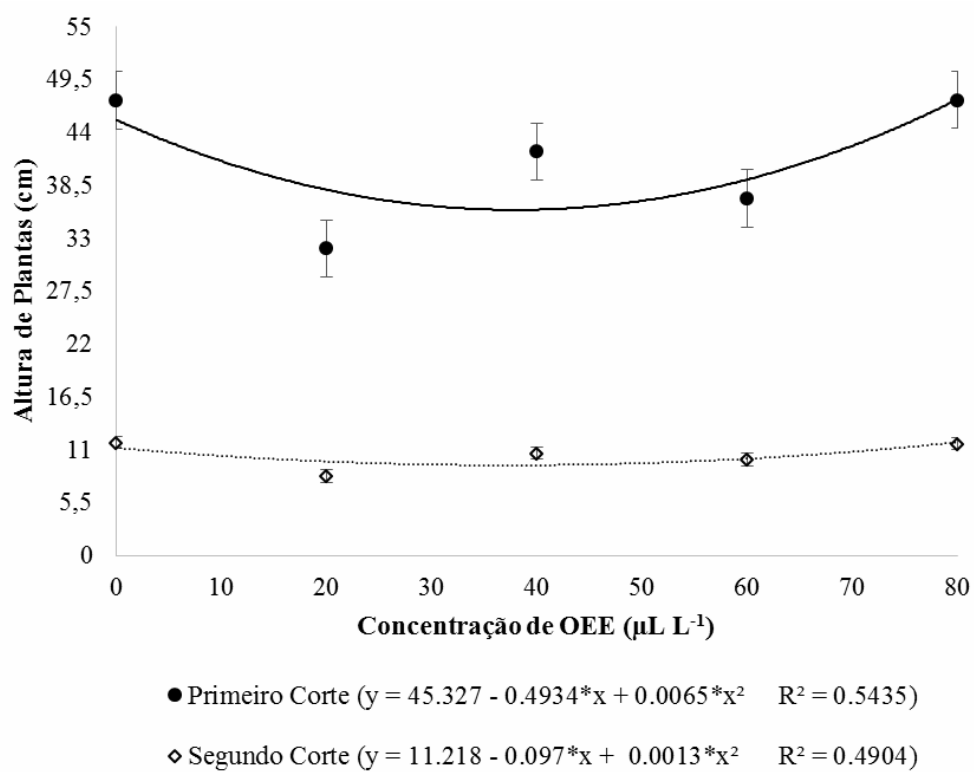


Figura 2. Altura de plantas de Capim Marandu aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto (primeiro corte) e aos 150 dias (segundo corte), tratadas com as concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE.

Observa-se na Figura 3 os valores médios do diâmetro do colmo de plantas de Capim Marandu no momento do primeiro corte. Não foram realizadas medidas de diâmetro do colmo no momento do segundo corte.

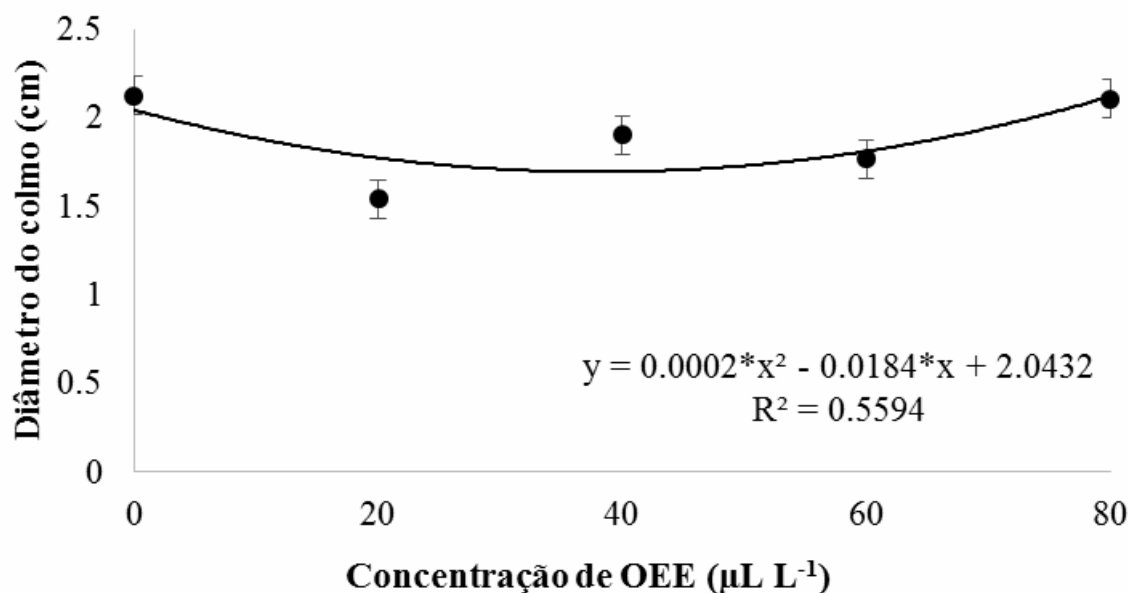


Figura 3. Diâmetro do colmo de plantas de Capim Marandu aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto (momento do primeiro corte) e aos 150 dias (momento do segundo corte), tratadas com as concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 µL L⁻¹ de OEE.

As concentrações de óleo essencial de eucalipto não refletiram em diferenças significativas para o número de perfilhos no momento do primeiro e segundo cortes, impossibilitando o ajuste de modelos de regressão (Figura 4). Observa-se na Figura 5 que a concentração de 60 µL L⁻¹ refletiu em menor produção de massa seca raiz.

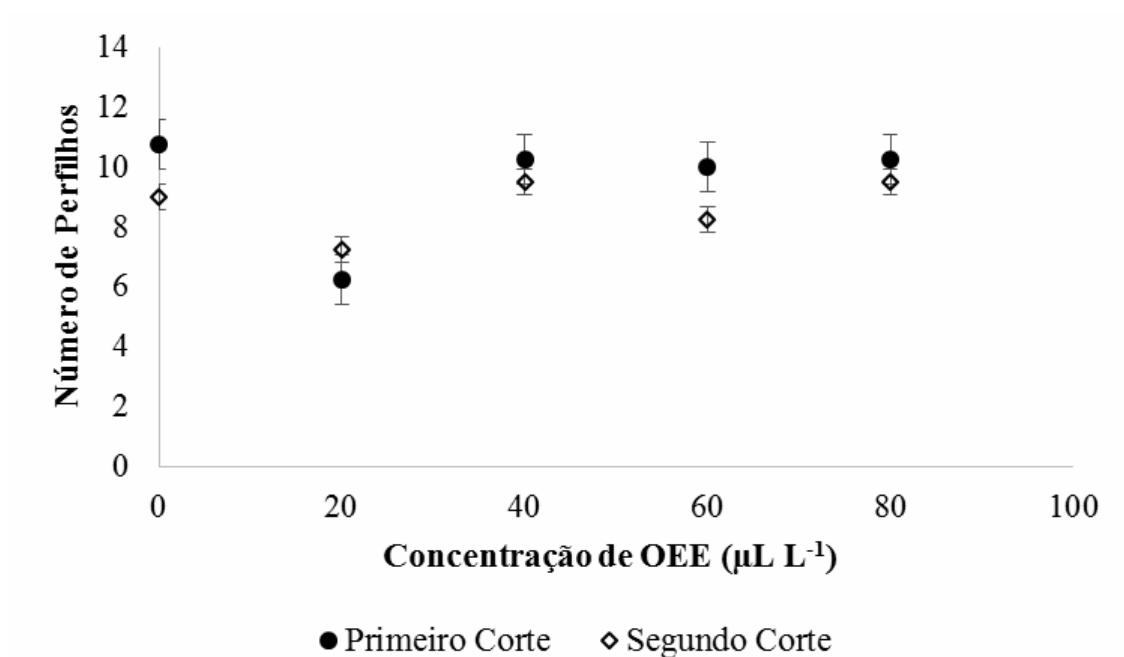


Figura 4. Número de perfilhos de plantas de Capim Marandu aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto (momento do primeiro corte) e aos 150 dias (momento do segundo corte), tratadas com as concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 µL L⁻¹ de OEE.

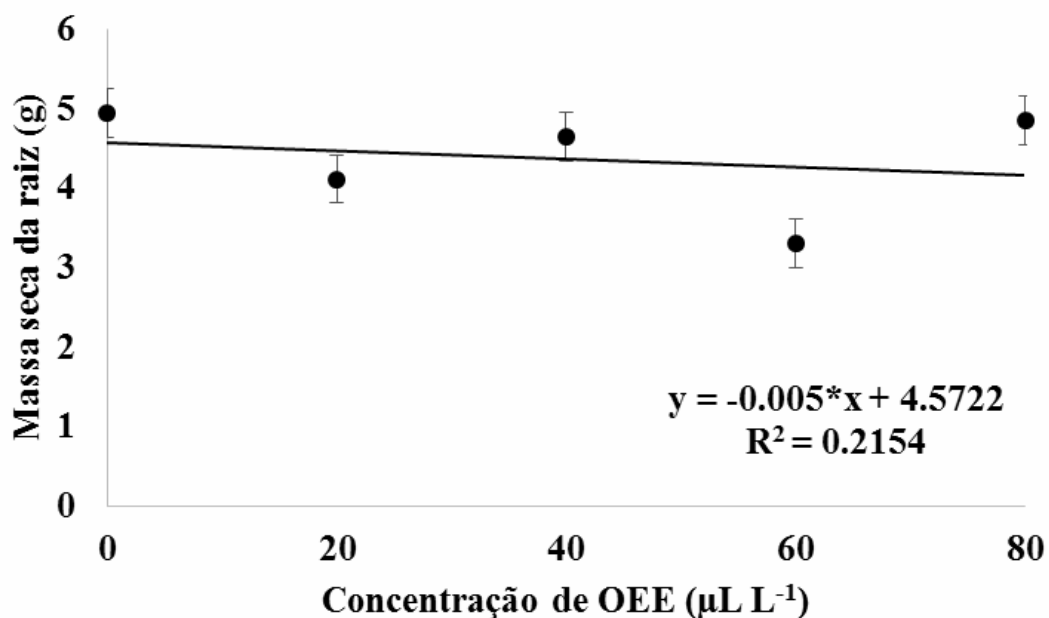


Figura 5. Produção de massa seca da raiz de plantas de Capim Marandu aos 150 dias (momento do segundo corte), tratadas com as concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 µL L⁻¹ de OEE.

3.1.2 Análise nutricional foliar

Na Tabela 2 são apresentados os valores de F obtidos na análise de variância dos teores de macronutrientes N, P, Ca e Mg na parte aérea de Capim Marandu, nos momentos do primeiro e segundo cortes. Ocorreu diferença significativa para os teores foliares de N e K no momento do primeiro corte e de N, Ca e Mg no momento do segundo corte.

Tabela 2. Valores de F, nível de significância e teores médios de macronutrientes da parte aérea de Capim Marandu, para as concentrações 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de eucalipto (OEE), no momento do primeiro e segundo cortes

PRIMEIRO CORTE					
OEE ($\mu\text{L L}^{-1}$)	N	P	K	Ca	Mg
	-----(g kg^{-1})-----				
0	13.800*	0.066 ^{ns}	26.580*	1.460 ^{ns}	1.000 ^{ns}
20	32.200*	0.073 ^{ns}	23.920*	1.350 ^{ns}	1.030 ^{ns}
40	26.320*	0.075 ^{ns}	22.830*	1.360 ^{ns}	1.050 ^{ns}
60	35.840*	0.069 ^{ns}	18.670*	1.550 ^{ns}	1.110 ^{ns}
80	20.880*	0.070 ^{ns}	23.670*	1.080 ^{ns}	0.980 ^{ns}
Valor F	13,420	2,540	4,480	4,420	0,920
SEGUNDO CORTE					
OEE ($\mu\text{L L}^{-1}$)	N	P	K	Ca	Mg
	-----(g kg^{-1})-----				
0	7.840*	0.015 ^{ns}	5.371 ^{ns}	0.657*	0.899
20	11.572*	0.015 ^{ns}	6.358 ^{ns}	0.440*	0.573
40	8.587*	0.01 ^{ns}	5.617 ^{ns}	0.525*	0.834
60	12.880*	0.015 ^{ns}	4.76 ^{ns}	0.409*	0.783
80	6.720*	0.014 ^{ns}	5.32 ^{ns}	0.384*	0.919
Valor F	4,34	2,77	1,66	5,25	2,13

*significativo a 5%; ns = não significativo.

A Figura 6 apresenta o conteúdo foliar de macronutrientes em plantas de Capim Marandu no momento do primeiro e segundo cortes. No primeiro corte ocorreu aumento no conteúdo de N (Figura 7A) a partir da concentração de 40 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE e no segundo corte, a partir da concentração de 60 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE. A concentração de 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE resultou em maiores conteúdos de P, K e Mg (Figuras 5B, 5C e 5E, respectivamente). Não ocorreram diferenças significativas para o conteúdo de P, K e Mg no momento do segundo corte, impossibilitando o ajuste de modelos de regressão.

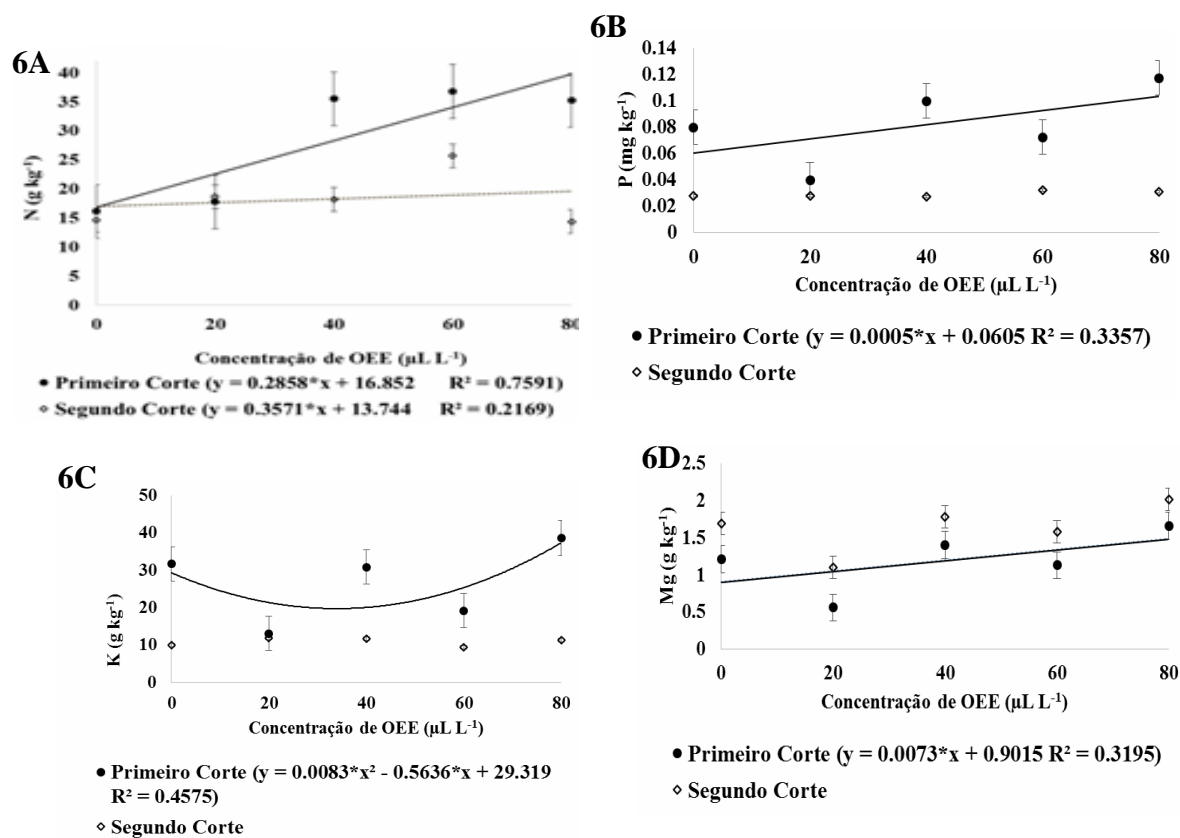


Figura 6. Conteúdo foliar de N, P, K e Mg (A, B, C, D e E, respectivamente), em plantas de Capim Marandu, aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto (momento do primeiro corte) e aos 150 dias (momento do segundo corte), tratadas com as concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE.

3.1.3 Trocas gasosas e teor de clorofila

Entre os parâmetros fotossintéticos analisados (Tabela 3), ocorreu diferença significativa para a taxa fotossintética no momento do primeiro corte. No momento do segundo corte não ocorreram diferenças significativas para os parâmetros avaliados, impossibilitando o ajuste no modelo de regressão.

Tabela 3. Valores médios dos parâmetros fotossintéticos da parte aérea de Capim Marandu em função de concentrações de óleo essencial de eucalipto (OEE), no momento do primeiro e segundo cortes.

PRIMEIRO CORTE						
OEE	Taxa Fotossintética	Transpiração	Gs	Ci	Fm	Clorofila
($\mu\text{L L}^{-1}$)	-----($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)-----		-----($\mu\text{L L}^{-1}$)-----			
0	16.800*	1.530 ^{ns}	0.080 ^{ns}	122.26 ^{ns}	429.02 ^{ns}	32.220 ^{ns}
20	12.950*	1.500 ^{ns}	0.080 ^{ns}	134.00 ^{ns}	452.28 ^{ns}	23.480 ^{ns}
40	13.710*	1.620 ^{ns}	0.080 ^{ns}	98.62 ^{ns}	449.55 ^{ns}	27.830 ^{ns}
60	10.360*	1.010 ^{ns}	0.050 ^{ns}	85.72 ^{ns}	376.43 ^{ns}	31.090 ^{ns}
80	14.260*	1.580 ^{ns}	0.080 ^{ns}	104.61 ^{ns}	501.29 ^{ns}	33.320 ^{ns}
Valor F	4,457	3,885	2,999	2,948	1,412	1,792
SEGUNDO CORTE						
OEE	Taxa Fotossintética	Transpiração	Gs	Ci	Fm	
($\mu\text{L L}^{-1}$)	-----($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)-----		-----($\mu\text{L L}^{-1}$)-----			
0	35,540 ^{ns}	2,064 ^{ns}	0,158 ^{ns}	725,87 ^{ns}	403,25 ^{ns}	
20	36,280 ^{ns}	0,864 ^{ns}	0,128 ^{ns}	820,92 ^{ns}	375,15 ^{ns}	
40	35,730 ^{ns}	2,069 ^{ns}	0,149 ^{ns}	743,81 ^{ns}	402,87 ^{ns}	
60	34,600 ^{ns}	0,566 ^{ns}	0,170 ^{ns}	678,17 ^{ns}	562,85 ^{ns}	
80	35,610 ^{ns}	1,012 ^{ns}	0,141 ^{ns}	770,10 ^{ns}	406,47 ^{ns}	
Valor F	0,920	1,240	1,447	1,475	1,080	

Gs: condutância estomática; Ci: concentração de CO₂ interno; Fm: fluorescência máxima da clorofila.

*significativo a 5%; ns = não significativo.

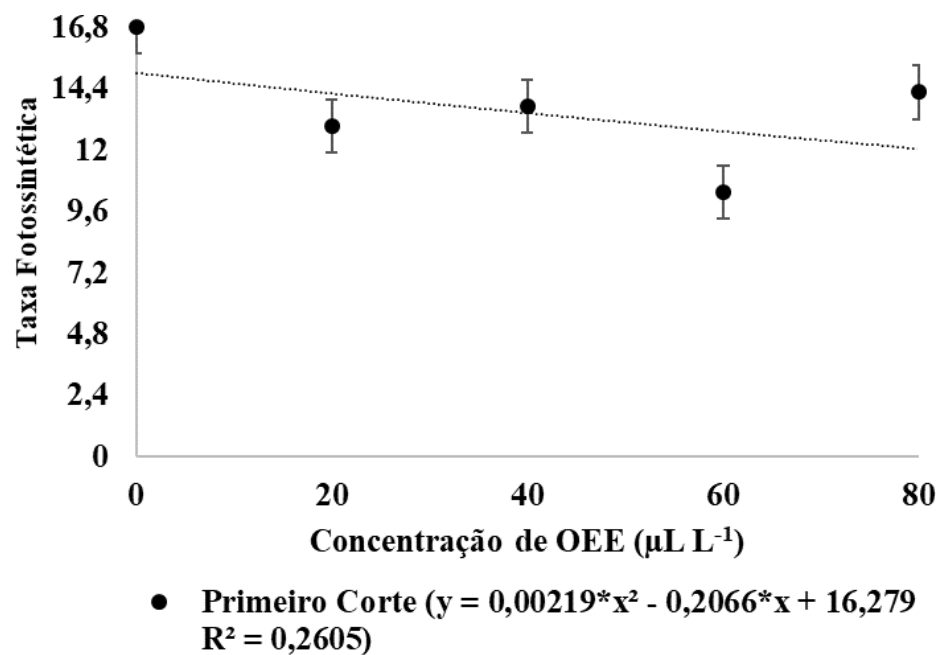


Figura 7. Taxa Fotossintética em plantas de Capim Marandu, aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto (momento do primeiro corte), tratadas com as concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE.

