

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CÂMPUS DE DRACENA

Leonardo Aurélio Silva

Médico Veterinário

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA E COMPOSIÇÃO
BROMATOLÓGICA DA ALFAFA SUBMETIDA A
COINOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS**

Dracena

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CÂMPUS DE DRACENA

Leonardo Aurélio Silva

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA E COMPOSIÇÃO
BROMATOLÓGICA DA ALFAFA SUBMETIDA A
COINOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia – Unesp, Campus de Ilha Solteira como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Cecílio Viegas Soares Filho

Dracena

2020

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvida pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação
Campus de Dracena

S586

Silva, Leonardo Aurélio.

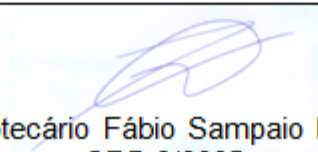
Produção de biomassa e composição bromatológica da alfafa submetida a coinoculação com bactérias. / Leonardo Aurélio Silva. -- Dracena: [s.n.], 2020.

52 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp). Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2020.

Orientador: Cecílio Viegas Soares Filho

1. Leguminosa. 2. Fixação simbiótica de nitrogênio. 3. Bactérias diazotróficas. 4. N-total. I. Título.



Bibliotecário Fábio Sampaio Rosas
CRB 8/6665



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Dracena



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Produção de biomassa e composição bromatológica da alfafa submetida a
coincubação com bactérias

AUTOR: LEONARDO AURÉLIO SILVA

ORIENTADOR: CECILIO VIEGA SOARES FILHO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIA E
TECNOLOGIA ANIMAL, área: Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CECILIO VIEGA SOARES FILHO

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de
Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. REGES HEINRICHS

Departamento de Agronomia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - UNESP

Dr. ADONIS MOREIRA
EMBRAPA

Dracena, 26 de junho de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Leonardo Aurélio Silva, nascido em 18 de setembro de 1984 no município de Jales, São Paulo, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Camilo Castelo Branco “Unicastelo”, Campus de Fernandópolis em janeiro de 2011. Professor do Ensino Técnico do Centro Paula Souza, Campus Etec de Jales-SP, desde março de 2011. Ingressou, no curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal em agosto de 2018, na área de Produção Animal.

À minha mãe Angélica, meu pai Marcus, meu irmão Vinicius e minha esposa Isadora Cardoso, pelo amor, incentivo, carinho, força e paciência, DEDICO.

A Deus, por me dar forças e saúde para completar essa jornada.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho “, em especial à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira e à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, pelo suporte e oportunidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)– Código de Financiamento 001.

Ao Professor Associado Cecílio Viegas Soares Filho por esses anos de orientação, aconselhamentos, paciência na condução do trabalho e redação da dissertação, contribuindo no meu amadurecimento e crescimento pessoal e profissional, minha eterna gratidão, muito obrigado.

Aos professores/pesquisadores que aceitaram compor a banca de qualificação e defesa.

Aos docentes que contribuíram para minha formação acadêmica, proporcionando-me experiências incríveis ao longo do mestrado, contribuindo para o meu crescimento intelectual.

Aos Servidores Técnicos Administrativos da UNESP, em especial ao Carlos Renato e ao Laércio Marcon, pela contribuição na execução de coletas e análises do experimento.

Aos alunos e amigos pelo companheirismo e ajuda na execução dos trabalhos, em especial Jaqueline da Silva Boregio, Amário Nuno Meireles Duarte, José Hernandes, Vinicius Brito e Milton Augusto.

Aos meus familiares e amigos por fazerem parte da minha vida e tornarem os meus dias cheios de paz e harmonia.

“Se você não for cuidadoso, os jornais
farão você odiar as pessoas que estão
sendo oprimidas, e amar as pessoas que
estão oprimindo”.

Malcom X

RESUMO

A alfafa apresenta alto potencial de produção de forragem, qualidade proteica, alta palatabilidade e digestibilidade, capacidade de fixação biológica de nitrogênio no solo e baixa sazonalidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de estirpes de *Sinorhizobium meliloti* e *Azospirillum brasilense*, composição bromatológica e na produção de massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raízes (MSR) da alfafa cultivada em Argissolo Vermelho Amarelo distrófico. Foi conduzido um ensaio em condições controladas de casa de vegetação. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com cinco repetições, com medidas repetidas no tempo. Os tratamentos foram: controle sem N-mineral e sem inoculação; controle com N-mineral e sem inoculação (controle positivo); e os seguintes tratamentos com N-mineral e inoculados, *S. meliloti* SEMIA 116; *S. meliloti* SEMIA 116 + coinoculado com *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6); *S. meliloti* SEMIA 134; *S. meliloti* SEMIA 134 + coinoculação Ab-V5 + Ab-V6; *S. meliloti* SEMIA 135; *S. meliloti* SEMIA 135 + coinoculação Ab-V5 + Ab-V6. A produção de MSPA por cortes e a MSPA acumulada, para os tratamentos coinoculados com *S. meliloti* Ab-V5 + Ab-V6 produziram 63% e 39% a mais que o controle positivo, respectivamente. Para a MSR acumulada o tratamento coinoculado com *S. meliloti* SEMIA 134 e Ab-V5 + Ab-V6, produziu 64% a mais que o controle positivo. O teor e acúmulo de nitrogênio da parte aérea para o tratamento coinoculado com *S. meliloti* SEMIA 135 e Ab-V5 + Ab-V6, foi 59% e 157% a mais que o controle positivo, respectivamente. Os teores de proteína bruta (PB) e digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS) para os tratamentos coinoculados com *S. meliloti* SEMIA 135 e Ab-V5 + Ab-V6, apresentou 19% e 13% a mais quando comparado com o controle positivo, respectivamente. A alfafa coinoculada com Ab-V5 + Ab-V6 não diferiu das plantas inoculadas somente com as cepas de *S. meliloti*. No entanto, para a maioria das variáveis foi superior ao tratamento com N e sem inoculação, ou seja, a coinoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal, promoveram resultados positivos no desenvolvimento da alfafa no índice relativo de clorofila, na produção de MSPA, MSR, PB, DIVMS, e no teor acumulado de N da planta e suas raízes.

Palavras-chave: Leguminosa. Fixação simbiótica de nitrogênio. Bactérias diazotróficas. N-total.