3.2 Estilosantes cv. Campo Grande

3.2.1 Atributos Morfológicos

No momento do primeiro e segundo cortes, ocorreram diferenças significativas para a produção de massa seca da parte aérea (MSPA) das plantas de estilosantes cv. Campo Grande. A concentração de 40 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE proporcionou aumento na produção de MSPA no primeiro corte e, no segundo corte, esse aumento ocorreu a partir da concentração de 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE. A maior produção de MSPA ocorreu no momento do segundo corte (Figura 8A). As concentrações de óleo essencial de eucalipto não proporcionaram diferenças significativas para altura de plantas de estilosantes cv. Campo Grande no primeiro e segundo cortes (Figura 8B), impossibilitando o ajuste de modelos de regressão.

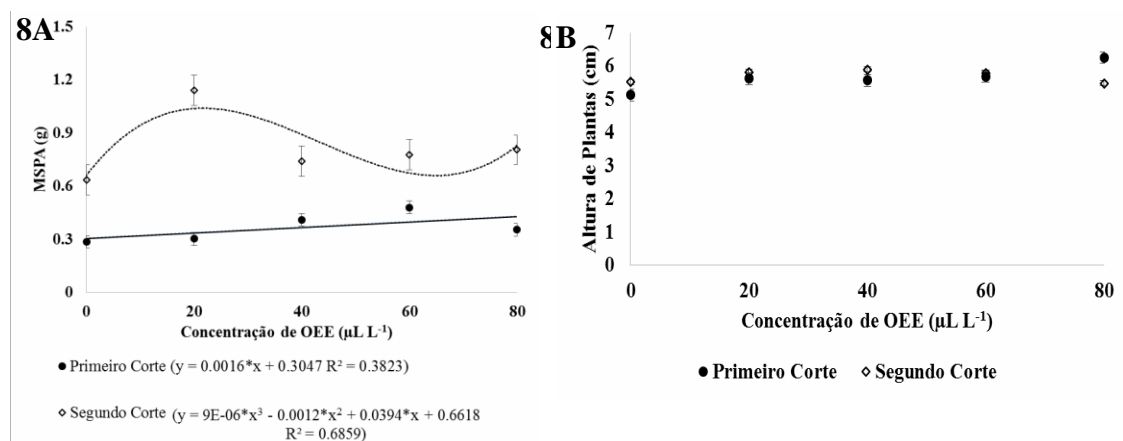


Figura 8. Produção de massa seca da parte aérea (MSPA) e altura de plantas de estilosantes cv. Campo Grande (A e B, respectivamente) aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto (momento do primeiro corte) e aos 150 dias (momento do segundo corte), tratadas com as concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE.

3.2.2 Análise nutricional foliar

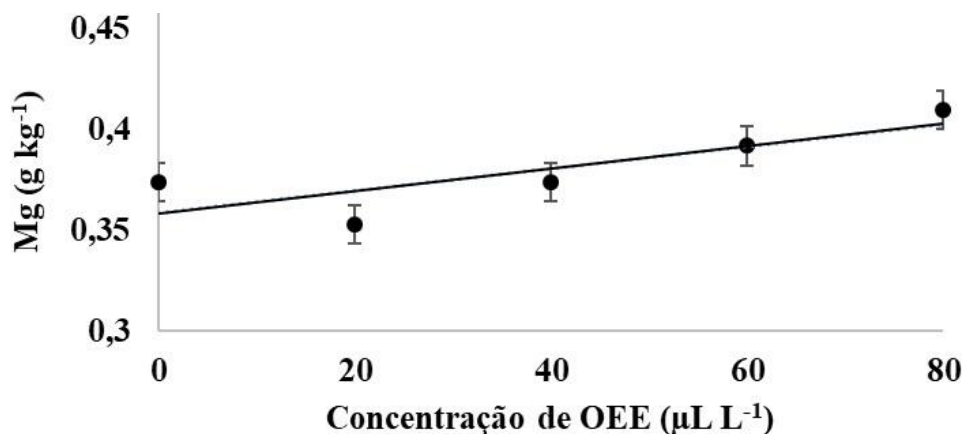
A Tabela 4 apresenta os teores médios de C e dos macronutrientes N, P, K, Ca e Mg na parte aérea de estilosantes cv. Campo Grande nos momentos do primeiro e segundo cortes. Ocorreram diferenças significativas para os teores de Mg no momento do primeiro corte. Para os demais teores não ocorreram diferenças significativas, impossibilitando o ajuste de modelos de regressão.

Tabela 4. Teores médios C e macronutrientes da parte aérea de estilosantes cv. Campo Grande, para as concentrações 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de eucalipto (OEE), no momento do primeiro e segundo cortes

PRIMEIRO CORTE						
OEE ($\mu\text{L L}^{-1}$)	N	P	K	Ca	Mg	C (%)
	-----(g kg^{-1})-----					
0	41.51 ns	0.0029 ns	6.817 ns	1.408 ns	0.374*	41.82 ns
20	41.72 ns	0.0028 ns	6.950 ns	1.612 ns	0.353*	34.07 ns
40	44.52 ns	0.0034 ns	6.817 ns	1.458 ns	0.374*	40.12 ns
60	45.08 ns	0.0033 ns	7.121 ns	1.674 ns	0.392*	32.23 ns
80	45.08 ns	0.0031 ns	6.863 ns	1.494 ns	0.408*	30.14 ns
Valor F	0,551	2,479	0,249	0,723	3,687	1,398
SEGUNDO CORTE						
OEE ($\mu\text{L L}^{-1}$)	N	P	K	Ca	Mg	C (%)
	-----(g kg^{-1})-----					
0	27.35 ns	0.015 ns	3.533 ns	0.938 ns	0.328 ns	47.428 ns
20	24.13 ns	0.015 ns	3.542 ns	0.965 ns	0.325 ns	50.034 ns
40	25.67 ns	0.014 ns	4.300 ns	0.858 ns	0.311 ns	53.976 ns
60	25.95 ns	0.014 ns	4.104 ns	0.970 ns	0.408 ns	50.101 ns
80	24.41 ns	0.014 ns	3.667 ns	0.965 ns	0.400 ns	53.709 ns
Valor F	1,990	2,822	2,896	0,391	1,218	0,339

*significativo a 5%; ns = não significativo.

Observa-se na Figura 9 a ocorrência do acréscimo no teor de Mg com o incremento das concentrações de OEE. A concentração de 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de óleo essencial de eucalipto proporcionou maior incremento no teor de Mg na parte aérea de estilosante cv. Campo Grande.

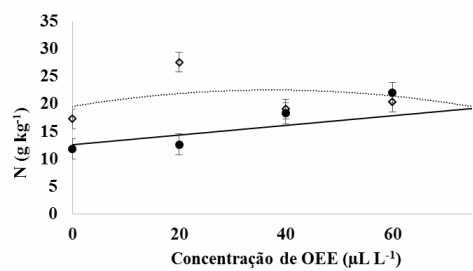


- Primeiro Corte ($y = 0,3584 + 0,0006 * x$ $R^2 = 0,6685$)

Figura 9. Teor de Mg da parte aérea de plantas de estilosantes cv. Campo Grande aos 45 dias após a última aplicação de OEE (momento do primeiro corte), tratadas com as concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE.

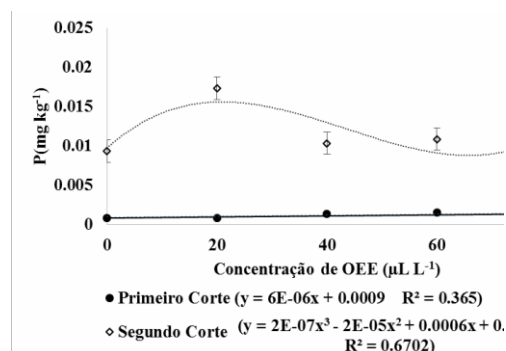
Ocorreu diferença significativa para o conteúdo de N, P, K e Mg no momento do primeiro corte. A concentração de 60 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE resultou em plantas de estilosantes cv. Campo Grande com maior acúmulo de macronutrientes (Figura 10). No momento do segundo corte ocorreram diferenças significativas para N e P, sendo a concentração de 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE a que proporcionou maior acúmulo desses macronutrientes na parte aérea de plantas de estilosantes cv. Campo Grande. Não ocorreram diferenças significativas para Ca no primeiro e segundo cortes, impossibilitando o ajuste no modelo de regressão.

10A



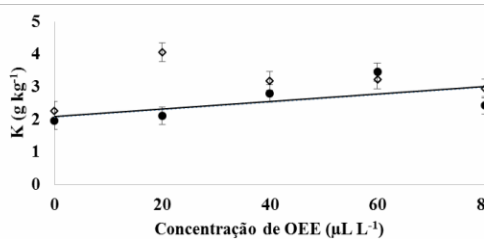
- Primeiro Corte ($y = 0.0883*x + 12.591$ $R^2 = 0.4441$)
- ◇ Segundo Corte ($y = -0.0021*x^2 + 0.159*x + 19.53$ $R^2 = 0.25$)

10B



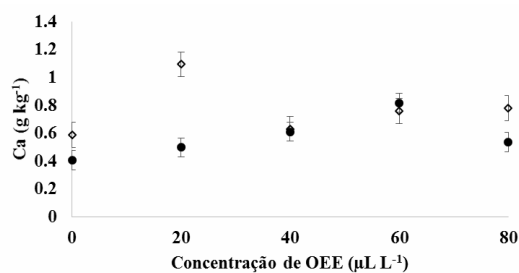
- Primeiro Corte ($y = 6E-06x + 0.0009$ $R^2 = 0.365$)
- ◇ Segundo Corte ($y = 2E-07x^3 - 2E-05x^2 + 0.0006x + 0.0009$ $R^2 = 0.6702$)

10C



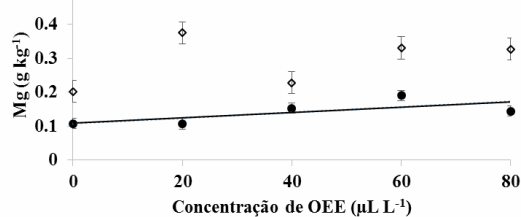
- Primeiro Corte ($y = 0.0115*x + 2.0849$ $R^2 = 0.3659$)
- ◇ Segundo Corte

10D



- Primeiro Corte
- ◇ Segundo Corte

10E



- Primeiro Corte ($y = 0.0008*x + 0.1092$ $R^2 = 0.5082$)
- ◇ Segundo Corte

Figura 10. Conteúdo de N, P, K, Ca e Mg (A, B, C, D e E, respectivamente) em plantas de estilosantes cv. Campo Grande no momento do primeiro corte, tratadas com concentrações 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE.

3.2.3 Atributos Fisiológicos

Ocorreu diferença significativa para a taxa fotossintética no momento do primeiro corte. No momento do segundo corte não ocorreram diferenças significativas para os parâmetros avaliados, impossibilitando o ajuste no modelo de regressão (Tabela 5).

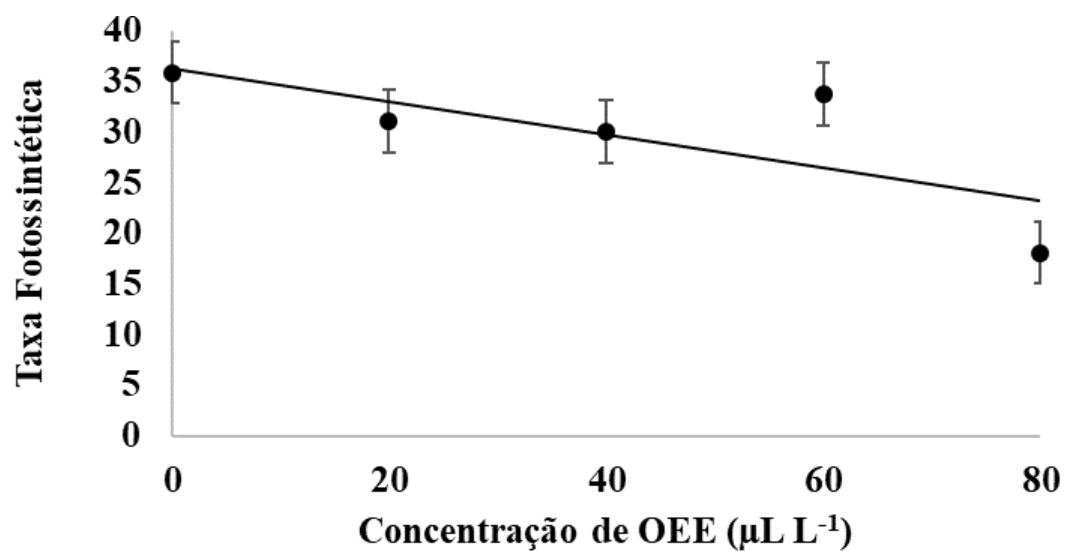
Tabela 5 Valores médios dos parâmetros fotossintéticos da parte aérea de estilosantes cv. Campo Grande em função de concentrações de óleo essência de eucalipto (OEE), no momento do primeiro e segundo cortes.

PRIMEIRO CORTE						
OEE	Taxa Fotossintética	Transpiração	Gs	Ci	Fm	Clorofila
($\mu\text{L L}^{-1}$)	-----($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)-----		-----($\mu\text{L L}^{-1}$)----			
0	35.90*	9.35 ^{ns}	0.55 ^{ns}	270.36 ^{ns}	761.41 ^{ns}	47.37 ^{ns}
20	31.05*	9.49 ^{ns}	0.62 ^{ns}	296.22 ^{ns}	668.20 ^{ns}	42.96 ^{ns}
40	30.06*	9.01 ^{ns}	0.58 ^{ns}	289.99 ^{ns}	811.01 ^{ns}	50.19 ^{ns}
60	33.72*	9.35 ^{ns}	0.61 ^{ns}	280.73 ^{ns}	776.71 ^{ns}	46.11 ^{ns}
80	18.10*	6.92 ^{ns}	0.39 ^{ns}	307.98 ^{ns}	609.90 ^{ns}	46.75 ^{ns}
Valor F	3,534	1,304	1,205	1,469	1,524	2,141
SEGUNDO CORTE						
OEE	Taxa Fotossintética	Transpiração	Gs	Ci	Fm	
($\mu\text{L L}^{-1}$)	-----($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)-----		-----($\mu\text{L L}^{-1}$)----			
0	35,55 ^{ns}	0,0036 ^{ns}	725,89 ^{ns}	725,89 ^{ns}	301,23 ^{ns}	
20	36,28 ^{ns}	0,0030 ^{ns}	820,92 ^{ns}	820,92 ^{ns}	264,99 ^{ns}	
40	35,81 ^{ns}	0,0036 ^{ns}	732,87 ^{ns}	732,87 ^{ns}	330,49 ^{ns}	
60	34,85 ^{ns}	0,0037 ^{ns}	711,75 ^{ns}	711,75 ^{ns}	160,51 ^{ns}	
80	35,59 ^{ns}	0,0033 ^{ns}	770,15 ^{ns}	770,15 ^{ns}	218,17 ^{ns}	
Valor F	0,92	1,189	1,447	1,475	1,839	

Gs: condutância estomática; Ci: concentração de CO₂ interno; Fm: fluorescência máxima da clorofila.

*significativo a 5%; ns = não significativo.

Os valores da taxa fotossintética em plantas de estilosantes cv. Campo Grande ajustaram-se ao modelo de regressão linear (Figura 11). Observa-se que a concentração de 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE proporcionou menor valor na taxa fotossintética.



- Primeiro Corte ($y = 36,352 - 0,1647 * x$ $R^2 = 0,2350$)

Figura 11. Taxa Fotossintética em plantas de estilosantes cv. Campo Grande, aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto (momento do primeiro corte), tratadas com as concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 µL L⁻¹ de OEE.

4 DISCUSSÃO

4.1 Capim Marandu

No momento do primeiro corte das plantas de Capim Marandu, a produção de MSPA e a altura de plantas (Figuras 1 e 2, respectivamente), que são consideradas os parâmetros mais importantes em estudos relacionados à eficiência de tratamentos sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal (Souza, 2003), não foram influenciadas pelas diferentes concentrações de OEE, entretanto, ocorreu maior produção de MSPA no momento do segundo corte (Figura 1) e maior altura de plantas no momento do primeiro corte (Figura 2). De acordo com Gomide (1997), em solos de baixa fertilidade, a cultura desenvolve pouca área foliar e, portanto, menos biomassa.

A concentração de $60 \mu\text{L L}^{-1}$ de OEE resultou em um menor incremento de massa seca da raiz (MSR) em relação às demais concentrações (Figura 5). Esses resultados diferem dos encontrados por Steffen et al. (2010), os quais verificaram que as concentrações de 50 e $60 \mu\text{L L}^{-1}$ proporcionaram um estímulo ao crescimento radicular em profundidade. Após o segundo corte, plantas de Capim Marandu apresentaram crescimento inferior ao primeiro corte (Figura 2), evidenciando que a época influenciou na altura de plantas. Segundo Santos Jr. et al. (2004), a capacidade de reconstituição de nova área foliar está individualmente associada às condições ambientais, como temperatura, luminosidade, umidade e fertilidade do solo. Embora a utilização do óleo essencial de plantas de eucalipto possa causar alelopatia a determinadas espécies vegetais (Cruz et al., 2000; Ferreira & Aquila, 2000; Goetze & Thomé, 2004), dependendo da concentração de determinados compostos, existe a possibilidade de ocorrer relações de sinergismo, proporcionando a indução do crescimento de microrganismos ou plantas (Blum, 1999; Mairesse, 2005).

O efeito da aplicação do OEE via parte aérea das plantas de braquiária pode ter ocorrido por meio da ação reguladora do crescimento, resultando em mudanças enzimáticas nas plantas ou alterações fisiológicas ocorridas nas raízes, o que explicaria o maior crescimento das plantas submetidas a determinadas concentrações do óleo. Outra possibilidade poderia estar relacionada aos efeitos indiretos do óleo essencial sobre organismos ou microrganismos que possam alterar o desenvolvimento vegetal (Brimecombe et al., 2001; Bittner et al., 2009).

Ocorreram diferenças significativas para os teores de N e K no momento do primeiro corte e para os teores de N e Ca no momento do segundo corte (Tabela 2). Os

teores médios de N e K, no momento do primeiro corte, encontram-se na faixa de teores adequados de macronutrientes em Capim Marandu, entre 13 a 20 g kg⁻¹ para N e 12 a 30 g kg⁻¹ para K (Silva, 2009). Os demais macronutrientes não se encontram na faixa de teores adequados, devido ao fato de o solo não ter sido adubado e corrigida a sua acidez, solo representativo de uma pastagem degradada. A Figura 6 mostra que nas concentrações 40, 60 e 80 µL L⁻¹ de OEE foram obtidos os conteúdos médios de N de 31.46, 32.62 e g kg⁻¹, respectivamente, estatisticamente superiores às demais concentrações de OEE. A concentração de 80 µL L⁻¹ de OEE correspondeu a um aumento no conteúdo de N de 118 % em relação à concentração zero, o que demonstra que o OEE auxiliou na absorção de N. Os maiores acúmulos, no primeiro e segundo cortes, foram do N e K, sendo o P e Mg os nutrientes que apresentaram os menores acúmulos na parte aérea de Capim Marandu. Braz et al. (2004) verificaram nas espécies milheto (*Pennisetum glaucum*), capim braquiária (*Brachiaria brizantha*) e Mombaça (*Panicum maximum*) o acúmulo dos nutrientes N, P, Ca, P e Mg nas folhas em função dos dias após a emergência da planta. Para o capim Mombaça os acúmulos máximos também foram de N e K. Cunha et al. (2012) encontraram valores de 24 g kg⁻¹ para N, sendo esse o nutriente que também apresentou maior acúmulo na parte aérea de Capim-Limão.

Segundo Parrado et. al. (2007), o uso de óleos essenciais aumenta a atividade da ATPase, proteínas integrais de membrana que utilizam a energia liberada na hidrólise do ATP para bombear prótons ativamente para o apoplasto ou para o vacúolo, de modo a controlar o pH citossólico, criando um gradiente eletroquímico, importante para a captação de nutrientes (Dufuor & Goffeau, 1980).

Para os parâmetros fotossintéticos, o maior estímulo do OEE ocorreu para a taxa fotossintética líquida no momento do primeiro corte (Figura 7), apresentando diferenças significativas, sendo que a concentração de 60 µL L⁻¹ de OEE correspondeu a um decréscimo na taxa fotossintética. Esse resultado pode ser explicado pela baixa luminosidade na casa de vegetação. Segundo Jefferies (1965), plantas sob luminosidade reduzida têm desenvolvimento mais lento e menor perda de água pelos seus tecidos.

4.2 Estilosantes cv. Campo Grande

A produção de MSPA de plantas de Estilosantes cv. Campo Grande apresentou diferenças significativas no momento do primeiro e segundo cortes (Figura 8A). A produção de MSPA foi superior no segundo corte em relação ao primeiro, demonstrando a participação do OEE na rebrota de Estilosantes cv. Campo Grande. Isso evidencia que a aplicação de OEE influencia na rebrota da planta, o que é muito importante, pois aumenta a produção de forragem para alimentação animal. A concentração de 60 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE resultou em uma maior produção de MSPA no momento do primeiro corte. No segundo corte, ocorreu uma maior produção de MSPA de Estilosantes cv. Campo Grande na concentração de 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE, isso pode estar relacionado a um incremento na absorção de macro e micronutrientes (Sondergaard et al., 2004). Segundo Mairesse (2005), alguns compostos vegetais, quando utilizados em concentrações extremamente reduzidas, apresentam efeito Hormese, que se caracteriza pela indução de determinadas características provocada pela utilização de baixas concentrações de compostos considerados tóxicos.

A análise nutricional demonstrou diferença significativa quanto ao teor de nutrientes para o Mg, no momento do primeiro corte (Tabela 4). Ocorreu o acréscimo no teor de Mg com o incremento das concentrações de OEE. A concentração de 80 $\mu\text{L L}^{-1}$ de OEE proporcionou maior incremento no teor de Mg na parte aérea de estilosante cv. Campo Grande. Os valores médios dos teores de N, no momento do primeiro e segundo cortes, encontram-se dentro da faixa de teores adequados de macronutrientes em leguminosas forrageiras, entre 20 a 40 g kg^{-1} (Silva, 2009). As leguminosas são capazes de realizar a fixação biológica de N, por meio da simbiose com as bactérias do gênero *Rhizobium*, representando uma importante fonte desse nutriente para o solo e para a recuperação de pastagens degradadas (Lopes et. al., 2011). Assim como para a braquiária, o solo não recebeu adubação e correção da acidez, resultando em teores inadequados de P, K e Mg para leguminosas forrageiras.

Ocorreram diferenças significativas para os conteúdos foliares de N, P, K e Mg no momento do primeiro corte, e N e P no momento do segundo corte. É possível verificar na Figura 10 que a concentração de OEE capaz de proporcionar maior acúmulo de macronutrientes na parte aérea de estilosantes cv. Campo Grande foi 60 $\mu\text{L L}^{-1}$.

As plantas de estilosantes cv. Campo Grande não apresentaram produção de nódulos nas suas raízes, em todas as concentrações de OEE. O menor volume de raízes

produzido reduziu os sítios que poderiam ser infectados pelas bactérias do gênero *Rhizobium*. A produção de massa seca da raiz teve uma variação média de 1.30 a 1.50 g planta⁻¹, influenciando de forma negativa a produção de nódulos. A nodulação pode ser afetada por diversos fatores, entre os quais estão o baixo pH, a baixa concentração de Ca e P na solução do solo (Andrew, 1976). Além desses fatores, pode ser destacado o efeito antibacteriano dos OEE. Alguns trabalhos descrevem que os efeitos aleloquímicos dos compostos fenólicos que compõem os óleos essenciais podem assumir diferentes formas de ação sobre o desenvolvimento de organismos (Brimecombe et al., 2001), inibindo determinado organismo (Schawn-Estrada et al., 2003; Medice et al., 2007).

Para os parâmetros fotossintéticos de plantas de Estilosantes cv. Campo Grande ocorreram diferenças significativas para a taxa fotossintética líquida. A concentração de 80 µL L⁻¹ resultou em menor incremento na taxa fotossintética (Tabela 5). Ibrahim et. al., (2006) avaliaram o efeito de monoterpenos, constituintes representativos dos OE, sobre diferentes cultivares de alface e cenouras. Observaram que concentrações variando entre 60 e 90 mL L⁻¹ afetaram negativamente diferentes variáveis fisiológicas.

Segundo Taiz & Zeiger (2006), alguns componentes dos metabólitos secundários das plantas atuam no crescimento e desenvolvimento dos vegetais, o que pode explicar a resposta das plantas de Capim Marandu e Estilosantes cv. Campo Grande à aplicação destes metabólitos.

5 CONCLUSÕES

A utilização de óleo essencial de eucalipto promove maior crescimento em plantas de Capim Marandu e rebrota em plantas de Estilosantes cv. Campo Grande.

A concentração de $80 \mu\text{L L}^{-1}$ demonstrou ser eficiente para o incremento na produção de massa seca da parte aérea e acúmulo de macronutrientes em Capim Marandu.

A concentração de $60 \mu\text{L L}^{-1}$ demonstrou ser eficiente para o incremento na produção de massa seca da parte aérea de Estilosantes cv. Campo Grande.

CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DOSES DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EM ESTILOSANTES cv. CAMPO GRANDE, COM E SEM INOCULAÇÃO

RESUMO

As substâncias húmicas participam de importantes reações que ocorrem nos solos, influenciando a fertilidade por meio da liberação de nutrientes, pela detoxificação de elementos químicos, melhoria das condições físicas e biológicas do solo e por meio da produção de substâncias fisiologicamente ativas, que podem influenciar o acúmulo de nutrientes, o crescimento e metabolismo vegetal. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses de substâncias húmicas, aplicadas via foliar, no desenvolvimento e nutrição de estilosantes cv. Campo Grande, com e sem inoculação. O trabalho foi conduzido em casa de vegetação. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com esquema fatorial 5x2, correspondendo a cinco concentrações de substâncias húmicas (0, 20, 40, 60, 80 mg C L⁻¹) a duas condições de inoculação (com e sem inoculação). As substâncias húmicas foram aplicadas em dois momentos, aos 15, 30 e 45 dias após a emergência e aos 15, 30 e 45 dias após o primeiro corte. Foram semeadas dez sementes da cultivar Campo Grande, formada pelas espécies *Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala*, em vasos de 5 dm³. Após 15 dias da emergência foi feito o desbaste, deixando quatro plantas por vaso. O experimento foi conduzido durante 150 dias, tomando-se medidas semanais de altura e diâmetro do colmo. Foi realizado um corte aos 45 dias após a última aplicação de substâncias húmicas, a uma altura de 3 cm do solo. As doses foram reaplicadas aos 15, 30 e 45 dias após o corte. Aos 45 e 150 dias, foi obtida a massa seca da parte aérea e realizadas as medidas de trocas gasosas, teor de clorofila e análise nutricional. Aos 150 dias foi avaliada a produção de massa seca da raiz. A concentração de 40 mg C L⁻¹ proporcionou aumento da produção de massa seca da parte aérea de estilosantes cv. Campo Grande e nodulação de raízes de plantas de estilosantes cv. C. Grande não inoculadas.

Palavras – chave: nodulação, fixação biológica de nitrogênio, massa seca

CHAPTER 2: EVALUATION OF THE EFFECT OF DOSES OF HUMIC SUBSTANCES IN ESTILOSANTES cv. CAMPO GRANDE, WITH AND WITHOUT INOCULATION

ABSTRACT

Humic substances participate in important reactions that occur in soils, influencing fertility through the release of nutrients, detoxification of chemical elements, improvement of soil physical and biological conditions and the production of physiologically active substances, which can influence the accumulation of nutrients, plant growth and metabolism. The objective of this work was to evaluate the effect of different doses of humic substances, applied through the leaf, in the development and nutrition of esilosantes cv. Campo Grande, with and without inoculation. The work was conducted in a greenhouse. The experimental design was a randomized block design with 5x2 factorial design, corresponding to five concentrations of humic substances (0, 20, 40, 60, 80 mg C L⁻¹) at two inoculation conditions (with and without inoculation). The humic substances were applied in two moments, at 15, 30 and 45 days after the emergency and at 15, 30 and 45 days after the first cut. Ten seeds of the cultivar Campo Grande, formed by *Stylosanthes capitata* and *Stylosanthes macrocephala*, were sown in 5 dm³ pots. After 15 days of emergence, thinning was done, leaving 4 plants per pot. The experiment was conducted for 150 days, taking weekly measurements of height and stem diameter. A cut was made at 45 days after the last application of humic substances at a height of 3 cm from the soil. The doses were reapplied at 15, 30 and 45 days after the cut. At 45 and 150 days, the aerial part dry mass was obtained and gas exchange, chlorophyll content and nutritional analysis were performed. At 150 days the root dry mass production was evaluated. The concentration of 40 mg C L⁻¹ resulted in an increase in the dry mass production of aerial part of cv. Campo Grande and nodulation of roots of plants of cv. Campo Grande uninoculated.

Key words: nodulation, biological nitrogen fixation, dry mass

1 INTRODUÇÃO

O uso intensivo do solo pela atividade agropecuária vem provocando a degradação desse importante recurso natural, de matas e recursos hídricos. A degradação pela exploração intensiva do solo gera graves consequências socioeconômicas, o que motiva a busca de alternativas ecológicas e ambientais para uso do solo.

Segundo Vaccaro et al., (2015), a matéria orgânica do solo tem como componente principal na sua constituição as substâncias húmicas, que podem influenciar positivamente o sistema de produção por terem uma função importante tanto no sistema solo-planta como no metabolismo, crescimento e desenvolvimento vegetal. A aplicação direta de substâncias húmicas sobre as plantas pode interferir no metabolismo vegetal devido à sua alta capacidade de troca catiônica e sua propriedade de complexar e disponibilizar cátions às plantas, principalmente micronutrientes (Caron et al., 2015), além de induzir mudanças no metabolismo do C e N, uma vez que influenciam as atividades enzimáticas associadas à glicólise, ao ciclo de Krebs, à assimilação de N, modificam o metabolismo secundário (Nardi et al., 2009), resultando em aumento do crescimento da raiz e da parte aérea (Rose et al., 2014; Sleighter et al., 2015).

As substâncias húmicas são obtidas pela extração de fontes não renováveis, tais como as turfas. Uma fonte alternativa para extração de substâncias húmicas é o húmus de minhoca (Nardi et al., 2009). Diversos resíduos orgânicos, como o esterco bovino, têm sido convertidos em vermicomposto (Kaushik e Garg, 2003), resultando em substâncias húmicas de elevada atividade biológica.

Os ácidos húmicos e fúlvicos, produtos do fracionamento das substâncias húmicas, são capazes de estimular alterações fisiológicas nas plantas, as quais podem contribuir para um melhor desenvolvimento e produtividade. O crescimento, o padrão de formação e a diferenciação dos órgãos vegetais são etapas do desenvolvimento vegetal alterados, frequentemente, pelas substâncias húmicas (Canellas et al., 2005). Essa ação estimulante é atribuída, em geral, a um efeito direto dos hormônios vegetais ou ainda no comportamento hormonal das plantas (Chen et al., 1990; Boyhan et al., 2001), em especial ao hormônio auxina, que pode ser estimulado na presença de ácidos húmicos, resultando em crescimento do sistema radicular das plantas (Trevisan et al., 2010). Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses de substâncias húmicas aplicadas via foliar no desenvolvimento e nutrição de estilosantes cv. Campo Grande.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições de cultivo e manejo

O trabalho foi conduzido no período de março a agosto, em casa de vegetação do Departamento de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo. Nesse período, a temperatura média apresentou uma média entre 20.2 e 29.8°C, com máximas variando entre 34.4 e 36°C e mínimas entre 15.6 e 18.3°C. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro repetições, no esquema fatorial 5x2x2, totalizando 80 unidades experimentais. Foram semeadas dez sementes de estilosantes cv. Campo Grande, formada pelas espécies *Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala*, em vasos de 5 dm³.

Os tratamentos consistiram em cinco concentrações de substâncias húmicas (SH), 0, 20, 40, 60, 80 mg C L⁻¹, e três épocas de aplicação: 15, 30 e 45 dias após a emergência, antes e após o primeiro corte das plantas. O volume de OEE pulverizado, em cada época de aplicação, foi de 1 mL por planta. A parcela experimental foi constituída por quatro plantas por vaso. As sementes foram inoculadas com uma estirpe de *Bradyrhizobium japonicum* (BR 446), inoculante comercial, desenvolvido pela Embrapa Agrobiologia, cedido pela Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). Por meio do método da proveta, foi obtida a densidade do solo (1.16 kg/dm³), que permitiu definir o volume de solo adicionado aos vasos. Após 15 dias da emergência das plantas foi feito o desbaste, deixando quatro plantas por vaso. A irrigação foi controlada a partir da capacidade de campo do solo, verificada a cada cinco dias, por meio da massa de cada vaso, irrigando, em média, 200 mL de água/vaso/dia. O experimento foi conduzido durante 150 dias, tomando-se medidas semanais de altura de planta e diâmetro do colmo. Foi realizado o primeiro corte aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto, a uma altura de 3 cm do solo, com auxílio de uma tesoura. As doses foram reaplicadas aos 15, 30 e 45 dias após o primeiro corte, realizando-se o segundo corte aos 150 dias de cultivo.

2.2 Caracterização química do solo

O solo utilizado foi representativo de uma situação de pastagem degradada da região de Alegre-ES. Foi seco ao ar e peneirado em peneira com malha de 2.0 mm para obtenção da terra fina seca ao ar (TFSA). Para caracterização química do solo (Tabela 1),

foram realizadas as seguintes análises: pH em água e em KCl 1 mol L⁻¹, em suspensão solo: líquido 1:2:5; Al, Ca, Mg e Na trocáveis, extraídos com KCl 1 mol L⁻¹, na proporção 1:10, sendo Al determinado por titulação com NaOH 0,025 mol L⁻¹, Ca e Mg por espectrometria de absorção atômica (EAA) e Na por fotometria de chama; K e P disponíveis por extração com Mehlich (HCl 0,05 mol L⁻¹ + H₂SO₄ 0,0125 mol L⁻¹), na proporção 1:10, dosados por fotometria de chama e colometria, respectivamente; H+Al utilizando Ca(OAc)₂ 0,5 mol L⁻¹, ajustado pH 7,0 na proporção 1:15, titulado com NaOH 0,0606 mol L⁻¹, conforme EMBRAPA (1997).

Tabela 1 – Atributos químicos e físicos do solo utilizado no experimento

pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	T	V	m	MO
H ₂ O	--(mg dm ⁻³ --		----- (cmol _c dm ⁻³)-----						----- (%)-----		
4,86	1,75	37	0,23	1,19	0,6	4,04	0,57	4,61	12,38	51,23	1,98
Ds	Dp		Areia			Silte		Argila			
	----- (kg dm ⁻³)-----		----- (%)-----								
1.16	2.33		48			5		47			

pH em água: potenciometria em solução solo-água 1:2,5; fósforo disponível: extraído por Mehlich⁻¹ + espectroscopia); alumínio extraível: determinado por titulação com NaOH 0.025 mol L⁻¹, usando-se azul de bromotimol como indicador; cálcio e magnésio: extraídos com solução de KCl 1 mol L⁻¹ e determinados por espectrofotometria de absorção atômica; potássio e sódio trocáveis: extraídos pelo extrator Mehlich⁻¹ e determinados por fotometria de chama; SB = Ca + Mg + K + Na; CTC = SB + (H + Al); V% = SN x 100/CTC; MO: teor de C do solo x 1,724. Ds: método da proveta; Dp: método do balão volumétrico; teores de areia, silte e argila: análise granulométrica.

2.3 Obtenção das substâncias húmicas

As substâncias húmicas foram isoladas de vermicomposto produzido com esterco de curral. Foram utilizados 500 g de vermicomposto e 4.5 L de água deionizada (relação vermicomposto: solvente de 1:9). O material foi agitado por um período de 6 horas, e após 12 horas de repouso o extrato solúvel foi retirado por decantação e armazenado. Foi feita a determinação dos teores de carbono (C) e nitrogênio (N) das substâncias húmicas, de modo que as concentrações de substâncias húmicas se basearam no teor de carbono.

A determinação quantitativa de C nas substâncias húmicas foi realizada segundo método de Yoemans e Bremner (1988). Alíquotas de 5 mL do extrato foram pipetadas para tubos de digestão de 100 mL, adicionados 10 mL da solução 0.033 mol L⁻¹ K₂Cr₂O₇ e 10 mL de H₂SO₄ concentrado. Foi realizada a digestão sulfúrica em bloco digestor pré-aquecido a 170 °C, por 30 minutos e titulação com a solução de sulfato ferroso amoniacal 0.03 mol L⁻¹. Para a quantificação de N, foi realizada digestão sulfúrica de 20 mL do extrato, seguida de destilação Kjeldahl, de acordo com Embrapa (2000). Os teores de C e N determinados foram de 0.096 dag kg⁻¹ e 0.0378 g kg⁻¹, respectivamente.

2.4 Atributos Morfológicos, Fisiológicos e Análise Nutricional

Aos 45 e 90 dias foram analisadas medidas de trocas gasosas, fluorescência e conteúdo de clorofila, produção de massas fresca e seca da parte aérea. Aos 90 dias foi avaliada a produção de matéria fresca e seca da raiz. A parte aérea e a raiz foram coletadas, armazenadas em sacos de papel e colocadas em estufa a 65 °C durante 72 horas (até atingir peso constante) para determinação da massa seca. Após a secagem em estufa, as amostras foram submetidas à trituração em moinho de facas para posterior determinação dos teores de carbono (C) e dos macronutrientes nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K) e cálcio (Ca).

2.4.1 Trocas gasosas

A medição das trocas gasosas foi realizada nas folhas individuais do 2º par de folhas totalmente expandidas, em uma planta de cada um dos quatro vasos, em cada tratamento, entre 8 horas e 11 horas da manhã, por meio do analisador a gás infravermelho portátil (IRGA), modelo Li 6300 XT (LI-COR, Lincoln, NE, USA), utilizando uma fonte luminosa fixa em 1000 mmol m⁻² s⁻¹ de intensidade de fluxo de fótons fotossintéticos.

2.4.2 Teor de clorofila

A estimativa do teor de clorofila foi realizada nas folhas individuais do 2º par de folhas totalmente expandidas, em uma planta de cada um dos quatro vasos, em cada tratamento, por meio do medidor portátil de clorofila (MPC), SPAD502 (Minolta, Japão), entre 8 horas e 11 horas da manhã.

2.4.3 Análise Nutricional e Determinação de Carbono

O C foi determinado a partir do método de Walkley-Black, adaptado por Yeomans & Bremner (1988). Para análise química do N foliar foi realizada digestão sulfúrica seguida de destilação Kjeldahl, de acordo com Embrapa (2000). Para análise química foliar de P, K, Ca e Mg foi realizada digestão nítrica. A leitura do P foi realizada por espectrofotômetro a 725 nm; K por fotômetro de chama e as leituras de Ca e Mg por espectroscopia de absorção atômica, de acordo com Johnson e Ulrich, (1959) e Malavolta et al. (1997).

2.4.4 Análises estatísticas

A análise de variância foi realizada por meio do teste F. E para a fonte de variação concentrações de SH aplicou-se também o teste de regressão com o auxílio dos softwares STATISTICA (2007) e Statistical Analysis System (SAS®, 2004).

3 RESULTADOS

3.1 Atributos Morfológicos

De acordo com os resultados da análise de variância na Tabela 2, ocorreu efeito significativo para a produção de MSPA de plantas de estilosantes cv. Campo Grande que foram submetidas à inoculação, no momento do primeiro corte. Não ocorreu efeito significativo na interação entre inoculação e concentrações de substâncias húmicas, evidenciando que os fatores são independentes, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. No momento do segundo corte, ocorreu efeito significativo para a MSR das plantas de estilosantes cv. Campo Grande que foram submetidas à inoculação.

Tabela 2. Resumo da análise de variância dos atributos morfológicos massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e altura de plantas de estilosantes cv. Campo Grande com e sem inoculação, submetidas à concentrações de substâncias húmicas (SH).