ABSTRACT

Alfalfa has high forage production potential, protein quality, high palatability and digestibility, capacity for biological nitrogen fixation in the soil and low seasonality. The objective of this work was to evaluate the efficiency of strains of *Sinorhizobium meliloti* and *Azospirillum brasilense*, bromatological composition and in the yield of dry matter of the shoot (SDMY) and dry mass of roots (RDM) of the alfalfa cultivated in Dystrophic Red Yellow Argisol. A trial was conducted under controlled greenhouse conditions. The experimental design was in randomized blocks with five repetitions, with repeated measures over time. The treatments were: control without N-mineral and without inoculation; control with N-mineral and without inoculation (positive control); and the following treatments with N-mineral and inoculated, *S. meliloti* SEMIA 116; *S. meliloti* SEMIA 116 + co-inoculated with *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6); *S. meliloti* SEMIA 134; *S. meliloti* SEMIA 134 + co-inoculated with Ab-V5 + Ab-V6; *S. meliloti* SEMIA 135; *S. meliloti* SEMIA 135 + co-inoculated with Ab-V5 + Ab-V6. The production of SDMY by cuts and the accumulated SDMY for the co-inoculated treatments with *S. meliloti* and Ab-V5 + Ab-V6 produced 63% and 39% more than the positive control, respectively. For accumulated RDM, the co-inoculated treatment with *S. meliloti* SEMIA 134 plus Ab-V5 + Ab-V6, produced 64% more than the positive control. The nitrogen content and uptake of the aerial part for the co-inoculated treatment with *S. meliloti* SEMIA 135 and Ab-V5 + Ab-V6, was 59% and 157% more than the positive control, respectively. The crude protein (CP) and in vitro dry matter digestibility (IVDMS) contents for the co-inoculated treatments with *S. meliloti* SEMIA 135 and Ab-V5 + Ab-V6, showed 19% and 13% more when compared to the control positive, respectively. Co-inoculated alfalfa with *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 did not differ from plants inoculated only with strains of *S. meliloti*. However, for most variables, it was superior to treatment with N and without inoculation, that is, co-inoculation with plant growth promoting bacteria, promoted positive results in the development of alfalfa in the relative chlorophyll index, in the production of SDMY, RDM, PB, DIVMS, and the N nutrient uptake of the plant and its roots.

Keywords: Legume. Symbiotic nitrogen fixation. Diazotrophic bacteria. Total-N.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1–** Filogenia de máxima verossimilhança com base nas seqüências genéticas concatenadas de *glnB* + *gyrB* + *rpoB* de espécies de *Sinorhizobium* (= *Ensifer*). Valores de inicialização > 70% são indicados nos nós. O modelo utilizado foi o General Time Reversible, com sites distribuídos por gama (G). Bar indica cinco substituições por 100 posições de nucleotídeo.....**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 2–** Dendrograma das cepas de alfafa SEMIA 116, SEMIA 134 e SEMIA 135 utilizadas em inoculantes comerciais para a forragem no Brasil, com base na análise de agrupamentos de produtos BOX-PCR, utilizando o algoritmo UPGMA e o índice Jaccard, com 3% de tolerância. O SEMIA 103 também é um simbiote da alfafa, enquanto o CIAT 899 é um simbiote do feijão comum.....**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Altura das plantas (cm) de alfafa inoculadas com <i>S. meliloti</i> e coinoculadas com <i>A. brasilense</i> Ab-V5 + Ab-V6	27
Tabela 2 –	Índice relativo de clorofila (SPAD) de alfafa inoculadas com <i>S. meliloti</i> e coinoculadas com <i>A. brasilense</i> Ab-V5 + Ab-V6	28
Tabela 3 –	Número de perfilhos das plantas de alfafa inoculadas com <i>S. meliloti</i> e coinoculadas com <i>A. brasilense</i> Ab-V5 + Ab-V6	29
Tabela 4 –	Produção de massa seca (g vaso ⁻¹) das plantas de alfafa inoculadas com <i>S. meliloti</i> e coinoculadas com <i>A. brasilense</i> Ab-V5 + Ab-V6	30
Tabela 5 –	Produção acumulada de massa seca da parte aérea (g vaso ⁻¹), massa seca de raízes (g vaso ⁻¹) e volume de raízes de alfafa inoculadas com <i>S. meliloti</i> e coinoculadas com <i>A. brasilense</i> Ab-V5 + Ab-V6	30
Tabela 6 –	Médias do teor de nitrogênio total (g kg ⁻¹) das plantas de alfafa inoculadas com <i>S. meliloti</i> e coinoculadas com <i>A. brasilense</i> Ab-V5 + Ab-V6	33
Tabela 7 –	Acúmulo de nitrogênio (g kg ⁻¹) das plantas de alfafa inoculadas com <i>S. meliloti</i> e coinoculadas com <i>A. brasilense</i> Ab-V5 + Ab-V6	35
Tabela 8 –	Teor de nitrogênio total (g kg ⁻¹) e acúmulo de N-total (g kg ⁻¹) das raízes de alfafa inoculadas com <i>S. meliloti</i> e coinoculadas com <i>A. brasilense</i> Ab-V5 + Ab-V6	36
Tabela 9 –	Teor de proteína bruta (%) das plantas de alfafa inoculadas com <i>S. meliloti</i> e coinoculadas com <i>A. brasilense</i> Ab-V5 + Ab-V6	39
Tabela 10 –	Teores de fibra em detergente neutro (%) das plantas de alfafa inoculadas com <i>S. meliloti</i> e coinoculadas com <i>A. brasilense</i> Ab-V5 + Ab-V6	40
Tabela 11 –	Teores de fibra em detergente ácido (%) das plantas de alfafa inoculadas com <i>S. meliloti</i> e coinoculadas com <i>A. brasilense</i> Ab-V5 + Ab-V6	41
Tabela 12 –	Digestibilidade <i>in vitro</i> na MS (%) das plantas de alfafa inoculadas com <i>S. meliloti</i> e coinoculadas com <i>A. brasilense</i> Ab-V5 + Ab-V6	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Estado da Arte no Uso de Leguminosas	14
2.2 <i>Medicago Sativa L.</i>	15
2.3 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL	17
2.3.1 <i>Azospirillum spp.</i>	18
2.3.2 Coinoculação entre <i>sinorhizobium meliloti</i> e <i>azospirillum brasilense</i>	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Local, Solo, Espécie e Estirpes Utilizadas	21
3.2 Delineamento Experimental e Tratamentos	24
3.3 Avaliações e Análises Realizadas	24
3.4 Análise Estatística	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Caracterização das Estirpes	26
4.2 Produção de Biomassa da Parte e Raízes, Perfilhamento e Spad	26
4.3 Teor e Acúmulo de N-Total na Parte Aérea e Raízes	32
4.4 Composição Bromatológica	38
5 CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A alfafa (*Medicago sativa* L.) apresenta importância cosmopolita, seja pela abrangência da área explorada ou por possuir aspectos importantes, tais como, alto potencial de produção, qualidade proteica, alta palatabilidade e digestibilidade, capacidade de fixação biológica do nitrogênio (FBN) e baixa sazonalidade na produção de forragem, sendo assim, há muito interesse pelo seu cultivo. É uma das culturas mais importantes para a alimentação de rebanhos leiteiros especializados e outros animais de alto valor zootécnico, usada também para alimentação humana, indústria de cosméticos e indústria farmacêutica (FERREIRA *et al.*, 1995; RASSINI; FERREIRA; CAMARGO, 2008).