PRIMEIRO CORTE			
Fonte de Variação	QM		
	MSPA (g)	ALTURA (cm)	
Inoculação	1.972*	0.107 ^{ns}	
SH	0.178 ^{ns}	0.061 ^{ns}	
(Inoc x SH)	0.076 ^{ns}	0.405 ^{ns}	
Resíduo	0.307	0.600	
Média	0,490	6.113	
CV (%)	66,021	9.824	
SEGUNDO CORTE			
Fonte de Variação	QM		
	MSPA (g)	MSR(g)	ALTURA (cm)
Inoculação	0.140 ^{ns}	4,600*	0.107 ^{ns}
SH	0.002 ^{ns}	0,010 ^{ns}	0.061 ^{ns}
(Inoc x SH)	0.085 ^{ns}	0.527 ^{ns}	0.405 ^{ns}
Resíduo	0.194	0,531	0.600 ^{ns}
Média	0.857	1.564	6.113
CV (%)	22.662	33,959	9,824

*significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F; ns: não significativo.

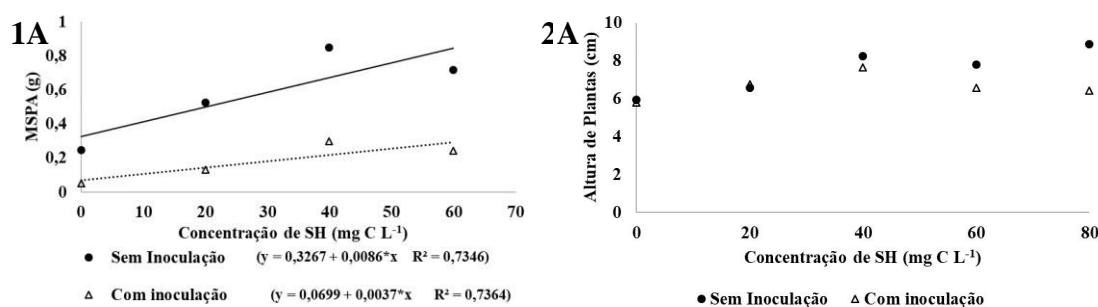


Figura 1. Produção de massa seca da parte aérea e altura de plantas de estilosantes cv. Campo Grande, com e sem inoculação (A e B, respectivamente) aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto (primeiro corte), submetidas às concentrações de substâncias húmicas (SH).

3.2 Análise nutricional

Não ocorreu efeito significativo para o conteúdo de macronutrientes da parte aérea das plantas de estilosantes cv. Campo Grande, nos momentos do primeiro e segundo cortes, evidenciando que os fatores são independentes, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo da análise de variância do conteúdo de macronutrientes em plantas de estilosantes cv. Campo Grande, submetidas a concentrações de substâncias húmicas (SH) com e sem inoculação.

PRIMEIRO CORTE					
Fonte de Variação	QM				
	N	P	K	Ca	Mg
	-----(g kg^{-1})-----				
Inoculação	2029.627 ^{ns}	0.001 ^{ns}	1326.643 ^{ns}	8.418 ^{ns}	2.718 ^{ns}
SH	348.616 ^{ns}	0.0001 ^{ns}	63.418 ^{ns}	0.444 ^{ns}	0.158 ^{ns}
(Inoc x SH)	62.719 ^{ns}	0.00008 ^{ns}	40.376 ^{ns}	0.277 ^{ns}	0.091 ^{ns}
Resíduo	5.944	0.003	3.719	0.392	0.169
Média	14.912	0.00782	7.046	0.556	0.339
CV (%)	39.860	38.744	52.782	70.553	50.115
SEGUNDO CORTE					
Fonte de Variação	QM				
	N	P	K	Ca	Mg
	-----(g kg^{-1})-----				
Inoculação	20.738 ^{ns}	0.00002 ^{ns}	1.616 ^{ns}	0.059 ^{ns}	0,017 ^{ns}
SH	13.586 ^{ns}	0.0000001 ^{ns}	0.174 ^{ns}	0.008 ^{ns}	0,003 ^{ns}
(Inoc x SH)	42.894 ^{ns}	0.00001 ^{ns}	3.314 ^{ns}	0.124 ^{ns}	0.007 ^{ns}
Resíduo	5.653	0.0028	1.061	0.237	0.080
Média	22.364	0.0126	3.972	0.929	0.297
CV (%)	25.277	2.716	26.723	25.587	27.201

*significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F; ns: não significativo.

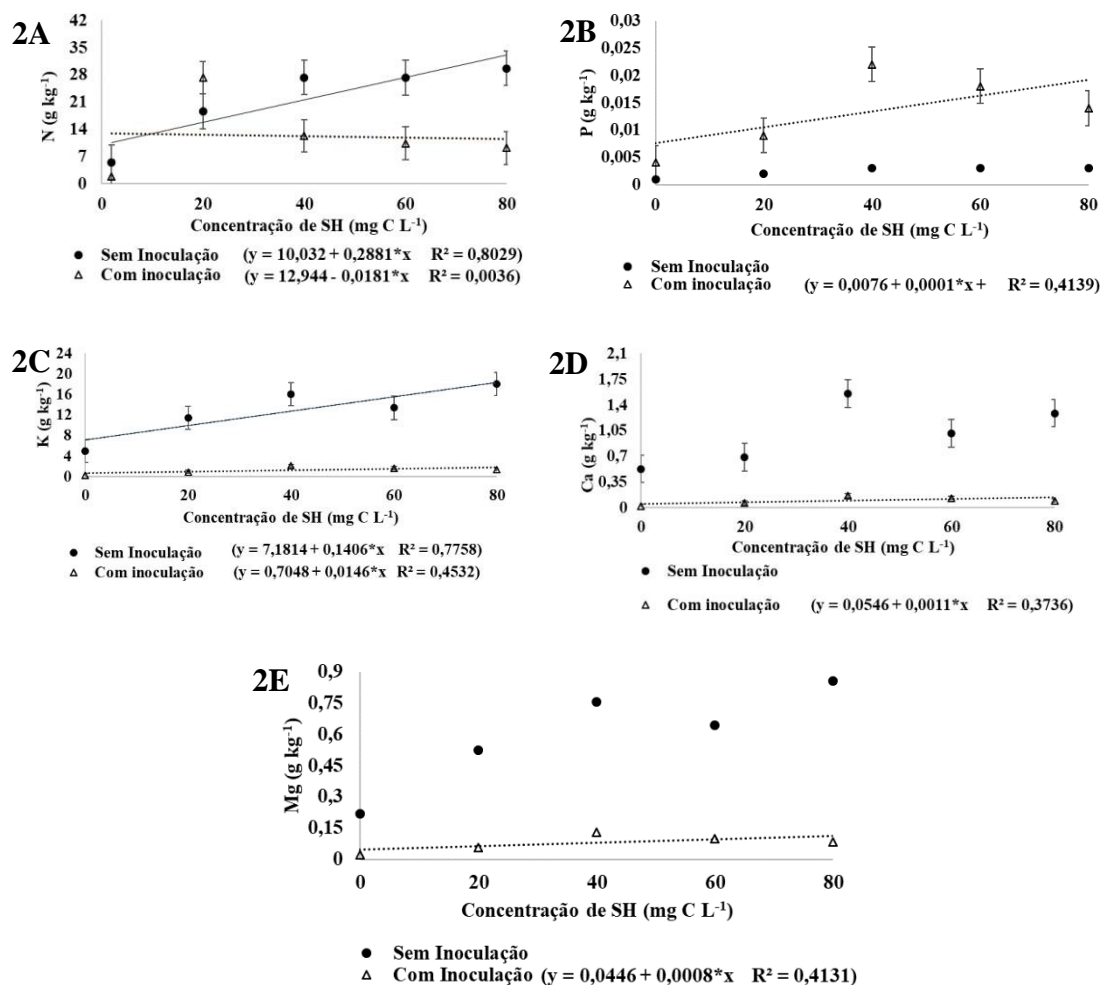


Figura 2. Conteúdo foliar de N, P, K, Ca e Mg (A, B, C, D e E, respectivamente), em plantas de estilosantes cv. Campo Grande, com e sem inoculação, aos 45 dias após a última aplicação de óleo essencial de eucalipto (momento do primeiro corte) submetidas às concentrações substâncias húmicas (SH).

Não ocorreu diferença significativa para a massa seca da parte aérea e altura de plantas de estilosantes cv. Campo Grande, com e sem inoculação, no momento do segundo corte, assim como para o conteúdo de macronutrientes, impossibilitando o ajuste no modelo de regressão (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios da massa da parte aérea, altura de plantas e conteúdo de macronutrientes de estilosantes cv. Campo Grande em função de concentrações de substâncias húmicas (SH), com e sem inoculação, no momento do segundo corte.

COM INOCULAÇÃO							
SH (mg C L ⁻¹)	MSPA (g)	ALTURA (cm)	N	P	K	Ca	Mg
			----- (g kg ⁻¹) -----				
0	0,787 ^{ns}	6,356 ^{ns}	22,449 ^{ns}	0,012 ^{ns}	3,852 ^{ns}	0,984 ^{ns}	0,292 ^{ns}
20	0,928 ^{ns}	6,206 ^{ns}	26,243 ^{ns}	0,013 ^{ns}	4,562 ^{ns}	1,084 ^{ns}	0,306 ^{ns}
40	0,82 ^{ns}	6,313 ^{ns}	18,697 ^{ns}	0,012 ^{ns}	4,146 ^{ns}	1,017 ^{ns}	0,372 ^{ns}
60	0,821 ^{ns}	6,225 ^{ns}	22,345 ^{ns}	0,012 ^{ns}	3,601 ^{ns}	1,035 ^{ns}	0,358 ^{ns}
80	0,631 ^{ns}	5,725 ^{ns}	18,49 ^{ns}	0,01 ^{ns}	2,699 ^{ns}	0,72 ^{ns}	0,262 ^{ns}
Valor F	1,007	0,742	1,097	0,725	1,506	1,049	0,939
SEM INOCULAÇÃO							
SH (mg C L ⁻¹)	MSPA (g)	ALTURA (cm)	N	P	K	Ca	Mg
			----- (g kg ⁻¹) -----				
0	0,864 ^{ns}	5,756 ^{ns}	25,577 ^{ns}	0,013 ^{ns}	3,903 ^{ns}	0,932 ^{ns}	0,273 ^{ns}
20	0,818 ^{ns}	5,925 ^{ns}	20,538 ^{ns}	0,012 ^{ns}	3,486 ^{ns}	0,844 ^{ns}	0,286 ^{ns}
40	0,915 ^{ns}	6,175 ^{ns}	24,124 ^{ns}	0,013 ^{ns}	4,261 ^{ns}	0,789 ^{ns}	0,291 ^{ns}
60	0,894 ^{ns}	6,1 ^{ns}	21,791 ^{ns}	0,013 ^{ns}	4,061 ^{ns}	0,821 ^{ns}	0,232 ^{ns}
80	1,089 ^{ns}	6,35 ^{ns}	23,394 ^{ns}	0,015 ^{ns}	5,159 ^{ns}	1,066 ^{ns}	0,298 ^{ns}
Valor F	1,427	0,559	0,584	0,869	1,603	1,436	0,683

*significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F; ns: não significativo.

3.3 Atributos Fisiológicos

A Tabela 5 apresenta os valores médios dos atributos fotossintéticos da parte aérea de plantas de estilosantes cv. Campo Grande sem e com inoculação, no momento do primeiro e segundo corte. Não foram observadas diferenças significativas para esses parâmetros, evidenciando que os fatores são independentes, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 5. Resumo da análise de variância dos atributos fotossintéticos e teor de clorofila em plantas de estilosantes cv. Campo Grande, submetidas a concentrações de substâncias húmicas (SH) com e sem inoculação.

PRIMEIRO CORTE					
Fonte de Variação	QM				
	Taxa Fotossintética	Gs	Ci	Fm	Clorofila
Inoculação	119.871 ^{ns}	0.311 ^{ns}	7548.234 ^{ns}	106385.300 ^{ns}	34.918 ^{ns}
SH	130.790 ^{ns}	0.063 ^{ns}	805.014 ^{ns}	88906.651 ^{ns}	25.768 ^{ns}
(Inoc x SH)	141.899 ^{ns}	0.031 ^{ns}	295.957 ^{ns}	22499.405 ^{ns}	31.471 ^{ns}
Resíduo	15.900	0.297	23.524	284.744	6.171
Média	26.824	0.498	287.691	749.473	41.986
CV (%)	59.274	59.610	8.176	37.992	14.697
SEGUNDO CORTE					
Fonte de Variação	QM				
	Taxa Fotossintética	Gs	Ci	Fm	Clorofila
Inoculação	31.044	0.005	119372.559	206761.824	30,654 ^{ns}
SH	0.703	0.0004	12911.073	9737.248	22,547 ^{ns}
(Inoc x SH)	0.972	0.0005	20604.516	9756.025	18,521 ^{ns}
Resíduo	1.225	0.030	160.105	134.258	5,325
Média	38.057	0.133	838.053	282.655	39,519
CV (%)	3.219	22.488	19.104	47.498	11,336

*significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F; ns: não significativo; Gs: condutância estomática; Ci: concentração de CO₂ interno; Fm: fluorescência máxima da clorofila.

Não ocorreram diferenças significativas para os valores dos atributos fotossintéticos no momento do primeiro corte, impossibilitando o ajuste no modelo de regressão (Tabela 6), assim como os valores dos atributos fotossintéticos no momento do segundo corte, apresentados na Tabela 7.

Tabela 6. Valores médios dos parâmetros fotossintéticos da parte aérea de estilosantes cv. Campo Grande em função de concentrações de substâncias húmicas (SH), com e sem inoculação, no momento do primeiro corte.

COM INOCULAÇÃO					
SH (mg C L⁻¹)	Taxa	Gs	Ci	Fm	Clorofila
	Fotossintética (mol m ⁻² s ⁻¹)	-----(μ L L ⁻¹)-----			
0	38,41 ^{ns}	0,778 ^{ns}	306,203 ^{ns}	596,780 ^{ns}	40,059 ^{ns}
20	18,389 ^{ns}	248,649 ^{ns}	298,649 ^{ns}	534,287 ^{ns}	45,210 ^{ns}
40	34,668 ^{ns}	288,480 ^{ns}	288,480 ^{ns}	876,771 ^{ns}	45,193 ^{ns}
60	26,949 ^{ns}	307,273 ^{ns}	307,273 ^{ns}	746,904 ^{ns}	45,345 ^{ns}
80	24,361 ^{ns}	306,534 ^{ns}	306,534 ^{ns}	734,768 ^{ns}	38,795 ^{ns}
Valor F	0,578	0,541	0,428	2,185	0,977
SEM INOCULAÇÃO					
SH (mg C L⁻¹)	Taxa	Gs	Ci	Fm	Clorofila
	Fotossintética (mol m ⁻² s ⁻¹)	-----(μ L L ⁻¹)-----			
0	22,459 ^{ns}	0,431 ^{ns}	286,075 ^{ns}	638,641 ^{ns}	42,581 ^{ns}
20	24,537 ^{ns}	0,395 ^{ns}	269,189 ^{ns}	789,716 ^{ns}	43,656 ^{ns}
40	27,534 ^{ns}	0,389 ^{ns}	262,467 ^{ns}	858,871 ^{ns}	38,919 ^{ns}
60	26,24 ^{ns}	0,510 ^{ns}	292,336 ^{ns}	826,665 ^{ns}	39,856 ^{ns}
80	24,695 ^{ns}	0,357 ^{ns}	259,703 ^{ns}	891,335 ^{ns}	40,250 ^{ns}
Valor F	0,245	0,519	1,677	0,873	0,467

ns: não significativo; Gs: condutância estomática; Ci: concentração de CO₂ interno; Fm: fluorescência máxima da clorofila.

4 DISCUSSÃO

Ocorreu efeito significativo para a produção de MSPA de plantas de estilosantes cv. Campo Grande que foram submetidas à inoculação, no momento do primeiro corte (Tabela 2). O modelo linear foi o que melhor se ajustou à curva sem inoculação e com inoculação, ambos apresentando coeficientes de determinação de 73% (Figura 1A). A maior produção de massa seca foi observada na concentração de 40 mg C L⁻¹ de SH, e revelou que o valor máximo de massa seca em plantas sem inoculação foi de 0,848 g e em plantas com inoculação uma produção de 0,301 g de massa seca. Porém, a menor produção de massa seca de plantas de estilosantes sem inoculação e com inoculação foi estimada em 0,249 g e 0,05 g, respectivamente, obtida na ausência da aplicação de substâncias húmicas (0 mg C L⁻¹). Isso está relacionado ao fato de parte dos efeitos bioestimulantes das SH ser devido à sua atividade análoga à ação dos hormônios vegetais (Façanha et al., 2002; Canellas et al., 2002), da classe das auxinas, ou seja, podem promover o crescimento vegetal em concentrações relativamente pequenas.

Em experimentos em vaso, Sharif et al. (2002) avaliaram os efeitos de ácido húmico no crescimento do milho (*Zea mays*), demonstrando significativo aumento de aproximadamente 32% de massa seca do milho comparada ao controle. De acordo com Freitas et al. (2012), a introdução de inoculantes contendo rizóbios eficientes não garante a eficiência da associação, pois estirpes nativas são, em geral, muito competitivas. As estirpes nativas de rizóbio podem ser tão eficientes quanto as estirpes recomendadas, na ausência de N.

Não ocorreu efeito significativo na interação entre inoculação e concentrações de substâncias húmicas, evidenciando que os fatores são independentes, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. No momento do segundo corte, ocorreu efeito significativo para a MSR das plantas de estilosantes cv. Campo Grande que foram submetidas à inoculação.

Outros estudos demonstraram que os ácidos húmicos e fúlvicos, além de resultarem em crescimento do sistema radicular, incrementam também a biomassa da parte aérea. Isso se deve a uma ativação das ATPases bombeadoras de prótons presentes na membrana celular, que levaram a uma maior troca de íons e, assim, maior absorção de nutrientes, como nitratos, os quais favorecem o crescimento vegetativo (Mora et al., 2010). Essas evidências também foram encontradas em estudos com milho (Canellas et al., 2002; Quaggiotti et al., 2004; Zandonadi et al., 2007) e pepino (Pinton et al., 1999; Aguirre et al., 2009).

Quanto ao conteúdo de macronutrientes na parte aérea de plantas de estilosantes cv. Campo Grande (Tabela 3), não ocorreu efeito significativo nos momentos do primeiro e segundo cortes, evidenciando que os fatores são independentes. O modelo linear foi o que melhor se ajustou às curvas sem e com inoculação, para todos os macronutrientes, com exceção do conteúdo de P, Ca e Mg, ambos em plantas de estilosantes cv. Campo Grande sem inoculação. A concentração de substância húmica de 40 mg C L⁻¹ resultou em maior conteúdo de macronutrientes. Porém, o menor acúmulo de macronutrientes foi obtido na ausência da aplicação de substâncias húmicas (0 mg C L⁻¹). Tejada e Gonzalez (2003), em pesquisa com aspargos, verificaram que a aplicação foliar de ácidos húmicos auxiliou na absorção de nutrientes como nitrogênio, potássio, magnésio, cálcio, boro e ferro pela cultura.

Os teores de N encontram-se dentro da faixa de teores adequados para leguminosas forrageiras (Silva, 2009). Plantas de estilosantes cv. Campo Grande com inoculação apresentaram um aumento nos teores de N no primeiro corte, demonstrando que a interação entre as concentrações de SH e a inoculação foi eficiente na fixação e absorção de N.

Plantas de estilosantes cv. Campo Grande sem inoculação apresentaram nodulação a partir da aplicação da concentração de SH de 40 mg C L⁻¹ (Anexo A1). Muitos autores já estudaram o efeito de AH sobre plantas leguminosas, principalmente a soja, e observaram que esse bioestimulante é capaz de aumentar a nodulação radicular dessa espécie, favorecendo a fixação biológica de nitrogênio (Tan e Tantiwiranond, 1983). As plantas com inoculação também apresentaram nodulação. Segundo Façanha et al. (2002), os ácidos húmicos apresentam grupamentos auxínicos em sua estrutura, os quais ativam as bombas de H⁺-ATPase da membrana plasmática, o que promove a acidificação do apoplasto e o consequente aumento da plasticidade da parede celular, resultando no incremento da área e no comprimento radicular. Isso pode ser explicado como parte dos efeitos das substâncias húmicas que promovem o crescimento vegetal pelo maior enraizamento e aumentam o número de sítios de mitose e emergência de raízes laterais, aumentando o número de pontos de infecção para as bactérias (Conceição et. al., 2009).

Não ocorreram diferenças significativas para os atributos fisiológicos no momento do primeiro e segundo cortes, evidenciando que os fatores são independentes. (Tabela 5). No entanto, os resultados encontrados neste trabalho condizem com os encontrados por Barroso (2016), os quais, analisando o efeito bioestimulante dos ácidos húmicos em estilosantes cv. Campo Grande, encontrou valores de 23 mmol m⁻² s⁻¹ para a taxa fotossintética, 7.5 mmol m⁻² s⁻¹ para transpiração e 0.5 mol m⁻² s⁻¹. Segundo Chen et

al., (2004), os ácidos húmicos exercem um papel ativo na estimulação da fotossíntese, respiração vegetal, entre outros parâmetros fisiológicos.

5 CONCLUSÕES

A concentração de substâncias húmicas de 40 mg C L⁻¹ demonstrou ser eficiente para o aumento da produção de massa seca da parte aérea de estilosantes cv. Campo Grande.

A utilização de substâncias húmicas promoveu nodulação em plantas de estilosantes cv. Campo Grande, inclusive as plantas sem inoculação, o que demonstra ser eficiente para a fixação biológica de nitrogênio.

CAPÍTULO 3: EFEITO DA COMBINAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS, SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E ÓLEO ESSENCIAL DE EUCALIPTO EM CAPIM MARANDU E ESTILOSANTES cv. CAMPO GRANDE

RESUMO

A utilização de bactérias diazotróficas é necessária para a agricultura, pois apresenta grande potencial na promoção do crescimento vegetal, tanto na fixação biológica de N como pela produção de substâncias que auxiliam o crescimento radicular. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da combinação de bactérias diazotróficas (BD), substâncias húmicas (SH) e óleo essencial de eucalipto (OEE) em Capim Marandu e estilosantes cv. Campo Grande. O trabalho foi conduzido em casa de vegetação. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com seis tratamentos e quatro repetições, correspondendo às seguintes combinações: CONTROLE; SH + OEE; SH + BD; OEE + BD; SH + BD + OEE; e BD. Foram semeadas dez sementes de estilosantes cv. Campo Grande, formadas pelas espécies *Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala* e dez sementes da espécie *Urochloa brizantha* cv. Marandu, em vasos de 5 dm³. Após 15 dias da emergência foi feito o desbaste, deixando quatro plantas por vaso. Aos 150 dias, foi obtida a massa seca da parte aérea e realizadas as medidas de trocas gasosas, teor de clorofila e análise nutricional. Os resultados demonstraram que a utilização de bactérias diazotróficas demonstrou eficiência no acúmulo de nutrientes, na produção de massa seca da parte aérea e da raiz de *Urochloa brizantha* cv. Marandu e incrementou o acúmulo de N em 92% para plantas de estilosantes cv. Campo Grande, em relação ao tratamento controle.

Palavras – chave: fixação biológica de N, bactérias promotoras de crescimento, óleos essenciais

CHAPTER 3: EFFECT OF THE COMBINATION OF DIAZOTROPHIC BACTERIA, HUMIC SUBSTANCES AND ESSENTIAL OIL OF EUCALYPTUS IN CAPIM MARANDU AND ESTILOSANTES cv. CAMPO GRANDE

ABSTRACT

The use of diazotrophic bacteria is necessary for agriculture, since it has great potential in the promotion of plant growth, both in the biological fixation of N and by the production of substances that aid root growth. The objective of this work was to evaluate the effect of the combination of diazotrophic bacteria (BD), humic substances (SH) and essential oil of Eucalyptus (OEE) in Capim Marandu and estilosantes cv. Campo Grande. The work was conducted in a greenhouse. The experimental design was in randomized blocks, with 6 treatments and 4 replications, corresponding to the following combinations: CONTROL; SH + OEE; SH + BD; OEE + BD; SH + BD + OEE; and BD. 10 Seeds of estilosantes cv. Campo Grande, formed by the species *Stylosanthes capitata* and *Stylosanthes macrocephala* and 10 seeds of the species *Urochloa brizantha* cv. Marandu, in pots of 5 dm³. After 15 days of emergence, thinning was done, leaving 4 plants per pot. At 150 days, the dry mass of the aerial part was obtained and the measures of gas exchange, chlorophyll content and nutritional analysis were carried out. The results demonstrated that the use of diazotrophic bacteria demonstrated efficiency in the accumulation of nutrients, in the production of dry mass of the aerial part and the root of *Urochloa brizantha* cv. Marandu and increased the accumulation of N in 92% for plants of cv. Campo Grande, in relation to the control treatment.

Key words: biological N fixation, growth promoting bacteria, essential oils

1 INTRODUÇÃO

A ciclagem de nutrientes pela adubação verde, fixação biológica de N por bactérias diazotróficas endofíticas e uso de bioestimulantes do crescimento vegetativo avançaram como promissores para o desenvolvimento de sistemas de produção e tecnologias sustentáveis. A adoção de tecnologias sustentáveis por produtores rurais no manejo das pastagens degradadas, visando recuperar a fertilidade do solo e qualidade das pastagens, envolve questões econômicas reforçando o benefício da fixação biológica de N (FBN) pela menor dependência por adubações nitrogenadas.

As bactérias diazotróficas são organismos procariotos capazes de fixar o N atmosférico e torná-lo disponível às plantas. Quando se associam às plantas, essas bactérias são capazes de estabelecer simbioses ou colonizar endofiticamente os tecidos vegetais de forma a se beneficiar dos fotoassimilados produzidos e compartilhar o N fixado (Johnston-Monje & Raizada, 2011). A utilização destas bactérias é uma prática importante e necessária para a agricultura, pois, apresenta grande potencial na fixação biológica de N devido a habilidade de colonizar o interior da planta sem causar sintomas de doenças, promover o crescimento vegetal tanto pela FBN como pela produção de substâncias que auxiliam o crescimento radicular (Moreira et al., 2010), como auxinas, giberelinas e citocininas, as quais contribuem para melhorar a nutrição mineral e utilização de água pelas plantas (Bazzicalupo & Okon, 2000).

Contudo, a introdução de BDE diretamente no ambiente de produção ainda permanece desafiadora diante a recorrentes insucessos por problemas de competição e dificuldade de persistência do inóculo, situação inerente a complexidade das relações solo-planta-ambiente (Okon & Labandera-Gonzalez, 1994). Na amenização de tais problemas, a associação de microrganismos com substâncias húmicas tem se tornado promissor para introdução, estabelecimento e maximização da atividade das BDE (Canellas et al., 2002; Marques Jr. et al., 2008; Conceição et al., 2008).

Apesar de as pesquisas envolvendo BDE, SH e OEE estarem crescendo nos últimos anos no Brasil, a estimulação do crescimento das plantas pelo uso em conjunto de BDE, SH e OEE é uma estratégia que merece atenção, considerando seu potencial de incrementar a produção de forma sustentada. Tais efeitos podem alterar positivamente o crescimento da planta e conseqüentemente trazer benefícios à qualidade da pastagem. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inoculação de bactérias

diazotróficas associadas a substâncias húmicas e óleo essencial de eucalipto em Capim Marandu e estilosantes cv. Campo Grande.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido na casa de vegetação do Departamento de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, no período de outubro de 2017 a janeiro de 2018. Após a obtenção das concentrações ótimas de substâncias húmicas e óleo essencial de eucalipto, descritas nos Capítulos 1 e 2, foi avaliada a combinação dessas concentrações com as bactérias diazotróficas. As concentrações de OEE utilizadas foram de $80 \mu\text{L L}^{-1}$ para Capim Marandu e $60 \mu\text{L L}^{-1}$ para estilosante cv. Campo Grande. As concentrações de SH utilizadas foram de 15 mg C L^{-1} para Capim Marandu, baseado no trabalho de Pinheiro (2014) e de 40 mg C L^{-1} para estilosante cv. Campo Grande. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com seis tratamentos e quatro repetições, constituindo-se os seguintes tratamentos: controle; substâncias húmicas e óleo essencial de eucalipto (SH + OEE); substâncias húmicas e bactérias diazotróficas (SH + BD); óleo essencial de eucalipto e bactérias diazotróficas (OEE + BD); substâncias húmicas, óleo essencial de eucalipto e bactérias diazotróficas (SH + OEE + BD); e uso isolado de bactérias diazotróficas (BD). As sementes foram inoculadas com uma estirpe de *Bradyrhizobium japonicum* (BR 446), inoculante comercial, desenvolvido pela Embrapa Agrobiologia, cedido pela Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

2.1 Obtenção das substâncias húmicas

As substâncias húmicas foram isoladas de vermicomposto produzido com esterco de curral, utilizando-se água deionizada (1:9, v:v). Após seis horas de agitação, o material ficou em repouso e após 12 horas o sobrenadante foi separado através de decantação e armazenado. Foi feita a determinação dos teores de C e N das substâncias húmicas, de modo que as concentrações de substâncias húmicas se basearam no teor de carbono.

A determinação quantitativa de C nas substâncias húmicas foi realizada segundo método de Yoemans e Bremner (1988). Alíquotas de 5 mL do extrato foram pipetadas para tubos de digestão de 100 mL, adicionados 10 mL da solução $0.033 \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ e 10 mL de H_2SO_4 concentrado. Foi realizada a digestão sulfúrica em bloco digestor pré-aquecido a $170 \text{ }^\circ\text{C}$, por 30 minutos e titulação com a solução de sulfato ferroso amoniacal

0.03 mol L⁻¹. Para a quantificação de N, foi realizada digestão sulfúrica de 20 mL do extrato, seguida de destilação Kjeldahl, de acordo com Embrapa (2000). Os teores de C e N determinados foram de 0.096 dag kg⁻¹ e 0.0378 g kg⁻¹, respectivamente.

2.2 Obtenção do óleo essencial de Eucalipto

O OEE foi adquirido comercialmente do revendedor BioEssência (Fonte: <http://loja.bioessencia.com.br/index.html>), com garantias de que o OE distribuído é 100% puro, sem modificações ou adições e extraído de todas as partes das folhas de *Eucalyptus globulus* por destilação a vapor.

2.3 Caracterização química do solo

O solo utilizado foi representativo de uma situação de pastagem degradada da região de Alegre - ES. Foi seco ao ar e peneirado em peneira com malha de 2.0 mm para obtenção da terra fina seca ao ar (TFSA). Para caracterização química do solo (Tabela 1), foram realizadas as seguintes análises: pH em água e em KCl 1 mol L⁻¹, em suspensão solo: líquido 1:2:5; Al, Ca, Mg e Na trocáveis, extraídos com KCl 1 mol L⁻¹, na proporção 1:10, sendo Al determinado por titulação com NaOH 0,025 mol L⁻¹, Ca e Mg por espectrometria de absorção atômica (EAA) e Na por fotometria de chama; K e P disponíveis por extração com Mehlich (HCl 0,05 mol L⁻¹ + H₂SO₄ 0,0125 mol L⁻¹), na proporção 1:10, dosados por fotometria de chama e colometria, respectivamente; H+Al utilizando Ca(OAc)₂ 0,5 mol L⁻¹, ajustado pH 7,0 na proporção 1:15, titulado com NaOH 0,0606 mol L⁻¹, conforme EMBRAPA (1997).

Tabela 1 – Atributos químicos e físicos do solo utilizado no experimento

pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	T	V	m	M.O.
H ₂ O	--(mg dm ⁻³ --		----- (cmol _c dm ⁻³)-----						----- (%)-----		(g kg ⁻¹)
5.38	7.03	57	1.04	0.77	0.08	2.72	1.98	4.7	42.11	3.88	0,19
	Ds		Areia					Silte		Argila	
	(kg dm ⁻³)		----- (%)-----								
	0.94		38					5		57	

pH em água: potenciometria em solução solo-água 1:2,5; fósforo disponível: extraído por Mehlich¹ + espectroscopia; alumínio extraível: determinado por titulação com NaOH 0.025 mol L⁻¹, usando-se azul de bromotimol como indicador; cálcio e magnésio: extraídos com solução de KCl 1 mol L⁻¹ e determinados por espectrofotometria de absorção atômica; potássio e sódio trocáveis: extraídos pelo extrator Mehlich¹ e determinados por fotometria de chama; SB = Ca + Mg + K + Na; CTC = SB + (H + Al); V% = SN x 100/CTC; MO: teor de C do solo x 1,724. Ds: método da proveta; teores de areia, silte e argila: análise granulométrica.

2.4 Condições de cultivo

Foram semeadas dez sementes da cultivar Campo Grande, formadas pelas espécies *Stylosanthes capitata* e *Stylosanthes macrocephala* e dez sementes da espécie *Uruchloa brizantha* cv. Marandu, em vasos de 5 dm³, e 15 dias após a emergência foi feito o desbaste, deixando quatro plantas por vaso. Através do método da proveta, foi obtida a densidade do solo (0.94 kg dm⁻³), que permitiu definir o volume de solo adicionado aos vasos. A irrigação foi controlada a partir da capacidade de campo do solo, verificada a cada cinco dias. O experimento foi conduzido durante 90 dias, com medidas semanais de altura e diâmetro do colmo.

2.5 Atributos Morfológicos, Fisiológicos e Análise Nutricional

Foram realizadas medidas de trocas gasosas, fluorescência e conteúdo de clorofila, produção de massas fresca e seca da parte aérea. Ao final do experimento foram avaliadas a produção de matéria fresca e seca da raiz. A parte aérea e a raiz foram coletadas, armazenadas em sacos de papel e colocadas em estufa a 65°C durante 72 horas (até atingir peso constante) para determinação da massa seca. Após a secagem em estufa, as amostras foram submetidas à trituração em moinho de facas para posterior determinação dos teores de C e dos macronutrientes N, P, K, Ca e Mg.

2.5.1 Trocas gasosas

A medição das trocas gasosas foi realizada nas folhas individuais do 2º par de folhas totalmente expandidas, em uma planta de cada um dos quatro vasos, em cada tratamento, com o auxílio de um analisador a gás infravermelho portátil (IRGA), modelo Li 6300 XT (LI-COR, Lincoln, NE, USA), utilizando uma fonte luminosa fixa em 1000 mmol m⁻² s⁻¹ de intensidade de fluxo de fótons fotossintéticos.

2.5.2 Teor de clorofila

A estimativa do teor de clorofila foi avaliada por meio dos valores do índice SPAD, os quais foram obtidos por meio do clorofilômetro digital (FALKER). Foi feita uma medição por folha, na mesma folha onde foram realizadas as medições das taxas gasosas, entre 8 horas e 40 minutos e 11 horas da manhã, para todos os tratamentos.

2.5.3 Análise Nutricional e Determinação de Carbono

O C foi determinado a partir do método de Walkley-Black, adaptado por Yeomans & Bremner (1988). Para análise química do N foliar foi realizada digestão

sulfúrica seguida de destilação Kjeldahl, de acordo com Embrapa (2000). Para análise química foliar de P, K, Ca e Mg foi realizada digestão nítrica. A leitura do P foi realizada por espectrofotômetro a 725 nm; K por fotômetro de chama e as leituras de Ca e Mg por espectroscopia de absorção atômica, de acordo com Johnson e Ulrich, (1959) e Malavolta et al. (1997).

2.5.4 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando significativo, utilizado o teste de Tukey ($p \leq 0.05$), com o auxílio dos softwares STATISTICA (2007) e Statistical Analysis System (SAS).

3 RESULTADOS

3.1 Capim Marandu

3.1.1 Atributos Morfológicos

A Figura 1 apresenta a produção de massa seca da parte aérea de Capim Marandu após a associação entre bactérias diazotróficas e concentrações ótimas de óleo essencial de eucalipto ($80 \mu\text{L L}^{-1}$) e substâncias húmicas (15 mg C L^{-1}). O uso de BD isolado resultou em maior produção de MSPA e a associação BD + OEE + SH resultou em menor produção de MSPA.

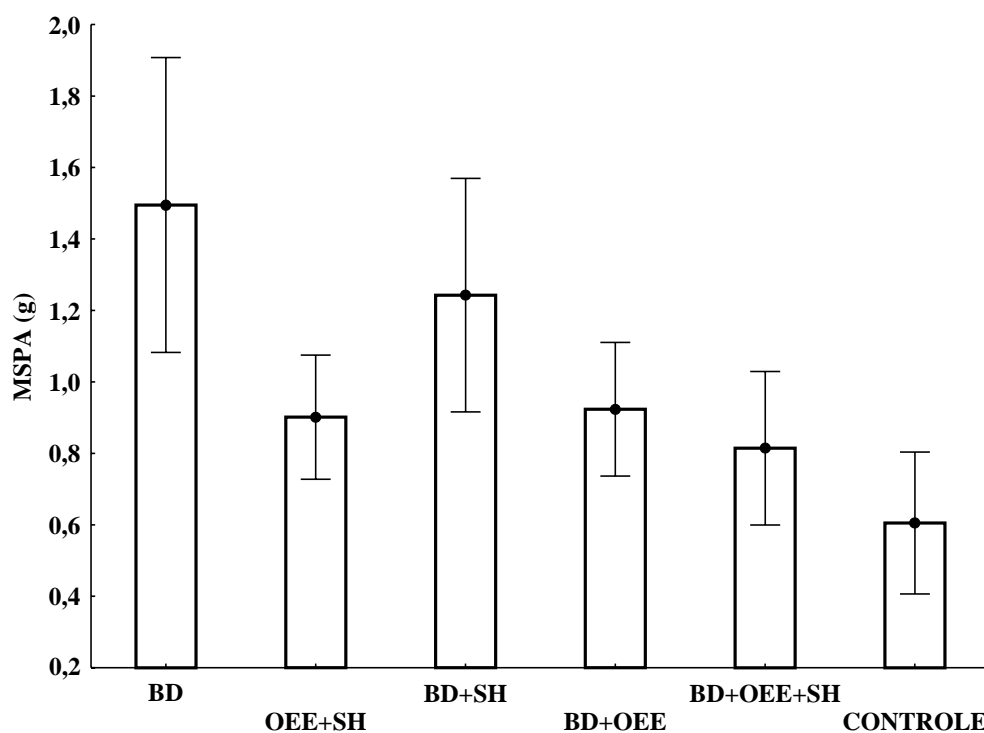


Figura 1. Produção de massa seca da parte aérea (MSPA) de Capim Marandu após os tratamentos: uso isolado de BD; uso combinado de SH + OEE; associação entre SH + BD; associação entre BD + OEE; associação entre BD + OEE + SH e tratamento controle.

A produção de massa seca de raiz de plantas (MSR) de Capim Marandu apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. O uso isolado de BD resultou em maior produção de MSR (Figura 2).

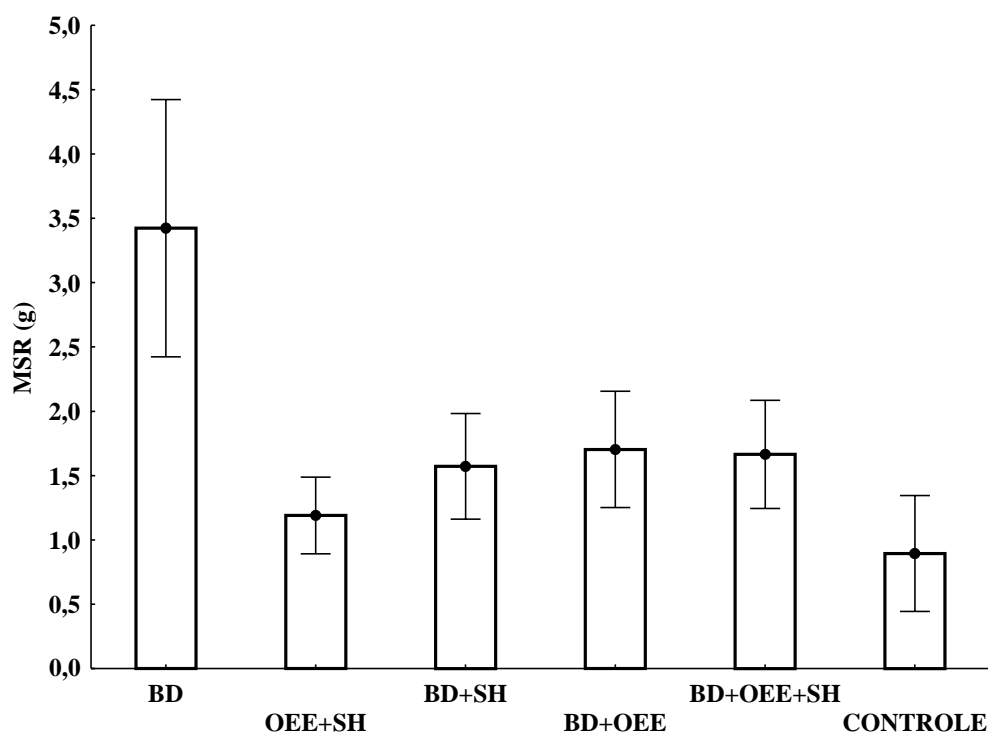


Figura 2. Produção de massa seca da raiz (MSR) de Capim Marandu após os tratamentos: uso isolado de BD; uso combinado de OEE + SH; associação entre BD + SH; associação entre BD + OEE; associação entre BD + OEE + SH e tratamento controle.

As Figuras 3 e 4 apresentam, respectivamente, altura e diâmetro do colmo de plantas de Capim Marandu.