A redução na disponibilidade de N é considerada o fator mais limitante para leguminosas tropicais, resultando em baixa produção de massa seca. O ciclo de N é importante para a manutenção do estado nutricional da alfafa (FERREIRA *et al.*, 1995).

Sendo uma leguminosa, a alfafa é capaz de se associar simbioticamente com bactérias conhecidas coletivamente como rizóbios, estabelecendo o processo de fixação biológica do N, havendo relatos de aportes elevados de N para as plantas, podendo chegar a 470 kg de N ha⁻¹ (ORMEÑO-ORRILLO *et al.*, 2013). As principais bactérias simbiontes de alfafa pertencem ao gênero *Ensifer*, tendo como sinônimo *Sinorhizobium*, mas previamente classificado como *Rhizobium*. *Sinorhizobium meliloti* e *Sinorhizobium bmediace* são os principais simbiontes relatados em diversos países (SOARES *et al.*, 2020). No Brasil, há três estirpes de rizóbios que são utilizadas em inoculantes comerciais para a alfafa, que foram validadas há mais de duas décadas e com raros ensaios conduzidos com as mesmas (SOARES *et al.*, 2020).

Além dos rizóbios, outras bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) podem ser benéficas, especialmente sob condições de baixa fertilidade do solo (HUNGRIA *et al.*, 2010). Acredita-se que BPCP beneficiam o crescimento da planta por uma matriz de mecanismos que podem agir simultaneamente ou em reação cascata (BASHAN; DE-BASAN, 2010). Bactérias promotoras de crescimento de plantas também foram utilizadas com sucesso por Dominguez-Núñez *et al.* (2012) para inocular algaroba (*Prosopis juliflora*) usada para a alimentação de gado. Além disso, a inoculação de forragens de diferentes espécies com *Azospirillum brasilense* tornou possível reduzir as quantidades de N-fertilizantes aplicada sem comprometer

a produção de massa seca e perfilhamento, além de aumentar o aproveitamento do fósforo (P) no solo (VOGEL *et al.*, 2014).

Considerando as principais limitações atuais e potenciais da FBN com a alfafa e os benefícios atribuídos a diversas culturas pela inoculação com *A. brasilense*, deduz que a coinoculação pode melhorar a produção de massa de forragem. Embora existam em outros países estudos que reportem os benefícios da coinoculação de rizóbios e *Azospirillum*, não há relatos sobre o desempenho de alfafa frente à coinoculação no Brasil.

Sendo assim, com o objetivo de avaliar a eficiência agronômica da coinoculação de estirpes de *Sinorhizobium meliloti* e *Azospirillum brasilense* na produção de biomassa da parte aérea e raízes, perfilhamento, índice relativo de clorofila, teor e acúmulo de nitrogênio e composição bromatológica da alfafa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estado da Arte no Uso de Leguminosas

Nos sistemas intensivos de produção de leite, os gastos com o uso de concentrados e com os fertilizantes nitrogenados representam elevada porcentagem do custo de produção, implicando ainda em custos agregados com transporte, armazenamento, fornecimento dos concentrados e aplicação dos fertilizantes, afetando a sustentabilidade econômica da atividade leiteira. As vacas de alta produção demandam quantidade elevada de concentrado, além disso, a quantidade de concentrado utilizada depende também da qualidade da forragem. Quanto melhor a qualidade da forragem, menor será a quantidade de concentrado necessária para determinado nível de produção.

Além do aspecto de custo, os fertilizantes nitrogenados utilizados em doses elevadas podem causar poluição ambiental, devido à perda de nitrato por lixiviação e contaminação do lençol freático. A alfafa realiza a FBN atmosférico no sistema solo-planta, o que a torna uma biofábrica de nitrogênio, eliminando as necessidades de fertilizantes nitrogenados.

As características forrageiras da alfafa, como elevada produção, alta qualidade e digestibilidade, fazem com que ela tenha um papel estratégico para melhoria da qualidade das dietas normalmente utilizadas nas regiões tropicais que, associadas, permitirão incremento na produção e produtividade da pecuária leiteira.

Assim, a alfafa constitui uma alternativa importante para a sustentabilidade econômica dos sistemas intensivos de produção de leite, pois é possível obter maior nível de produção com a utilização da alfafa associada à determinada quantidade de concentrado quando comparado com dietas com quantidade semelhante de concentrado, porém com a utilização de volumoso de menor qualidade do que a alfafa. É importante mencionar que vários países que possuem pecuária leiteira com elevada produtividade utilizam a alfafa como principal forrageira na dieta.

Os preços dos alimentos e dos fertilizantes, em especial dos farelos proteicos e dos fertilizantes nitrogenados, se elevarão irremediavelmente com a demanda crescente de alimentos no mundo, limitando, em parte, as oportunidades de utilização crescente desses insumos nos sistemas intensivos de pecuária de leite. A alfafa pode

contribuir para minimizar os reflexos diretos e indiretos desse cenário, por conta dos benefícios que pode propiciar para a cadeia produtiva do leite.

Apesar das relevantes possibilidades de contribuição para melhoria dos índices de produtividade da pecuária leiteira e dos vários esforços envidados por diferentes instituições de pesquisa de diversos países, a utilização de alfafa sob a forma de pastejo e ou corte no Brasil ainda é muito limitada, principalmente devido ao desconhecimento do papel que a alfafa pode desempenhar nos sistemas intensivos de produção de leite.

A intensificação da produção de leite a pasto é fundamental para tornar o setor leiteiro competitivo e economicamente rentável. Contudo, o uso de forrageiras de má qualidade e o elevado custo de alimentos concentrados tem sido apontado como os principais fatores responsáveis pela baixa produtividade leiteira. Uma das alternativas mais econômicas para melhorar a nutrição do rebanho leiteiro é a utilização de forrageiras mais produtivas e de melhor qualidade como a alfafa, que apresenta elevada produtividade, excelente qualidade nutricional da forragem e boa aceitabilidade pelo animal. Esses fatores fazem da alfafa a forragem indicada para vacas de alto potencial de produção de leite (RODRIGUES *et al.*, 2008).

2.2 *Medicago Sativa L.*

No Brasil a alfafa foi primeiramente introduzida no Rio Grande do Sul, a partir do Uruguai e da Argentina, e que desde a década 1980 permanece com a área de 26.000 ha (COSTA; MONTEIRO, 1997), o que não tem condiz com a realidade da sua nobreza como planta forrageira. Dentre os principais fatores que obstrui a sua expansão no Brasil, evidencia a limitada produção de sementes, uma pequena disponibilidade de plantas adaptadas aos trópicos e também pode se destacar o pequeno conhecimento, por parte da grande maioria de produtores, das exigências dos cultivares quanto à fertilidade do solo, as necessidades e controle de plantas daninhas e ao seu manejo e da irrigação utilizada (BRIGHENTI; CASTRO, 2008).

Mais de 70% das áreas cultivadas com alfafa no Brasil até 1968, localizava-se pelo Estado do Rio Grande do Sul, principalmente pelo fato de as condições climáticas nesse estado serem mais favoráveis às cultivares daquela época. Atualmente, pode-se verificar o aumento da área de produção de alfafa em regiões menos tradicionais como o Centro-Oeste e Sudeste do país, o que ocorre em função do constante

aumento na implantação de sistemas de produção de leite, o que torna necessário o aumento de alimentos de alto valor nutritivo, para suprir a demanda e necessidades desses animais (VILELA, 1992).

Para se formar uma área cultivada com alfafa a primeira decisão deve-se no fato de que essa forrageira vai ser fornecida apenas para os animais de alto valor zootécnico do rebanho e que para animais que forem menos produtivos, as diversas forrageiras tropicais, que se apresentam com uma menor exigência do que a alfafa em relação ao clima e as condições edáficas, garantem plenamente as necessidades alimentares dessas categorias de animais. Fator importante no desenvolvimento e formação de um alfafal está o tamanho da área escolhida para o cultivo da planta. Apesar da alfafa obter alto rendimento de forragem de qualidade, a planta é muito exigente. Dessa forma, o grande nível de produção, torna indispensável grandes investimentos na formação e no manejo da cultura, corretivos necessários para manter a fertilidade do solo, sementes de qualidade e certificadas, herbicidas e sistema adequado de irrigação. Sendo assim o importante quanto ao cultivo da alfafa é buscar produtividade por área e não por meio de maior área plantada, independentemente das condições financeiras do produtor (BRIGHENTI; CASTRO, 2008).

Mundialmente, as condições climáticas para a produção de cultura da alfafa se apresentam com maior destaque nas regiões de clima temperado, sendo os maiores produtores Estados Unidos, depois a Rússia seguido pela Argentina. Essa cultura se adapta com bastante destaque em várias condições climáticas e de condições de solo, pela sua nobre variabilidade genética, a alfafa de flor amarela (*Medicago falcata*) sobreviveu a temperaturas inferiores a -26 °C no Alasca e outras variedades comuns (*Medicago sativa*) cultivadas no Vale da Morte da Califórnia (EUA), em temperaturas de até 54 °C (HANSON; TYSDAL; DAVIS, 1978).

A alfafa no seu processo de germinação, independe da temperatura ambiente, mas o desenvolvimento das plantas é favorecido a temperatura de 15 a 20 °C (FIELD; PERARSON; HUNT, 1976). Na primavera e verão, nos meses que a temperatura se torna mais quentes, observado, principalmente à noite, um aumento da respiração da planta, como possível causador da diminuição na produtividade da alfafa (DELANEY; DOBRENZ; POOLE, 1974). A Embrapa começou a pesquisar, na década de 1990, essa forrageira em suas unidades de pesquisa em São Carlos, SP e em Juiz de Fora, MG. Obteve os resultados que as condições climáticas da região Sudeste do Brasil

também eram viáveis para o cultivo de alfafa, sendo que as cultivares Crioula, P 30 e Florida 77, quando cultivadas na região Central do Estado de São Paulo, apresentavam rendimento de 20t de massa seca (MS) por hectare ano (RASSINI, 1998) e a variedade Crioula no seu primeiro ano de cultivo na Zona da Mata de Minas Gerais. Observou-se a produção de 26,8t de MS por hectare ano, demonstrando o grande potencial forrageiro da alfafa na região (FONTES *et al.*, 1993).

Em razão das qualidades nutricionais e sua adaptação à região Centro-Sul, o potencial de cultivo e utilização da alfafa em pastejo no estado de São Paulo é muito grande, principalmente como parte da dieta de vacas leiteiras, por reduzir a utilização de concentrado e ou utilizá-lo com menor teor proteico, diminuir a utilização de silagem, elevar a lotação de animais por ha, decrescer o potencial de timpanismo e aumentar a persistência da lactação, reduzindo, conseqüentemente, o custo de produção da atividade leiteira (RODRIGUES; COMERON; VILELA, 2008).

2.3 Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal

As bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) promovem benefícios diretos no aumento da disponibilização de fosfatos e na produção de hormônios promotores de crescimento (SOBRAL, 2003) e os indiretos são os de maior controle biológico através da competição por nutrientes, resistência a doenças e produção de substâncias que captam sideróforos e o ferro. Glick (2012) cita que as BPCV atuam diretamente na captação de recursos, fixação biológica de nitrogênio, realização da produção de hormônios promotores do crescimento, a solubilização de fosfato e na inibição de patógenos. Nos sistemas agrícolas levando-se em conta a pressão exercida, autores descrevem, como uma fonte alternativa ao N-fertilizantes, como substituto a essa adubação mineral, a FBN como uma forma sustentável de ao uso parcial ou total fertilizantes minerais (BALDANI; BALDANI, 2005; BERGAMASCHI *et al.*, 2007; HUNGRIA *et al.*, 2010; MUS *et al.*, 2016; GOUDA *et al.*, 2018).

O uso de microrganismos é de fundamental importância, pois eles podem melhorar o processo de nodulação e FBN, pois irá contribuir para o aumento da produtividade da cultura (HUNGRIA *et al.*, 2000).

A técnica de coinoculação com estirpes de rizóbio em leguminosas também tem sido sugerido para potencializar a nodulação, ocorrer o aumento do crescimento das plantas, e melhorar o processo de FBN em resposta a interação positiva entre

esses grupos de bactérias, na cultura da soja, aumentou a nodulação e produtividade de grãos (ARAÚJO; HUNGRIA, 1999).