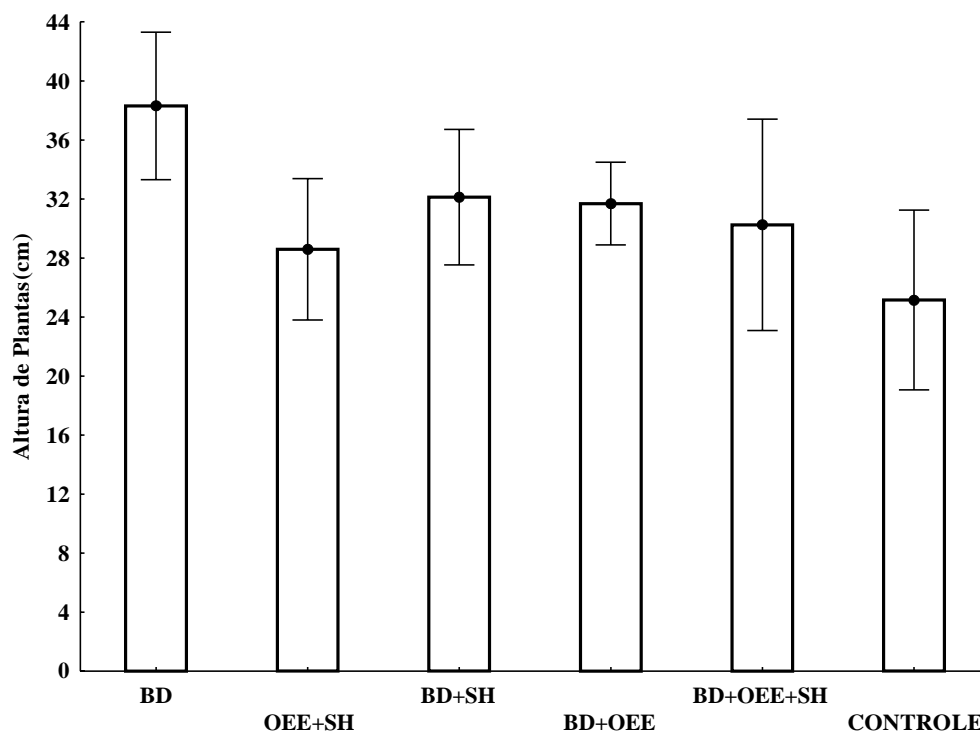


Figura 3. Altura de plantas de Capim Marandu após os tratamentos: uso isolado de BD; uso combinado de OEE + SH; associação entre BD + SH; associação entre BD + OEE; associação entre BD + OEE + SH e tratamento controle.

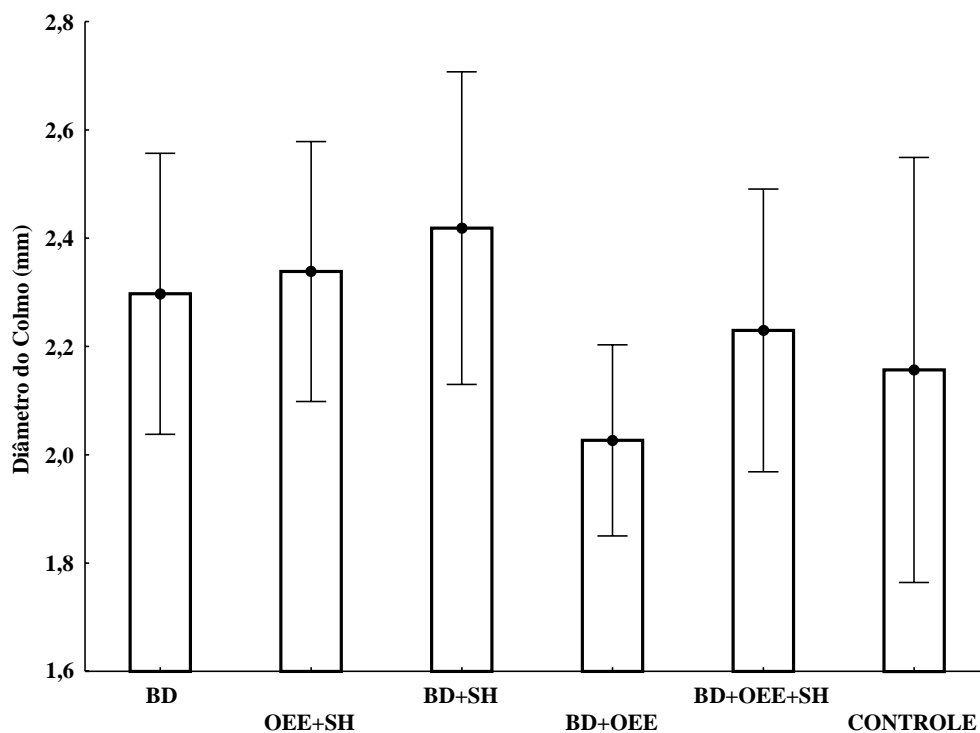


Figura 4. Diâmetro do colmo de plantas de Capim Marandu após os tratamentos: uso isolado de BD; uso combinado de OEE + SH; associação entre BD + SH; associação entre BD + OEE; associação entre BD + OEE + SH e tratamento controle.

3.1.2 Análise nutricional foliar

Ocorreram diferenças significativas para o conteúdo dos macronutrientes N, P, K, Ca e Mg na parte aérea de Capim Marandu (Tabela 2).

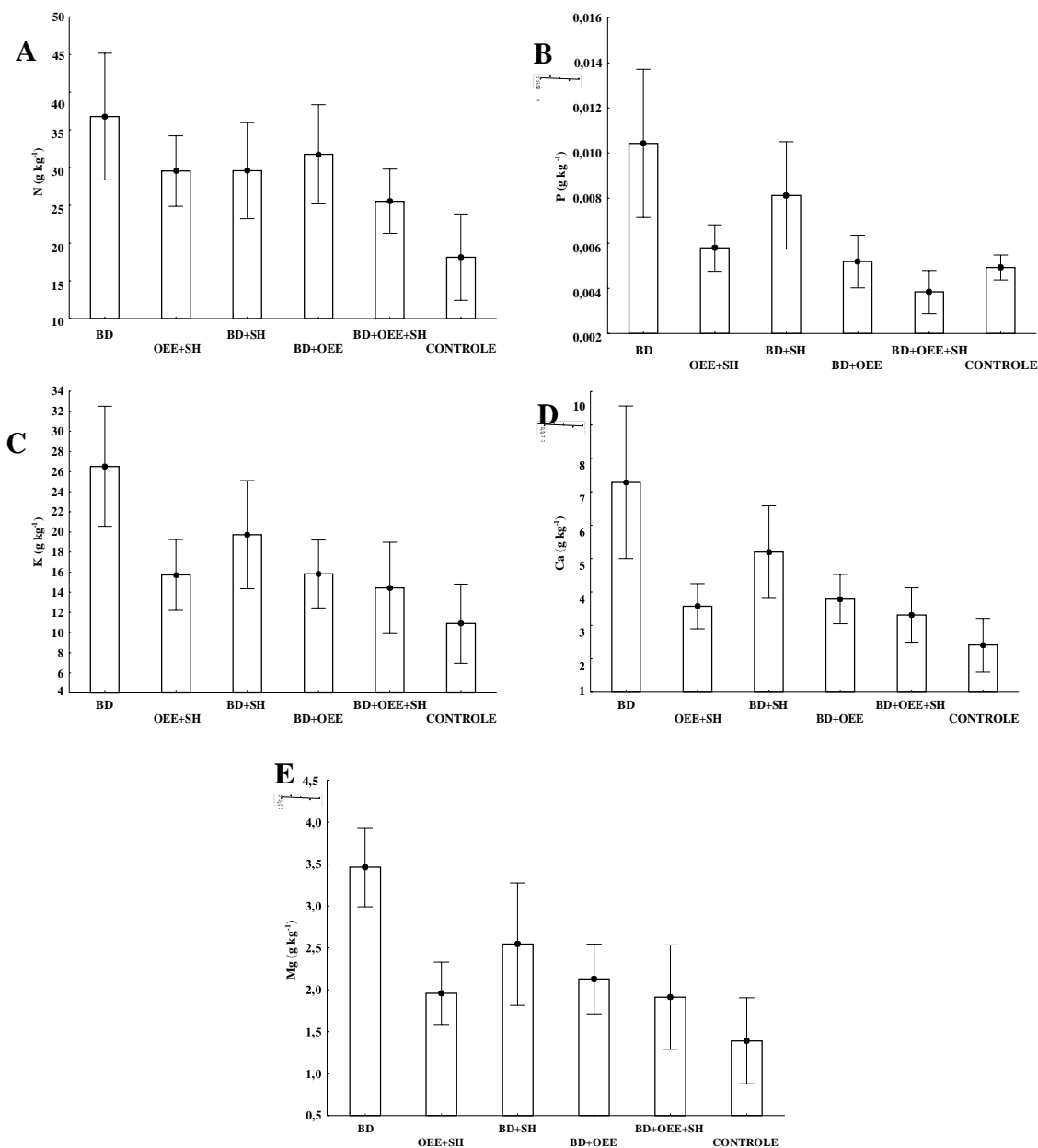


Figura 5. Conteúdo foliar de N, P, K, Ca e Mg (A, B, C, D e E, respectivamente) em plantas de Capim Marandu após os tratamentos: uso isolado de BD; uso combinado de OEE + SH; associação entre BD + SH; associação entre BD + OEE; associação entre BD + OEE + SH e tratamento controle.

A Tabela 2 apresenta os valores médios de teores de C e dos macronutrientes N, P, K, Ca e Mg em Capim Marandu. Não ocorreram diferenças significativas, no entanto, os teores de N, K, Ca e Mg encontram-se dentro da faixa de teores adequados de macronutrientes para Capim Marandu.

Tabela 2. Valores médios dos teores de C e macronutrientes N, P, K, Ca e Mg na parte aérea de Capim Marandu para os tratamentos: uso isolado de BD; uso combinado de OEE + SH; associação entre BD + SH; associação entre BD + OEE; associação entre BD + OEE + SH e tratamento controle.

TRATAMENTOS	N	P	K	Ca	Mg	C
	-----(g kg^{-1})-----					(%)
BDE	25.900	0.00675	18.520	4.680	2.080	41.751
SH+OEE	33.833	0.00649	17.100	3.974	2.180	40.778
SH+BDE	25.433	0.00639	17.330	4.176	2.014	42.346
BDE+OEE	34.066	0.0056	16.925	4.136	2.316	39.642
BDE+OEE+SH	33.600	0.0048	16.937	4.108	2.287	41.156
CONTROLE	29.866	0.0061	18.483	3.877	2.243	40.440
Valor F	2,567 ^{ns}	1,040 ^{ns}	0,547 ^{ns}	4,575*	0,903 ^{ns}	0,453 ^{ns}

ns: não significativo; *significativo a 5% de probabilidade.

3.1.3 Trocas gasosas e teor de clorofila

Não ocorreram diferenças significativas entre os parâmetros fotossintéticos analisados e teor de clorofila nas plantas de Capim Marandu, apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores médios dos parâmetros fotossintéticos da parte aérea de Capim Marandu para os tratamentos: uso isolado de BD; uso combinado de OEE + SH; associação entre BD + SH; associação entre BD + OEE; associação entre BD + OEE + SH e tratamento controle.

TRATAMENTOS	Taxa Fotossintética	Transpiração	Gs	Fm	Clorofila
	----($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)-----		($\mu\text{L L}^{-1}$)		
BDE	39,701	0,004	0,143	325,391	33,706
SH+OEE	41,479	0,004	0,130	292,431	34,225
SH+BDE	43,227	0,004	0,152	248,698	30,200
BDE+OEE	41,671	0,004	0,117	229,775	33,875
BDE+OEE+SH	49,512	0,004	0,129	265,923	31,575
CONTROLE	31,442	0,003	0,112	319,202	30,875
Valor F	0,591 ^{ns}	0,7610 ^{ns}	0,566 ^{ns}	0,378 ^{ns}	0,4630 ^{ns}

ns: não significativo; *significativo a 5% de probabilidade.

3.2 Estilosantes cv. Campo Grande

3.2.1 Atributos Morfológicos

A produção de massa seca da parte aérea de plantas de estilosantes cv. Campo Grande obteve maior incremento com a associação de bactérias diazotróficas com a concentração ótima de óleo essencial de eucalipto (BD + OEE), apresentados na Figura 6. Esses resultados também ocorreram para a produção de massa seca da raiz (Figura 7), altura de plantas (Figura 8) e diâmetro do colmo de plantas de estilosantes cv. Campo Grande (Figura 9).

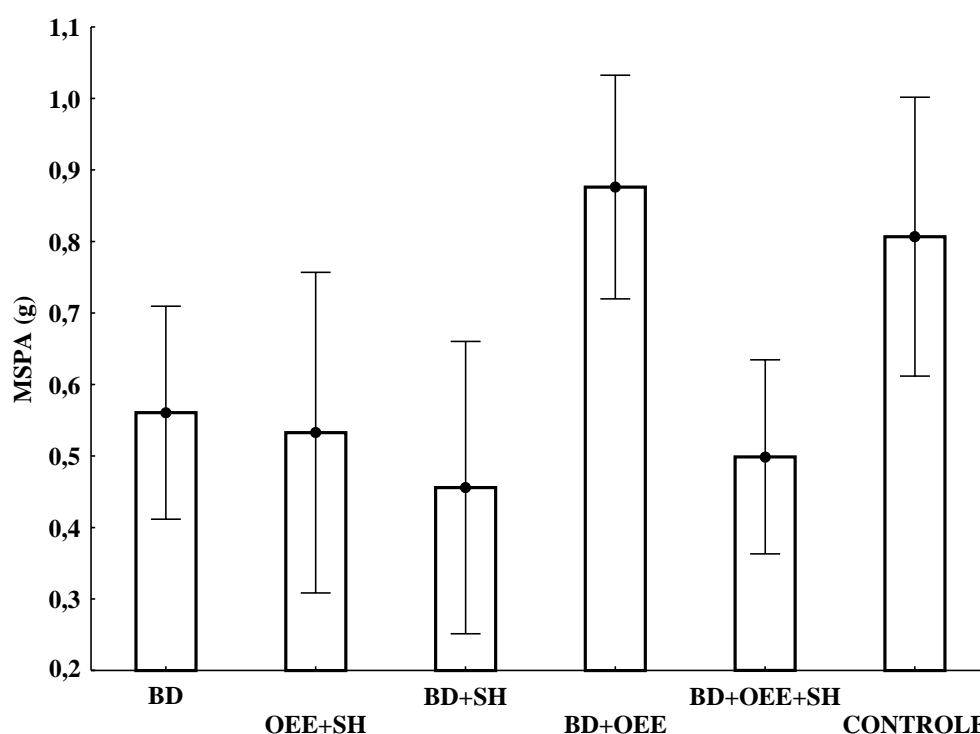


Figura 6. Produção de massa seca da parte aérea de plantas (MSPA) de estilosantes cv. Campo Grande após os tratamentos: uso isolado de BDE; uso combinado de SH + OEE; associação entre SH + BDE; associação entre BDE + OEE; associação entre BDE + OEE + SH e tratamento controle.

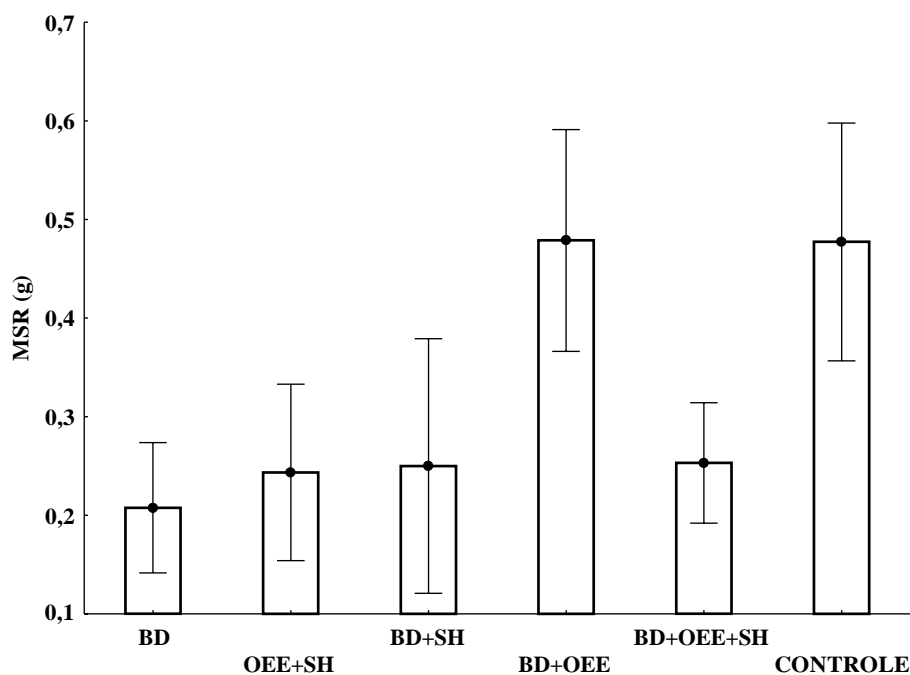


Figura 7. Produção de massa seca da raiz de estilosantes cv. Campo Grande após os tratamentos: uso isolado de BDE; uso combinado de SH + OEE; associação entre SH + BDE; associação entre BDE + OEE; associação entre BDE + OEE + SH e tratamento controle

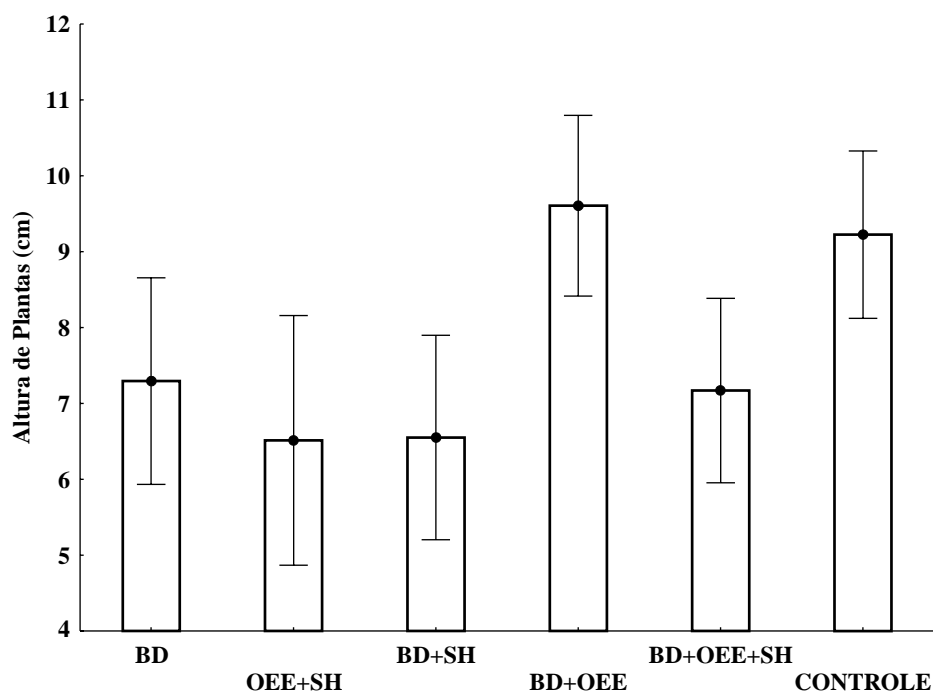


Figura 8. Altura de plantas de estilosantes cv. Campo Grande após os tratamentos: uso isolado de BDE; uso combinado de SH + OEE; associação entre SH + BDE; associação entre BDE + OEE; associação entre BDE + OEE + SH e tratamento controle

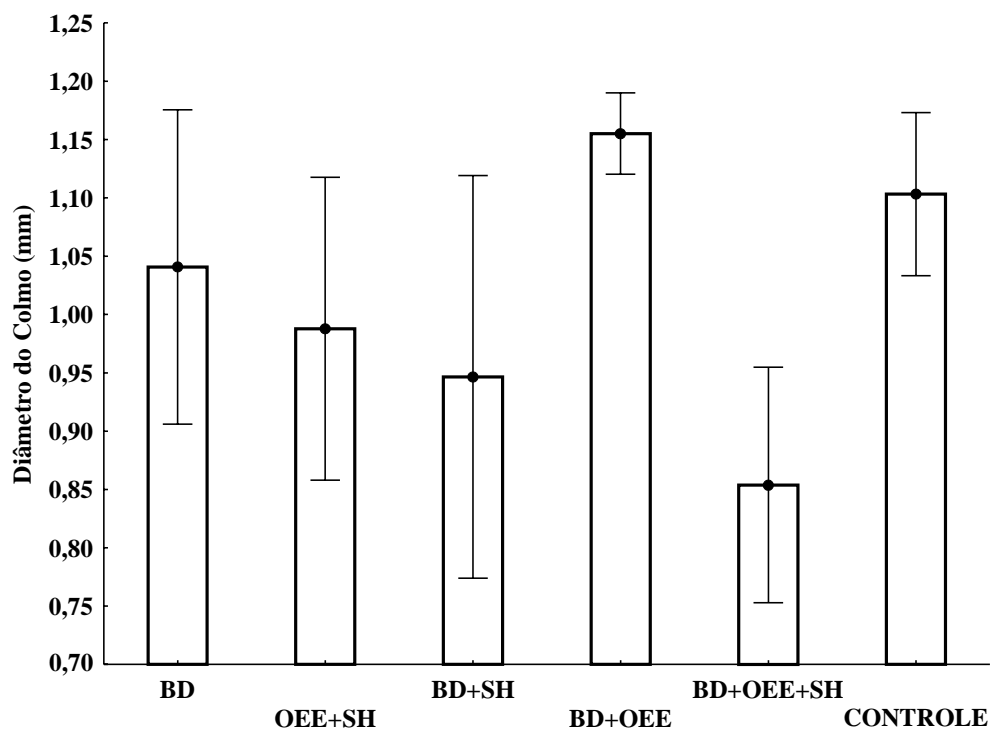


Figura 9. Diâmetro do colmo de plantas de estilosantes cv. Campo Grande após os tratamentos: uso isolado de BDE; uso combinado de SH + OEE; associação entre SH + BDE; associação entre BDE + OEE; associação entre BDE + OEE + SH e tratamento controle

3.2.2 Análise nutricional

A Tabela 4 apresenta os valores médios de teores de C e dos macronutrientes N, P, K, Ca e Mg em estilosantes cv. Campo Grande. Não ocorreram diferenças significativas, entretanto, os teores de N, K, Ca e Mg encontram-se dentro da faixa de teores adequados de macronutrientes para *Stylosanthes* spp. Os teores de C apresentaram diferenças significativas. A associação entre BDE + OEE resultou em maiores teores médios de C.