2.3.1 *Azospirillum spp.*

Caracteriza-se como bactérias Gram-negativas o gênero *Azospirillum*, que pertencem à subdivisão proteobacteria, aeróbicas, não fermentativas, vibróides, e que em sua grande maioria atua como promotores de crescimento vegetal (REIS; PEDRAZA; TEIXEIRA, 2010). De gênero de vida livre, o *Azospirillum* pode ser encontrado em quase todos os lugares da Terra (HUERGO *et al.*, 2008).

Os efeitos benéficos da bactéria do gênero *Azospirillum*, como inoculante são: possui a característica de penetrar nas raízes das plantas, ou seja, a bactéria é endolítica; apresenta antagonismo, realiza a produção de fitormônios é encontrada em todos os tipos de clima e de solo (ANDRADE *et al.*, 2016). Como efeitos benéficos, podemos citar a utilização dessas bactérias como a síntese de auxinas citoquininas e giberelinas (BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004; ORLANDINI *et al.*, 2014).

Atua por diferentes mecanismos sendo que, esses microrganismos apresentam o metabolismo de carbono (C) e nitrogênio (N) e dessa maneira, aumentam suas condições de competitividade durante o processo de colonização. Esses microrganismos apresentam uma preferência, quanto às fontes de carbono, por ácidos orgânicos, como o piruvato, malato e ruccinato, e também uma preferência sobre a frutose em relação a glucose (QUADROS, 2009). Em relação ao N, as principais fontes são amônia, nitrato os aminoácidos e o nitrogênio molecular (N₂) (TRENTINI, 2010). Dados reunidos durante 22 anos de pesquisas realizados por Okon e Vanderleyden (1997), demonstram que os microrganismos do gênero *Azospirillum* gera incrementos, nas mais variadas condições edafoclimáticas, na produção em diversas culturas. Os autores relatam com ênfase que as plantas conseguem explorar melhor o solo, além da sua FBN devido a modificação que ocorre do sistema radicular (VANDE BROEK; VANDERLEYDEN, 1995; MIRANSARI; SMITH, 2014; FUKAMI *et al.*, 2017).

O *Azospirillum ssp.* atua por diferentes mecanismos de produção ocorrendo principalmente pela modificação da morfologia das raízes, pois altera o crescimento das plantas, assim maximizando a exploração do solo, aumenta por sua vez o processo da redução assimilatória de nitrato que pode ser disponibilizado na planta e

fixação biológica do N₂ (BODDEY *et al.*, 1986; BASHAN; HOLGUIN, 1997; INIGUEZ; DONG; TRIPLETT, 2004).

Na agricultura impulsionada por práticas sustentáveis, vem de forma crescente a utilização de inoculantes contendo bactérias promotoras de crescimento de plantas (HUNGRIA; RIBEIRO; NOGUEIRA, 2018). Segundo os mesmos autores, alcançou cerca de 5 milhões de doses, a comercialização dos inoculantes contendo as cepas de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 na safra de 2017-2018.

2.3.2 Coinoculação entre *Sinorhizobium meliloti* e *Azospirillum brasilense*

A quantidade do suprimento de N para a alfafa é realizada exclusivamente pela simbiose entre a planta e estirpes da bactéria *Sinorhizobium meliloti*. As interações biológicas das bactérias *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* no solo apresentam grandes impactos econômicos por consequências do aumento da nodulação e maior crescimento experimentado por forrageiras e leguminosas em resposta à interação positiva entre bactérias simbióticas e diazotróficas, especialmente as pertencentes ao gênero *Azospirillum* spp. As combinações de bactérias aplicadas em sementes resultaram em aumento da produção da planta, que foram diretamente associados ao aumento da fixação biológica de N₂ pelos micro-organismos. Nos casos utilizados com *Azospirillum brasilense*, houve efeitos benéficos da associação, e devido as bactérias produzirem hormônios vegetais aumentaram o crescimento do sistema radicular, possibilitando maior exploração do solo (FERLINI, 2006). Deve-se enfatizar que o suprimento de N para alfafa é realizado exclusivamente pela simbiose entre plantas e estirpes da bactéria *S. meliloti*, não havendo necessidade de aplicar esse elemento ao solo (WERNER *et al.*, 1996).

A coinoculação na cultura da soja com *A. brasilense* tem sido preconizada, juntamente com *Bradyrhizobium*, no Brasil, na Argentina e na África do Sul. Há um grande interesse na prática alternativa, que vise a redução da aplicação de fertilizantes nitrogenados. A inoculação mista de leguminosas com bactérias simbióticas e assimbióticas, produzem efeitos sinérgicos, que superam os resultados produtivos obtidos na forma de aplicação individual (BÁRBARO *et al.*, 2008).

Inoculações mistas têm uma maior taxa de sucesso, pois parece que nas plantas coinoculadas, a nutrição é mais equilibrada a absorção de nitrogênio, fósforo e outros nutrientes é significativamente aumentada. A inoculação mista de

Azospirillum com *Rhizobium* na cultura do feijão, aumenta a estimulação e a função dos nódulos, número total e massa dos nódulos, diferenciação das células epidérmicas nos pêlos radiculares, produtividade de grãos e área da superfície radicular (BASHAN; BASHAN, 2005).

Dardanelliet al. (2008) verificaram efeito positivo da coinoculação em feijão com *A. brasilense* e *Rhizobium tropici* sob estresse salino em hidroponia, com maior desenvolvimento radicular, FBN, e alívio dos efeitos negativos causado pelo NaCl. Além disso, os resultados sugeriram que *Azospirillum* permitiu maior exsudação e persistência dos flavonóides das raízes de feijão.

A investigação deste trabalho justifica-se pela hipótese que sementes de alfafa inoculadas com *S. meliloti* e coinoculadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal possibilita a obtenção de elevada produção de biomassa de forragem e aumento do valor nutritivo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local, Solo, Espécie e Estirpes Utilizadas

O experimento foi realizado em condições de casa de vegetação com cobertura plástica transparente (com temperatura média de 26°C – 36 °C dia e 20 °C noite), na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba/Universidade Estadual Paulista, Campus de Araçatuba, Estado de São Paulo, a 415 metros de altitude.

Antes do plantio foi coletado o solo na profundidade de 0-20 cm, cujos resultados dos atributos químicos do solo (RAIJ *et al.*, 2001) foram: M.O. = 26 g dm⁻³; pH = 5,2; P(resina), S, B, Cu, Fe, Mn e Zn de 23; 19; 0,55; 1,2; 111; 9,9 e 3,5 mg dm⁻³, respectivamente; K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, H+Al, SB e CTC de 2,9; 25; 17; 28; 44,9; e 72,9 mmolc dm⁻³, respectivamente; V = 62 %; argila = 155 g kg⁻¹; silte = 110 g kg⁻¹ e areia = 735 g kg⁻¹. O solo utilizado foi caracterizado como Argissolo Amarelo distrófico (SANTOS *et al.*, 2018).

A saturação por bases foi elevada a 80 % (WERNER *et al.*, 1997) com aplicação de CaCO₃ e MgCO₃, na relação 3:1, ficando o solo incubado durante 30 dias, mantendo-se a umidade em 80 % da capacidade de campo. O experimento foi instalado em recipientes plásticos utilizando-se 5 dm³ de solo.

Após o período de incubação, foi realizada a adubação básica composta por: Ca(H₂PO₄)₂, 200 mg dm⁻³ de P; K₂SO₄, 150 mg dm⁻³ de K e 61,53 mg dm⁻³ de S; H₃BO₃, 0,5 mg dm⁻³ de B; CuSO₄, 1,0 mg dm⁻³ de Cu; H₂MoO₄, 0,1 mg dm⁻³ de Mo; MnSO₄, 3 mg dm⁻³ de Mn; e ZnSO₄, 2,0 mg dm⁻³ de Zn. O nitrogênio foi aplicado em todos os tratamentos, exceto o sem N (T1), 14 dias após a emergência, na quantidade de 50 mg dm⁻³ de N (NH₄NO₃).

A população de rizóbios microssimbiontes da alfafa foi avaliada pelo método do número mais provável em plantas de alfafa e a de microrganismos diazotróficos nos solos pela técnica do número maior provável, em meio NFb semi-sólido forma, (HUNGRIA; ARAUJO, 1994). As populações foram estimadas em 1,4 x 10² células de rizóbios g⁻¹ e 1,2 x 10⁴ células de bactérias diazotróficas g⁻¹ de solo.

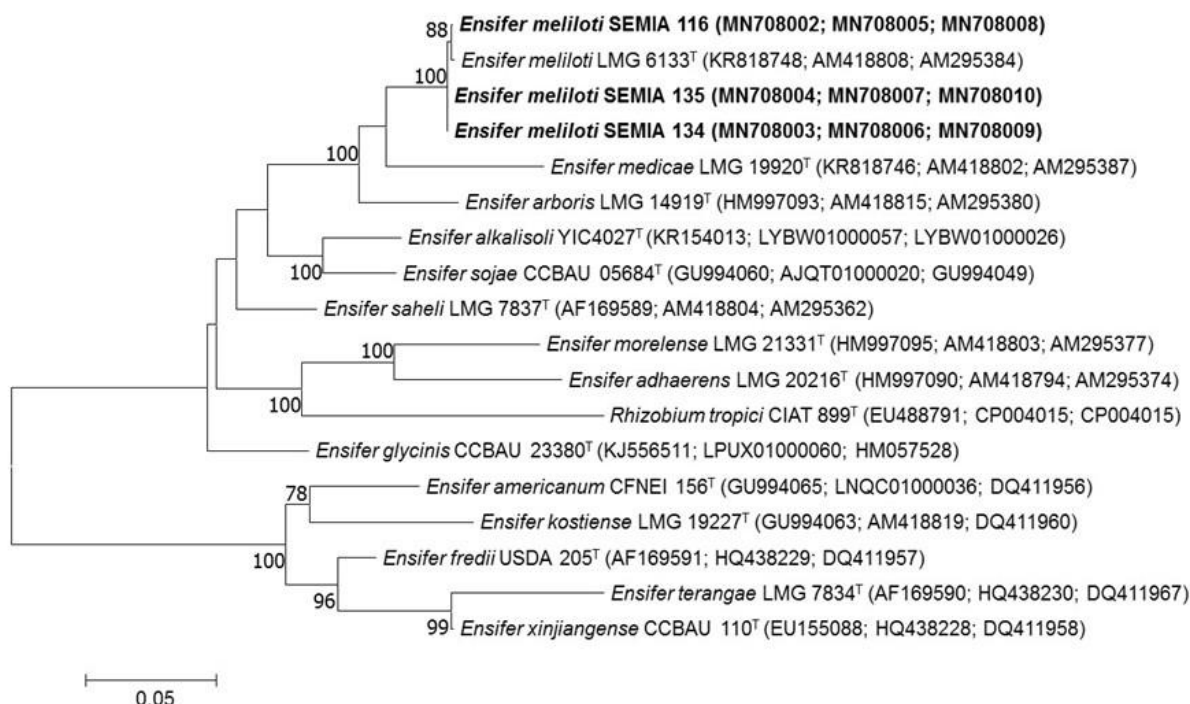
A espécie forrageira utilizada foi a alfafa (*Medicago sativa* L.) cv. Crioula. As estirpes de rizóbios utilizadas nos ensaios são autorizadas para a produção de inoculantes comerciais para a cultura da alfafa no Brasil (BRASIL, 2011). Três estirpes classificadas como *Sinorhizobium* (=Ensifer) *meliloti* são autorizadas: SEMIA 116

(=USDA 1088, = 3DOi4, = CNPSo 933), SEMIA 134 (= CNPSo 934) e SEMIA 135 (= CNPSo 935), todas selecionadas pela FEPAGRO/UFRGS (BRASIL, 2011) e que foram listadas oficialmente em 1995 (HUNGRIA; ARAUJO, 1995). Embora as anotações sobre as estirpes sejam precárias, as informações são de que a SEMIA 116 foi recebida da coleção de culturas do USDA, visando a produção de inoculante para a alfafa, enquanto as SEMIA 134 e 135 foram selecionadas a partir de isolamentos realizados de plantas de alfafa em solo do Rio Grande do Sul.

Como as três estirpes de rizóbios foram selecionadas com base apenas classificação das estirpes de rizóbios foi realizada uma sequência parcial do gene 16S rRNA (BRASIL, 2011). Visando o posicionamento taxonômico preciso das três estirpes procedeu-se ao sequenciamento do gene ribossomal 16S rRNA e de três genes *housekeeping*, *glnB*, *gyrB*, com os primers e condições de amplificação descritos por Ribeiro *et al.* (2012) e *rpoB* com os primers e condições de amplificação descritos por Klepaet *et al.* (2019). A extração de DNA das três estirpes foi realizada utilizando-se o kit DNeasyBlood&Tissue (Quiagen, Hilden, Germany), conforme as instruções do fabricante. O sequenciamento foi procedido conforme as condições descritas por Delamuta *et al.* (2017) no sequenciador ABI 3500XL (*Applied Biosystems*). As sequências obtidas foram alinhadas por meio do algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004) e cortadas e as análises filogenéticas foram procedidas por meio do software MEGA versão 6 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*), utilizando o algoritmo de máxima verossimilhança (MaximumLikelihood, ML) (TAMURA *et al.*, 2013), com valor de *bootstrap* de 1000 repetições (FELSENSTEIN, 1981). Para a análise de Multilocus Sequencing Analysis (MLSA) as sequências dos genes *glnb*, *gyrB* e *rpoB* foram concatenadas por meio do software SeaView (GOUY; GUINDON; GASCUEL, 2010) e a árvore filogenética foi construída conforme descrito para os demais genes (Figura 1 e 2).