Tabela 4. Valores médios dos teores de C e macronutrientes N, P, K, Ca e Mg na parte aérea de estilosantes cv. Campo Grande após os tratamentos: uso isolado de BDE; uso combinado de SH + OEE; associação entre SH + BDE; associação entre BDE + OEE; associação entre BDE + OEE + SH e tratamento controle

TRATAMENTOS	N	P	K	Ca	Mg	C
	-----(g kg^{-1})-----					(%)
BDE	32.200	0.0057	14.425	5.589	2.064	39.858 ab*
SH+OEE	32.434	0.006	12.550	5.255	2.341	36.613 b*
SH+BDE	37.022	0.0110	15.150	5.855	2.230	42.995 ab*
BDE+OEE	35.000	0.0067	13.300	5.112	1.135	44.239 a*
BDE+OEE+SH	35.934	0.0063	11.875	5.433	1.855	40.886 ab*
CONTROLE	33.367	0.0055	13.588	5.192	1.904	43.536 ab*
Valor F	0,408 ^{ns}	0,393 ^{ns}	0,407 ^{ns}	0,499 ^{ns}	1,327 ^{ns}	3,039*

ns: não significativo; *médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Ocorreu incremento no acúmulo de N, K e Ca na parte aérea de estilosantes cv. Campo Grande com a associação BD + OEE (Figuras A, C e D, respectivamente) e para os macronutrientes P e Mg, o incremento ocorreu no tratamento controle (Figuras B e E).

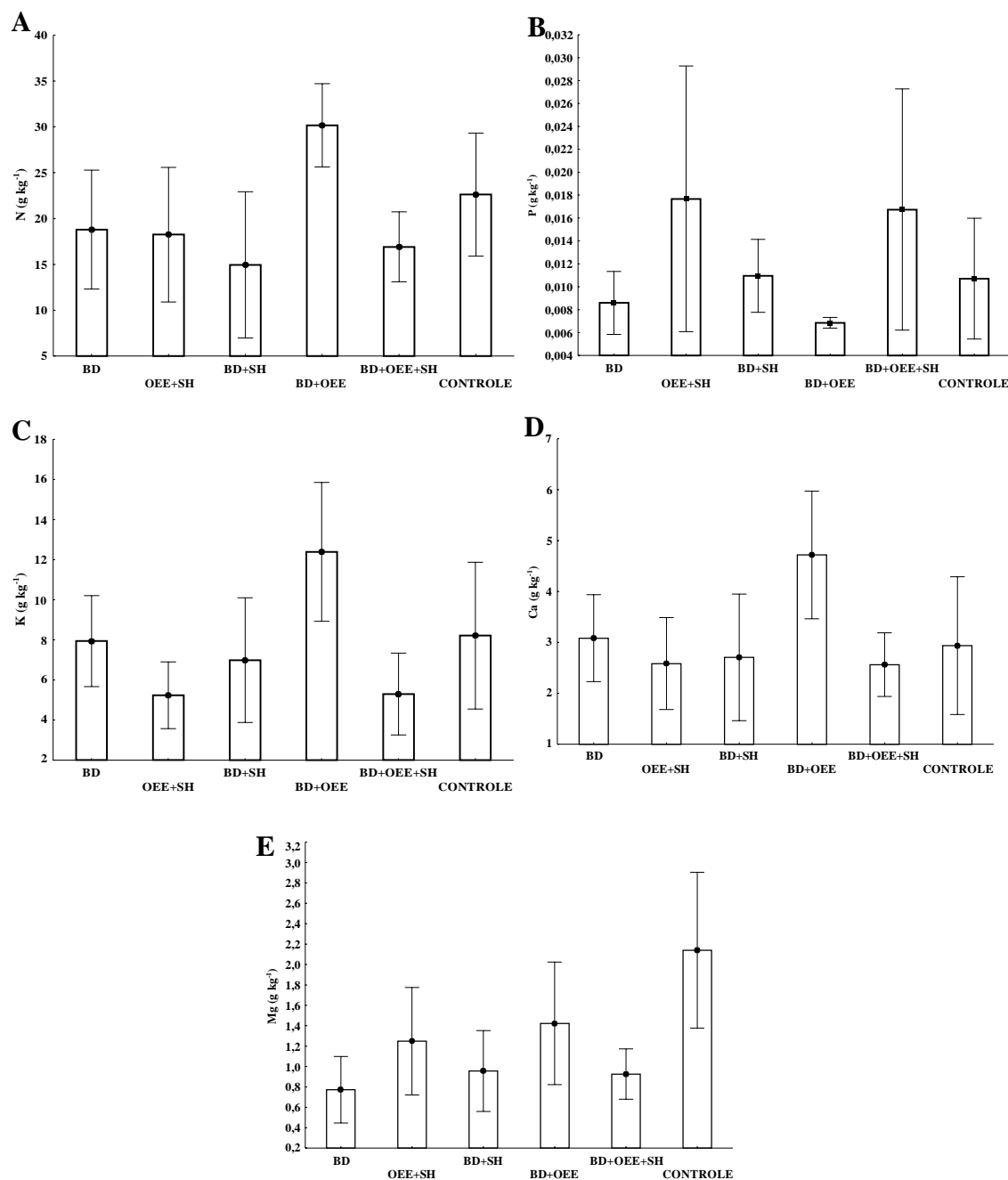


Figura 10. Conteúdo foliar de N, P, K, Ca e Mg (A, B, C, D e E, respectivamente) em plantas de estilosantes cv. Campo Grande após os tratamentos: uso isolado de BD; uso combinado de OEE + SH; associação entre BD + SH; associação entre BD + OEE; associação entre BD + OEE + SH e tratamento controle.

4 DISCUSSÃO

4.1 Capim Marandu

A estirpe utilizada para inoculação neste trabalho, *Bradyrhizobium japonicum*, específica para leguminosas, demonstrou eficiência para Capim Marandu, resultando em maior produção de MSPA, MSR e altura de plantas (Figuras 1, 2 e 3, respectivamente). Esses resultados corroboram com Oliveira et al., (2007) em trabalho com *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, mostrando que essa gramínea, sem aplicação de N e com inoculação de bactérias diazotróficas, produziu mais forragem do que a testemunha (sem aplicação de N e sem inoculação), sendo apontada pelos autores como alternativa sustentável para aumento na produção de forragem. O uso de bactérias do gênero *Rhizobium* incrementou consideravelmente o crescimento radicular, proporcionando uma melhora na absorção de água e nutrientes e ganho de produtividade (Ferlini, 2006).

Considerando seu possível papel no crescimento de pelos radiculares, as bactérias diazotróficas podem promover efeitos benéficos sobre a morfologia radicular (Jain & Patriquin, 1985; Bashan & Levanony, 1990). De acordo com Owen et al., (2009), além da fixação biológica de N, os mecanismos pelos quais as bactérias diazotróficas estimulam o crescimento vegetal incluem as substâncias análogas aos hormônios vegetais e a atuação em processos de controle biológico. Pereira et al. (2013) constataram que algumas variedades, quando inoculadas, chegam a acumular mais matéria seca do que em tratamentos com uso de fertilizantes nitrogenados. O efeito benéfico de BD na produção de MSPA de Capim Marandu pode ser atribuída à produção de fitormônios que são capazes de promover o desenvolvimento e proliferação das raízes, além do incremento no conteúdo de macronutrientes.

A análise nutricional apresentou diferenças significativas para o conteúdo de macronutrientes (Figura 5). O tratamento BD resultou no maior incremento dos macronutrientes N, P, K, Ca e Mg na parte aérea de Capim Marandu. Esse incremento pode ser relacionado com o aumento da MSR obtido pelo tratamento BD, resultando em uma absorção eficiente de água e nutrientes (Mirza et al., 2001). Os teores de macronutrientes não apresentaram diferenças significativas, no entanto, os teores de N, K, Ca e Mg encontram-se na faixa de teores de macronutrientes considerados adequados para *Uruchloa brizantha* (Silva, 2009). O tratamento BD proporcionou maior acúmulo de Ca na parte aérea de Capim Marandu. Malavolta et al. (1989) afirmaram que além de o Ca estimular o desenvolvimento das raízes, aumentar a resistência a pragas e doenças,

também auxilia na fixação biológica de N (FBN). Além disso, é importante considerar que as estirpes inoculadas possuem capacidade de fixar N_2 , o que favorece a disponibilidade de N no solo, aumentando os valores médios desse nutriente.

Para os parâmetros fotossintéticos não ocorreram diferenças significativas, mostrando que não foram alterados pelos diferentes tratamentos. Nesse contexto, ressalta-se a relevância da idade de crescimento no manejo de gramíneas forrageiras, pois tal fator influencia os parâmetros morfológicos (Gomide et al., 2003) e de crescimento (Oliveira et al., 2000; Gomide et al., 2003; Alexandrino et al., 2005) e dessa forma, reflete sobre os parâmetros fotossintéticos e sobre o total de biomassa produzido (Alexandrino et al., 2005).

A associação entre BD + OEE + SH resultou em menor produção de MSPA. Essa associação pode ter causado um acúmulo dos bioestimulantes. Segundo Steffen et al., (2010), os estímulos dos OE são ideais quando aplicados em pequenas quantidades e Nardi et al., (2009) mostraram que os efeitos benéficos dos AH no crescimento radicular também ocorrem em baixas concentrações. Contudo, a associação BDE + OEE+ SH pode ter gerado stress devido à grande concentração de bioestimulantes num mesmo tratamento e passando de efeito estimulante para inibitório.

4.2 Estilosantes cv. Campo Grande

Ocorreu incremento na massa seca da parte aérea, massa seca da raiz e altura de plantas de estilosantes cv. Campo Grande com a aplicação do tratamento BD + OEE e tratamento controle (Figuras 1, 2 e 3, respectivamente). Os tratamentos OEE + SH e BD + OEE + SH não apresentaram diferenças estatísticas entre eles. O OEE pode ter inibido a ação de BD devido a sua atividade antimicrobiana, pois aumenta a permeabilidade da membrana celular, causando sua desestabilização, evidenciando o efeito do OEE sobre o incremento da massa seca da parte aérea, massa seca da raiz e, conseqüentemente, altura das plantas de estilosantes cv. Campo Grande. A membrana celular bacteriana contém proteínas enzimáticas para manter suas propriedades funcionais, entretanto, alguns óleos essenciais são responsáveis por inibir essas enzimas de alguns agentes patogênicos bacterianos (Bajpai et al., 2012). Steffen *et al.* (2010) concluiu que a concentração de apenas 30 μ L de OEE foi suficiente para gerar desenvolvimento significativo sobre o volume relativo das raízes de *Eucalyptus grandis*. Fageria (1998) observou que em solos

deficientes em P as raízes crescem mais para explorar o maior volume de solo e satisfazer a necessidade nutricional da planta, ou seja, o estresse nutricional força as raízes a crescerem. Já em solos bem adubados, as raízes crescem mais, devido à boa disponibilidade de nutrientes, que é fator determinante para o desenvolvimento vegetal.

As plantas de estilosantes cv. Campo Grande que receberam os tratamentos BD, SH + BD e controle, apresentaram produção de nódulos nas suas raízes. Os tratamentos associados com OEE não apresentaram formação de nódulos. A nodulação pode ser afetada por diversos fatores, entre os quais estão o baixo pH do solo, altas temperaturas ambientais, e a baixa concentração de Ca e P na solução do solo (Andrew, 1976). Outro fator é a textura do solo. A textura do solo utilizado nesse experimento foi classificada como argilosa (56.9 % de argila). Norris (1969) observou na floresta que algumas espécies coletadas em solos argilosos não apresentavam nódulos, embora os apresentassem em solos arenosos. Sylvester-Bradley et al. (1980) observaram que na floresta primária, perto de Manaus, raramente ocorriam nódulos e, sempre que estes estavam presentes, foi em solos arenosos.

A análise nutricional não apresentou diferenças significativas para teores (Tabela 3) e conteúdo (Tabela 4) de macronutrientes na parte aérea de estilosantes cv. Campo Grande. Os teores de N, K, Ca e Mg (Tabela 3) para todos os tratamentos se encontram na faixa adequada de teores de macronutrientes para leguminosa estilosante (Silva, 2009). O acúmulo de nutrientes é influenciado por diversos fatores, dentre outros, características morfológicas e fisiológicas do sistema radicular, a aeração do solo, a disponibilidade de água e de nutrientes no solo e as condições térmicas (Vitti e Mazza, 2002). As bactérias diazotróficas endofíticas utilizadas no experimento são fixadoras biológicas de N, o que favorece a disponibilidade de N no solo aumentando os valores médios dos teores desse nutriente, como demonstra os resultados (Tabela 4).

5 CONCLUSÕES

A utilização de bactérias diazotróficas endofíticas são eficientes no acúmulo de nutrientes, na produção de massa seca da parte aérea e da raiz de Capim Marandu.

Os tratamentos BD e BD + SH demonstram efeito positivo na nodulação em raízes de estilosantes cv. Campo Grande.

A utilização de BD demonstrou eficiência no acúmulo de N na parte aérea de estilosantes cv. Campo Grande.

O tratamento BD + OEE +SH demonstrou um efeito inibitório na produção de massa seca da parte aérea de estilosantes cv. Campo Grande.

De maneira geral, os bioestimulantes não apresentaram efeito positivo na associação com as bactérias diazotróficas. A baixa fertilidade do solo, textura argilosa e alta temperatura durante a condução do experimento são fatores que inibiram esse efeito sob a associação.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, N. O. **Perfil metabólico de cana-de-açúcar tratada com bioinoculante à base de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas**. Tese (Doutorado – Produção Vegetal) – Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2015. p 27.

AGUIRRE, E.; LEMÉNAGER, D.; BACAICOA, E.; FUENTES, M.; BAIGORRI, R.; ZAMARREÑO, A.M.; GARCÍA-MINA, J.M. The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 47, p. 215-223, 2009.

ALEXANDRINO, E.; GOMIDE, J. A.; GOMIDE, C.A.M. Crescimento e desenvolvimento do dossel de *Panicum maximum* cv. Mombaça. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 06, p.2164-2173, 2005.

ANDRADE, C.M.S. de; ASSIS, G.M.L. de; SALES, M.F.L. **Estilosantes Campo Grande leguminosa forrageira recomendada para solos arenosos do Acre**. Acre: Embrapa., 2010. p12. (Circular técnica, 55).

ANDRADE, L. A. DE B.; ABRAHÃO, J. T. M.; GODOY, O. P. Efeitos da incorporação de *Crotalaria juncea* L. sobre a cana-de-açúcar. I. Efeito no desenvolvimento inicial. **STAB**, Piracicaba, v.2, n.3, p.40-43, 1984.

ANDRADE, W. F. de.; ALMEIDA, M. de.; GONÇALVES, A. N. Multiplicação in vitro de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1715-1719, 2006.

ANDREW, C.S. Effect of calcium, pH and nitrogen on the growth and chemical composition of some tropical and temperate legumes: I., nodulation and growth. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v.27, p.611-623, 1976.

BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALDANI, J.I.; KIRCHHOF, G.; DÖBEREINER, J. *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro, v.69, n. 1, 116 p. 1997.

BAJPAI, V. K.; BAEK, K.-H.; KANG, S. C. Control of Salmonella in foods by using essential oils: a review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 722-734, 2012.

BARROSO, A. L. P. **Óleo essencial de *Eucalyptus globulus* e ácidos húmicos: atividade biológica sobre plântulas de *Stylosanthes* (Leguminosae)**. Dissertação. Universidade Vila Velha – ES, 2016.

BAZZICALUPO, M. & OKON, Y. **Associative and endophytesymbiosis**. In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G. & NEWTON, W.E., eds. Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2000. p.409-410.

BITTNER, M.; AGUILERA, M. A.; HERNÁNDEZ, V.; ARBERT, C.; BECERRA, J. ; CASANUEVA, M. E. Fungistatic activity of essential oil extracted from *Peumus boldus*

Mol., *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde and *Laurelia sempervirens* (Ruiz e Pav.) Tul. (Chilean Monimiaceae). **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, v. 69, n. 1, p. 30-37, january/march 2009.

BLUM, U. Designing laboratory plant debris – soil bioassays: some reflections. Em: Inderjit, Dakhini, K. M.N.; Foy, C.L. (eds.). Principles and practices in plant ecology. **Boca Raton**: CRC Press LLC, p.17-23, 1999.

BONALDO, S.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; TESSMANN, D.J.; SCAPIM, C.A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 29:128-134, 2004.

BONFIM-SILVA, E. M. Níveis críticos de fósforo para *Brachiaria brizantha* e suas relações com características físicas e químicas em solos de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 28:281-288, 2004

BOYHAN, G. E.; RANDLE, W.M.; PURVIS, A.C. Evaluation of growth stimulants on short-day onions. **Hortecchnology**, Alexandria, v. 11, n.1, p. 38-42, 2001.

BRAZ, A. J. B. P; SILVEIRA, P. M; KLIEMANN, H. J.; ZIMMERMANN, F. J. P. 2004. Acumulação de nutrientes em folhas de milheto e dos capins braquiária e mombaça. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 34:83-87.

BRIMECOMBE, M. J.; LEIJ, F. A. de; LYNCH, J. M. The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. In: PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. **The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface**. Ed. Marcel Dekker, New York, 2001. 424 p.

CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J.W. 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and Soil** 383: 3-41

CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A.O.; OLIVARES, F.L. & FAÇANHA, A.R. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1951-57, 2002.

CANELLAS, L.P.; SANTOS, G.A. **Humosfera – Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas**. Santos, Campos de Goytacazes. 309, 2005.

CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J.O.; CURI, N.; MOREIRA, F.M.S. Efeitos da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e da aplicação de fósforo no estabelecimento de forrageiras em solo degradado. **Pesq. agropec. bras.** v.34, 9:1669-1677, 1999.

CARON, V. C; GRAÇAS, J. P.; CASTRO, P. R. C. Condicionadores do solo: ácidos húmicos e fúlvicos. **Série Produtor Rural**, n. 58, 46 p. 2015.

CEDAGRO. **Levantamento de áreas agrícolas degradadas no estado do Espírito Santo**. Documento Resumo. Vitória, 2012.

CHEN, Y.; NOBILI, M.; AVIAD, T. Effects of humic substances on plant growth. In: MACCARTHY, P.; CLAPP, C.E.; MALCOM, R.L.; BLOOM, P.R. (Ed.). **Humic substances in soils and crop science: selected readings**. Madison: Soil Science Society of America, 1990. p. 161-186.