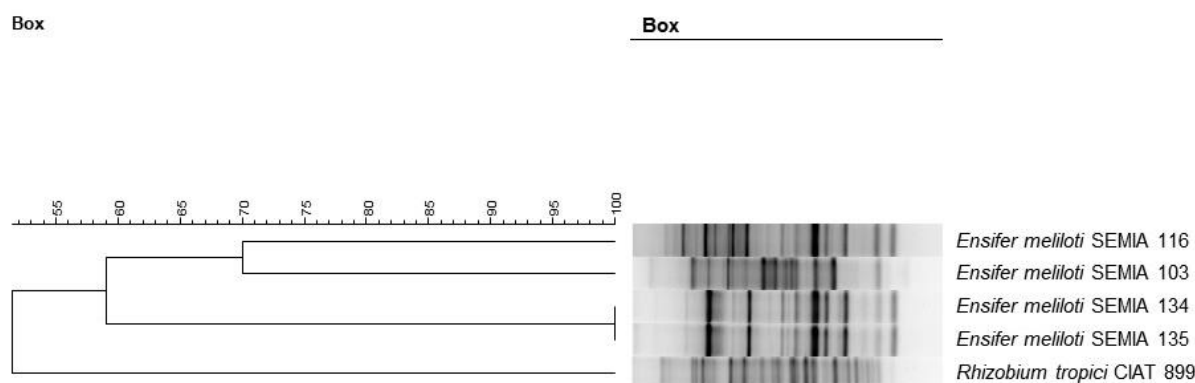
Para verificar a identidade genética de cada uma das três estirpes de rizóbios procedeu-se à análise do DNA por BOX-PCR, conforme descrito por Kaschuk *et al.* (2006). Os perfis genéticos foram analisados no software Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v.7.6), por meio da construção de um dendograma de similaridade, utilizando-se o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean*) (SNEATH; SOKAL, 1973) para a comparação do agrupamento e o coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1912), com 3% de tolerância.

Figura 1 – Filogenia de máxima verossimilhança com base nas sequências genéticas concatenadas de *glnB* + *gyrB* + *rpoB* de espécies de *Sinorhizobium* (= *Ensifer*). Valores de inicialização > 70% são indicados nos nós. O modelo utilizado foi o General Time Reversible, com sites distribuídos por gama (G). Bar indica cinco substituições por 100 posições de nucleotídeo



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 2 – Dendrograma das cepas de alfafa SEMIA 116, SEMIA 134 e SEMIA 135 utilizadas em inoculantes comerciais para a forragem no Brasil, com base na análise de agrupamentos de produtos BOX-PCR, utilizando o algoritmo UPGMA e o índice Jaccard, com 3% de tolerância. O SEMIA 103 também é um simbionte da alfafa, enquanto o CIAT 899 é um simbionte do feijão comum



Fonte: Elaborada pelo autor.

As estirpes de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 (= CNPSO 2083) e Ab-V6 (= CNPSO 2084) são utilizadas em inoculantes comerciais no Brasil tanto para a

inoculação de gramíneas como o trigo (*Triticum aestivum* L.) e milho (*Zea mays* L.) (HUNGRIA *et al.*, 2010; BRASIL, 2011) e pastagens de braquiárias (*Urochloa* spp.) (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2016), como para coinoculação de leguminosas, soja (*Glycinemax* (L.) Merr.) e feijoeiro (*Phaseolusvulgaris* L.) (HUNGRIA;NOGUEIRA; ARAUJO, 2013, 2015). O posicionamento taxonômico das estirpes foi confirmado pelo sequenciamento dos genomas (HUNGRIA; RIBEIRO; NOGUEIRA, 2018).

Todas as estirpes utilizadas no ensaio estão depositadas na “Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja: Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas” (Coleção WFCC#1213; WDCM#1054).

3.2 Delineamento Experimental e Tratamentos

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com oito tratamentos e cinco repetições, com medidas repetidas no tempo a saber: T₁ = controle não inoculado e sem N-mineral; T₂ = controle não inoculado com N-mineral; e os demais coinoculados recebendo N-mineral com as estirpes, T₃ = *S. meliloti* SEMIA 116; T₄ = *S. meliloti* SEMIA 116 + *A. brasilense* (Ab-V5 + Ab-V6); T₅ = *S. meliloti* SEMIA 134; T₆ = *S. meliloti* SEMIA 134 + Ab-V5 + Ab-V6; T₇ = *S. meliloti* SEMIA 135; T₈ = *S. meliloti* SEMIA 135 + Ab-V5 + Ab-V6.

Os inoculantes foram produzidos no Centro Nacional de Pesquisa da Soja – CNPSo, Londrina, PR, no laboratório de Biotecnologia, *Sinorhizobium* em meio YM (yeast-extract manitol) modificado (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2016) e *Azospirillum* em meio DYGS (FUKAMI *et al.*, 2018). A concentração de bactérias dos inoculantes foram ajustadas para 2×10^9 células por mL, para os rizóbios e 2×10^8 células por mL para *Azospirillum*. Utilizou-se a dose de inoculante de 15 mL por kg de semente para realizar a coinoculação. Uma alíquota de 100 gramas de sementes foi separada dentro de um saco plástico para homogeneizar o inoculante, aguardando 60 minutos em local fresco e abrigado do sol para secar e, em seguida, foi realizada a semeadura com 15 sementes por vaso. Foi realizado o desbaste permanecendo cinco plantas uniformes por vaso.