- CHEN, Y.; De Nobili, M.; Aviad, T. Stimulatory effects of humic substances on plant growth. In: **Soil organic matter in sustainable agriculture** (Magdoff F., Weil R.R., eds). CRC Press, NY, USA. 103-129, 2004.
- CONCEICAO, P. M.; VIEIRA, H. D.; CANELLAS, L. P.; MARQUES JR, R. B. ; OLIVARES, F. L. Recobrimento de sementes de milho com acidos humicos e bacterias diazotroficas endofiticas. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira** (Online) v. 43, p. 545-548. 2008.
- CONCEIÇÃO, P. M.; VIEIRA, H. D.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; CONCEIÇÃO, P. S. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. **Ciência Rural**. Santa Maria, 2009.
- COSTA, N. M. S.; FERREIRA, M. B. Some brazilian species of *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.). **Biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sidney: Academic Press, 1984. p. 23-48.
- CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H.; BATISTA, M.A. Plantas medicinais e alelopatia. **Biotechnology Ciência e Desenvolvimento**, Brasília. 15:28-34, 2000.
- CUNHA, E. S.; MARTINS, D. S; CARVALHO, G. J. A.; ESPINDOLA, J. A. A.; Adubação orgânica e teores de nutrientes no capim-limão. **Revista da Biologia** (2012) 9(1): 1-5.
- DELASQUIS, P.J.; STANICH, K.; GIRARD, B.; MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **Food Microbiology**, Illinois. 74:101-109, 2002.
- DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, Cidade, v. 44, n. 5, 1992. p. 310-313.
- DUFOUR, J-P. & GOFEEAU, A. Molecular and kinetic properties of the purified plasma membrane ATPase of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Eur. J. Biochem.** 1980. 105: 145-154.
- EDYE, L. A.; CAMERON, D. G. Prospects for *Stylosanthes* improvement and utilization. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.). **Biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sidney: Academic Press, 1984. p. 571-587.
- EMBRAPA. **Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, *Brachiaria brizantha* cv. Marandu**. Campo Grande, 1984. 31p. (EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 21).
- EMBRAPA. **Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de Métodos de Análise de Solo**. 2. ed. ver. atualiz. Rio de Janeiro, 1997. 212p. il. (EMBRAPA/CNPS-RJ. Documentos, 1).
- EMBRAPA. **Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Métodos de Análise de Tecidos Vegetais Utilizados na Embrapa Solos**. 21. ed. Rio de Janeiro, 2000. 41 p.. (EMBRAPA Solos. Circular Técnica, 6).
- FABRICE, C. E. S.; SOARES FILHO, C. V.; PINTO, M. F.; PERRI, S. H. V.; CECATO, U.; MATEUS, G. P. Recuperação de pastagens de *Brachiaria decumbens* degradada com introdução de *Stylosanthes* e adubação fosfatada. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, Salvador, v.16, n.4, p.758-771 out-dez, 2015.

- FAGERIA, N. K. Eficiência de uso de fósforo pelos genótipos de feijão. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, v. 2, n. 2, p.128-131, 1998.
- FERLINI, H. A. Co-Inoculación en Soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. Artículos Técnicos – Agricultura. 2006. Disponível em: . Acesso: 01 maio 2015.
- FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, n.12, p.175-204, 2000.
- FERREIRA, D.F. SisVar®: Sistema de análise de variância para dados balanceados, versão 4.1. DEX/UFLA, Lavras. (Software estatístico), 2011.
- FERREIRA, M. B.; COSTA, N. M. S. **O gênero *Stylosanthes* Sw. no Brasil**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1979. 108 p.
- FRADE, DA R.; CANELLAS, L. P., OLIVARES, F. L. **Anatomia e ultraestrutura de plantas inoculadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal na presença de ácidos húmicos**. In: IX Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, 2011, Aracaju-SE. (resumo expandido)
- GOETZE, M; THOMÉ, G. C. H. Efeito alelopático de extratos de *Nicotiana tabacum* E *Eucalyptus grandis* SOBRE A GERMINAÇÃO DE TRÊS ESPÉCIES DE HORTALIÇAS. **R. bras. Agrociência**, v. 10, n. 1, p. 43-50, jan-mar, 2004.
- GOMIDE, J.A. Morfogênese e análise de crescimento de gramíneas tropicais. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL EM PASTEJO, 1997, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1997.p.411-430.
- GOMIDE, C. A. M.; GOMIDE, J. A.; ALEXANDRINO, E. Índices morfogênicos e de crescimento durante o estabelecimento e a rebrotação do capim-mombaça (*Panicum maximum* Jacq.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 04, p. 795-803, 2003.
- GUERRA, J.C.M.; SANTOS, G. DE A.; SILVA, L.S. DA; CAMARGO, F.A.O. Macromoléculas e substâncias húmicas. In: SANTOS, G. de A. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. 2.ed. Porto Alegre: Metropole, 2008. p.19-26.
- HUNGRIA, M. & VARGAS, M. Environmental factors impacting N₂ fixation in legumes grown in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crop. Res.** v. 65, p. 151-164. 2000.
- IBRAHIM, M.; NISSINEN, A.; PROZHERINA, N.; OKSANEN, E.; HOLOPAINEN, J. The influence of exogenous monoterpene treatment and elevated temperature on growth, physiology, chemical content and headspace volatiles of two carrot cultivars (*Daucus carota* L.). **Environmental and Experimental Botany**, Paris, 56(1):95-107, 2006.
- IVANOFF, M. E. A. Desempenho de cultivares de girassol em função do manejo da adubação nitrogenada e potássica em condições edafoclimáticas na savana de Boa Vista em Roraima. 2009. 54 f. **Dissertação (Mestrado em Agronomia)** - Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2009.

- JAIN, D.K., PATRIQUIN, D.G. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat roots hairs. *Canadian Journal of Microbiology* 31: 206-210. 1985.
- JEFFERIES, N.W. Herbage production on a gamble oak range in south western Colorado. **Journal of Range Management**, v.18, n.2, p.212-213, 1965.
- JOHNSON, C.M.; ULRICH, A. **Analytical methods for use in plants analyses**. Los Angeles, University of California, p.32-33. (Bulletin, 766), 1959.
- JOHNSTON-MONJE, D.; RAIZADA, M.N. Plant and Endophyte Relationships: Nutrient Management. **Comprehensive Biotechnology** (Second Edition). Canada, v.4, p. 713-727. 2011.
- KAUSHIK, P., GARG, V. K. (2003) Vermicomposting of mixed solid textile mill sludge and cow dung with the epigeic earthworm *Eisenia foetida*. **Bioresour. Technol.**, 90: 311-316.
- KONONOVA, M.M. **Materia organica del suelo: su naturaleza, propiedades y metodos de investigacion**. Barcelona: Oikos-Tau, 365p. 1982.
- LOPES, J.; EVANGELISTA, A. R.; FORTES, C. A.; PINTO, J. C.; NETO, A. E. F.; SOUZA, R. M. Nodulação e produção de raízes do estilosantes mineirão sob efeito de calagem, silicatagem e doses de fósforo. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 99-107, jan./fev. 2011
- LUDLEY, K.E.; ROBINSON, C.H.; JICKELLS, S.; CHAMBERLAIN, P.M.; WHITAKER, J. Potential for monoterpenes to affect ectomycorrhizal and saprotrophic fungal activity in coniferous forest is revealed by novel experimental system. **Soil Biology & Biochemistry**, Brisbane. v.41, 1:117-124, 2009.
- MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; TEIXEIRA, D. do. A.; ZAUZA, E. A. V. Indução do enraizamento e crescimento do eucalipto por rizobactérias: efeito da adição de fonte alimentar e da composição do substrato de enraizamento. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 589-597, 2007.
- MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; ZARPELON, T. G.; SIQUEIRA, L. de. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 843-851, 2005.
- MAIRESSE, L. A. da S. **Avaliação da bioatividade de extratos de espécies vegetais, enquanto excipientes de aleloquímicos**. Santa Maria, 2005, 340 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, A.S. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações (2. ed.). Piracicaba, **Potafos**. 319p, 1997.
- MANNETJE, L. Considerations on taxonomy of the genus *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.). **Biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sidney: Academic Press, 1984. p.1-21.
- MARQUES Jr., R.B.M.; Canellas, L. P.; Silva, L. G.; Olivares, F. L. Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1121-1128. 2008.

MARQUES JÚNIOR, R.B. **Potencial do uso combinado de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas para bioestimulação de plantas.** (2006). 88f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, UENF, Campos dos Goytacazes.

MARQUES-JÚNIOR, R.B. **Potencial de uso agrícola do uso em conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas.** (2008). Campos dos Goytacazes, Universidade Estadual do Norte Fluminense (Dissertação de Mestrado), 85p.

MEDICE, R. et al. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 83-90, jan./fev. 2007.

MIRZA, M.S., AHMAD, W., LATIF, F., HAURAT, J., BALLY, R., NORMAND, P., MALIK, K.A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. **Plant and Soil** 237: 47-54. 2001.

MORA, V.; BACAICOA, E.; ZAMARREÑO, A.M.; AGUIRRE, E.; GARNICA, M.; FUENTES, M.; GARCÍA-MINA, J.M. Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 167, p. 633-642, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.2, p.74-99, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae** 1(2): 74-99, 2010.

MOTA, V. S.; TURRINI, R. N.T.; POVEDA, V.B. Antimicrobial activity of Eucalyptus globulus oil, xylitol and papain: a pilot study. **Rev Esc Enferm USP**, 49(2):215-219, 2015.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A.; VIANELLO, A. Physiological effects of humic substances on higher plants. **Soil Biol. & Biochem.** 34: 1527-1536, 2002.

NORRIS, D.O. Observations on the nodulation status of rainforest leguminous species in Amazonia and Guyana. **Trop. Agric.** (Trim) 46: 145-151. 1969

OKON, Y. & LABANDERA-GONZALEZ, C. A. (1994) Agronomic applications of Azospirillum – na evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, p. 1591-1601, 1994.

OLIVEIRA, M. A. O; PEREIRA, O. G.; GOMIDE, J. A.; HUAMAN, C. A. M.; GARCIA, R.; CECO, P. R. Análise de crescimento do capim-bermuta ‘Tifton 85’ (*Cynodon* spp.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 06, p. 1930-1938, 2000.

OLIVEIRA, P. P. A.; OLIVEIRA, W. S.; BARIONI, W. J.; Produção de forragem e qualidade de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com *Azospirillum brasilense* e fertilizada com nitrogênio. **Embrapa pecuária sudeste**, São Carlos, SP, 2007

OLIVEIRA, P.P.A. Gases de efeito estufa em sistemas de produção animal brasileiros e a importância do balanço de carbono para a preservação ambiental. **Revista Brasileira de Geografia Física** V. 08, número especial do IV SMUD (2015) 623-634, 2015.

OWEN, D., WILLIAMS, A.P., GRIFFITH, G.W., WITHERS, P.J.A. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. **Applied Soil Ecology** 86: 41-54, 2015

PARRADO, J.; BAUTISTA, J.; ROMERO, E.J.; GARCÍA-MARTÍNEZ, A.M.; FRIAZA, V.; MEJADA, M. Production of a carob enzymatic extract: potential use as a biofertilizer. **Bioresour. Technol.** 99:2312-2318, 2007.

PARRADO, J.; ESCUDERO, M.L.; FRIAZA, V.; GONZÁLEZ-MIRET, M.L.; GARCÍA-MARTÍNEZ, A.M.; BAUTISTA, J.; HEREDIA, F.J. Enzymatic vegetable extract with bio-active components: influence of fertiliser on the colour and anthocyanins of red grapes. **J. Sci. Food Agric.** 87:2310-2318, 2007.

PEREIRA, W.; LEITE, J.M.; HIPÓLITO, G. de S.; SANTOS, C.L.R. dos; REIS, V.M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Revista Ciência Agronômica**, v.44, p.363-370, 2013. DOI: 10.1590/S1806-66902013000200020.

PINHEIRO, P. L. **Estímulo ao crescimento de *Brachiaria decumbens* com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – UFES. Alegre, 2014.

PINTON, R.; CESCO, S.; SANTI, S. AGNOLON, F.; VARANINI, Z. Water-extractable humic substances enhance iron deficiency responses by Fe-deficient cucumber plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 210, p. 145-157, 1999

QUAGGIOTTI, S.; RUPERTI, B.; PIZZEGUELLO, D.; FRANCIOSO, O.; TUGNOLLI, V.; MARDI, S. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 803-813, 2004.

RAMESH, C.R.; BHAG, M.; HAZARA, C.R.; SUKANYA, D.H.; RAMAMURTHY, V.; CHAKRABORTY, S. Status of Stylosanthes development in other countries. III. Stylosanthes development and utilization in India. **Trop. Grasslands**. 31:467-475, 1997.

RAYMAN, P.R. Minha experiência com *Brachiaria brizantha*. Campo Grande, **Rayman's Seeds Sementes de Pastagens Tropicais**, 1983. 3p.

REDDY, N.V.; DAS, R.B.; RAO, D.G.; KORWAR, G.R. Role of stylo legume (*S. hamata*) in improving soil fertility and crop production in Alfisols of semiarid tropics. **Ind. J. Dryland Agric. Res. Dev.** 4:48-54, 1989.

RIBEIRO, N. V. S.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I. **Interação de bactérias diazotróficas com genótipos de *Brachiaria* spp. cultivadas em casa de vegetação**. XVII Semana Científica Johanna Dobereiner, 2017.

ROSE, M. T.; PATTI, A. F.; LITTLE, K. R.; BROWN, A. L. A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. **Advances in Agronomy**, 124: 37-89, 2014.

RUSSO, R.O.; BERLYN, G.P. The use of organica biostimulants to help low input sustainable agriculture. **Journal of Sustainable Agriculture, Binghamton**. v.1, 2:19-42, 1990.

SANDI, J.T.T.; BLANCO, R.F. Atividade inseticida do óleo essencial obtido de eucalipto, *Eucalyptus globulus* Labill (Myrtaceae), sobre o gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais*, (Coleoptera: curculionidae), **Biology & Health Journal**, Dois Vizinhos. v.1, 1:101-106, 2007.

SANTOS Jr. J. D. G., MONTEIRO, F. A.; LAVRES Jr., J. Análise de crescimento do Capim-Marandu submetido a doses de Nitrogênio. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.6, p.1985-1991, 2004.

SAS INSTITUTE. **Statistical analysis system user's guide**: version 9.1. Cary, 2004. Software.

SCHAWN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 36., 2003, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: SBF, 2003. p. 54- 56.

SILVA, F. C.; **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2 ed. Brasília, 2009. p. 83-84.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; OLIVEIRA, L.A. de; PODESTA FILHO. J.A. de; St. JOHN, T.V.— Nodulation of legumes, nitrogenase activity of roots and occurrence of nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. in representative soils of Central Amazônia. **Agro-Ecosystems**, 6: 249-26. 1980

SHARIF, M.; KHATTAK, R. A.; SHARIF, M. S. Effect of diferente levels of lignitic coal derived humic acid on growth of maize plants. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 33, n. 19/20, p. 3567-3580, 2002.

SOUZA, V. C. de. et al. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 3, p. 612–618, jul./set. 2006.

STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. StatSoft, Inc. (2007). www.statsoft.com.

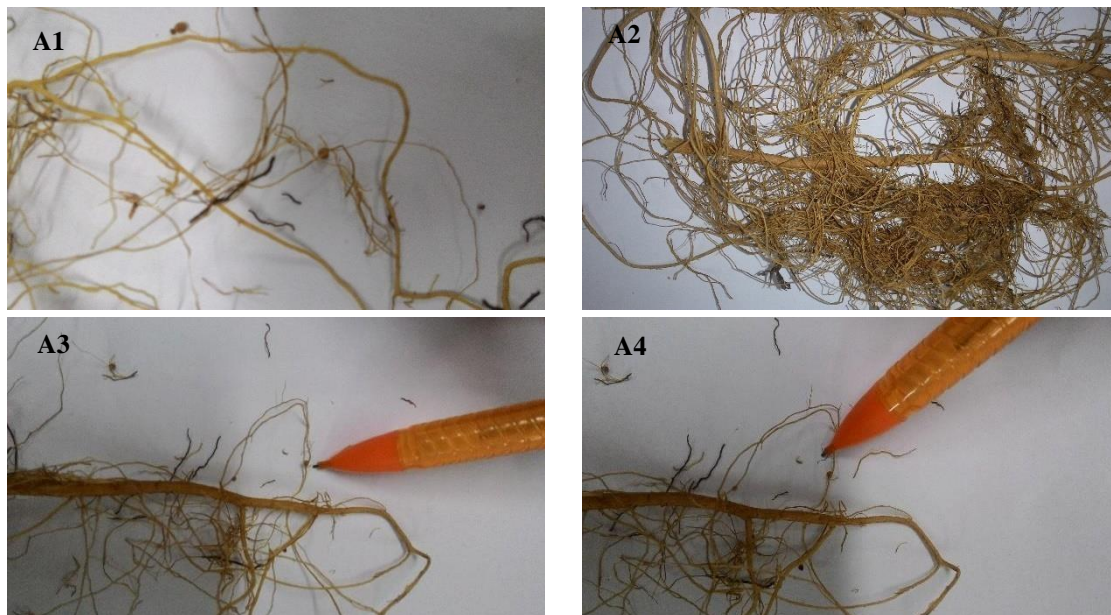
STEFFEN, R.B.; ANTONIOLLI, Z.I.; BOSENBECKER, V.K.; STEFFEN, G.P.K.; LUPATINI, M.; CAMPOS, Â.D.; GOMES, C.B. Avaliação de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de *Meloidogyne graminicola* em arroz irrigado. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba. v.32, 2:127-135, 2008.

STEFFEN, R.B.; ANTONIOLLI, Z.I.; BOSENBECKER, V.K.; STEFFEN, G.P.K.; LUPATINI, M.; CAMPOS, Â.D.; GOMES, C.B. Avaliação de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de *Meloidogyne graminicola* em arroz irrigado. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba. v.32, 2:127-135, 2010.

STEVENSON, F.J. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions**. New York: Wiley, 496p. 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 4. ed. SinauerAssociates, Inc. Massachusetts, USA, 2006. 764 p.

- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2013. **Fisiologia Vegetal**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed. 918p, 2013.
- TAN, K.H.; TANTIWIRAMANOND, D. Effect of Humic Acids on Nodulation and Dry Matter Production of Soybean, Peanut, and Clover. **SOIL SCI. SOC. AM. J.**, 47, 1983.
- TEJADA, M.; GONZALEZ, J. L.; Influence of foliar fertilization with amino acids and huic acids on productivity and quality of asparagus. **Biological Agriculture & Horticulture, Oxford**, v. 21, n. 3, p. 277-291, 2003.
- TREVISAN, S.; PIZZEGUELLO, D.; REPERTI, B.; FRANCIOSO, O.; SASSI, A.; PALME, K.; QUAGGIOTTI, S.; NARDI, S. Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA 19 gene and DR5 synthetic element in *Arabidopsis*. **Plant Biology**, Berlin, v. 12, p. 604-614, 2010.
- VACCARO, S.; ERTANI, A.; NEBBIOSO, A.; MUSCOLO, A.; QUAGGIOTTI, S.; PICCOLO, A.; NARDI, S. Humic substances stimulate maize nitrogen assimilation and amino acid metabolism at physiological and molecular level. **Chemical Biological Technologies in Agriculture**, 2: 5, 2015
- VASCONCELOS, A.C.F.; ZHANG, X.Z.; ERVIN, E.H.; KIEHL, J.D. 2009. Enzymatic antioxidant responses to biostimulants in maize and soybean subject to drought. **Scientia Agricola** 66: 395-402.
- VITTI, G.C., MAZZA, J.A., Planejamento, estrategias de manejo e nutricao da cultura de cana-de-acucar. Piracicaba: POTAFOS. 2002. 16p. (**Encarte tecnico/Informacoes Agronomicas, 97**).
- WILLIAMS R.J.; REID R.; SCHULTZE-KRAFT R.; SOUZA COSTA N.M.; THOMAS B.D. Natural distribu tion of Stylosanthes. Em: Stace HM, Edye LA, editors. The biology and agronomy of Stylosanthes. **Sydney: Academic Press**.73-101, 1984
- XINGFENG, Z.; HANPING, X.; ZHIAN, L.; PING, Z.; BO, G. Potential of four forage grasses in remediation of Cd and Zn contaminated soils. **Bioresource Technology**. 101:2063-2066, 2010.
- YEOMANS, J.C. & BREMNER, J.M. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, 19:1467-1476, 1988.
- ZANDONADI, D. B. **Bioatividade de acidos humicos: promocao do desenvolvimento radicular e atividade das bombas de H⁺**. Tese (Mestrado em Producao Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 161p, 2006.

ANEXOS

Anexo 1. Nodulação em raízes de estilosantes cv. Campo Grande sem inoculação (A1 e A2) e com inoculação (A3 e A4), respectivamente, submetidas às concentrações de substâncias húmicas (SH).