3.3 Avaliações e Análises Realizadas

Foram realizados três cortes a 10 cm de altura do solo quando as plantas estavam com 10% de início de florescimento (a cada 30 dias em média) para avaliar a altura das plantas, número de perfilhos, índice relativo de clorofila e a massa seca da parte aérea (MSPA) da alfafa. O teor de clorofila foi determinado de forma indireta, antes da coleta com o equipamento Clorophyll Meter SPAD-502 Plus (SPAD – *Soil and Plant Analysis Development*), para as tomadas leituras de valor SPAD no terço médio, de cinco plantas por vaso. A MSPA foi seca em estufa de circulação forçada de ar à temperatura de 55 °C, durante 72h (SILVA; QUEIROZ, 2002). Posteriormente o material foi moído para análises químicas bromatológicas. Foram realizadas análises de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) e teor de N total segundo metodologia descrita por Campos, Nussio e Nussio (2004). A digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS) foi obtida com o uso do rúmen artificial DAISYII (ANKON™ Technology Corp., Faiport, NY). A concentração de proteína bruta foi calculada multiplicando o teor de N por 6,25. A quantidade de N acumulado foi calculada multiplicando o teor de N pela quantidade de massa seca.

No final do experimento foi determinada a biomassa radicular da alfafa, e posteriormente colocadas em uma proveta de capacidade de 1000mL com 600mL de água, adicionando-se a raiz, obtendo-se o volume de raízes. Em seguida as amostras de raízes foram colocadas para secagem em estufa com circulação forçada de ar a 65°C até peso constante, depois moídas para a determinação do N-total.

3.4 Análise Estatística

Os dados foram testados quanto à normalidade dos erros, homogeneidade de variâncias e a variável produção de massa seca, altura, número de perfilhos, índice relativo de clorofila, massa do sistema radicular, volume do sistema radicular e composição bromatológica foram avaliados estatisticamente através da análise da variância (ANOVA), utilizando-se o software SISVAR (FERREIRA, 2000), para o modelo de parcelas subdivididas no tempo, sendo os tratamentos considerados como parcela principal e os cortes como sub-parcela, com medidas repetidas. Os resultados foram submetidos a ANOVA e teste de t (LSD) para a comparação múltipla de médias a 5% de significância (PIMENTEL-GOMES; GARCIA, 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das Estirpes

Tanto a análise filogenética do gene 16S ribossomal (Figura 1), como de MLSA com três genes *housekeeping* (Figura 2) confirmaram a classificação das três estirpes de rizóbios como pertencentes à espécie *Sinorhizobium* (= *Ensifer*) *meliloti*. A análise do perfil do DNA por BOX-PCR indicou perfis idênticos para as estirpes SEMIA 135 e SEMIA 136 (Figura 2). Como essas duas estirpes foram isoladas de nódulos eficientes de alfafa em solo do Rio Grande do Sul, podem indicar uma estirpe eficiente e adaptada às condições edafoclimáticas da região, que se destacou no processo de seleção. Como não era realizada a caracterização genética das estirpes na época da seleção, não foi possível identificar que se tratava da mesma estirpe. Contudo, os perfis são bastante distintos da estirpe norte-americana SEMIA 116 (Figura 2), indicando que a SEMIA 135 e SEMIA 136 podem ser estirpes indígenas, de alguma leguminosa nativa, que se adaptaram à cultura da alfafa.

4.2 Produção de Biomassa da Parte e Raízes, Perfilhamento e Spad

Pela análise de variância, a altura das plantas (cm) foi significativamente afetada pela interação entre os tratamentos e os cortes de avaliação (Tabela 1). A altura das plantas variou, em média, de 37,9 a 53,3 cm, sendo que o controle absoluto (sem N e sem inoculação) apresentou a menor altura em relação aos demais, no terceiro corte de avaliação, não havendo diferença entre os tratamentos nos demais cortes. Cabe destacar que mesmo sem significância, o tratamento coinoculado com *S. meliloti* SEMIA 134 associado ao *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 comparado com o controle positivo (com N e sem inoculação) foi superior em 12,7%. As plantas inoculadas com BPCP tendem a apresentar um maior estímulo para crescer. No terceiro corte, os tratamentos inoculados e coinoculados, exceto o coinoculado com a SEMIA 135 foram superiores estatisticamente em relação tanto ao controle absoluto, como ao controle não inoculado recebendo N-mineral, enfatizando, principalmente, os benefícios pela simbiose com rizóbios.

Tabela 1 – Altura das plantas (cm) de alfafa inoculadas com *Sinorhizobium meliloti* e coinoculadas com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 + Ab-V6.

Tratamentos	1° Corte	2° Corte	3° Corte	Médias
	cm.....			
Sem N e sem inoculação	38,00 aB	48,20 aA	27,40 dC	37,87
Com N e sem inoculação	36,20 aB	57,40 aA	49,20 cA	47,60
<i>S. meliloti</i> semia 116	45,00 aB	53,20 aAB	60,60 aA	52,93
<i>S. meliloti</i> semia 116 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	40,60 aB	57,60 aA	59,00 abA	52,40
<i>S. meliloti</i> semia 134	44,80 aB	57,60 aA	55,60 abcA	52,67
<i>S. meliloti</i> semia 134 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	43,60 aB	56,60 aA	58,60 abcA	52,93
<i>S. meliloti</i> semia 135	43,40 aB	56,40 aA	60,20 abA	53,33
<i>S. meliloti</i> semia 135 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	44,80 aB	54,60 aA	50,60 bcAB	50,00
Médias	42,05	55,20	52,65	

Médias seguidas de mesma letra minúscula para tratamentos e maiúscula para cortes não diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A alfafa pode se beneficiar fortemente pelo processo de fixação biológica do N_2 (FBN) quando em simbiose com *Sinorhizobium meliloti* (BIONDI *et al.*, 2003; ELBOUTAHIRI; THAMI-ALAMI; UDUPA, 2010).

Houve efeito significativo da interação tratamentos e cortes para o índice relativo de clorofila (SPAD) (Tabela 2), que variou na média das três avaliações de 35,5 a 50,0, em concordância com valores relatados por Moreira, Moraes e Fageria (2015), entre 31,4 a 44,9, na mesma cultivar de alfafa em diferentes doses de Zn e na presença e ausência de aminoácidos. As diferenças mais expressivas foram observadas no segundo e terceiro corte de avaliação, sendo que no segundo corte as plantas inoculadas com *S. meliloti* e Ab-V5+Ab-V6 apresentaram valores mais elevados que o controle negativo e positivo. Verificou-se que com o desenvolvimento das plantas estas diferenças foram mais expressivas no terceiro corte para os tratamentos em inoculação ou coinoculação com as estirpes SEMIA 134 e SEMIA 135. O tratamento coinoculado com SEMIA 135 + Ab-V5 + Ab-V6 foi 32,04% maior que o controle positivo, para o índice relativo deFBN.

Considerando que valores superiores acima de 30,00 indicam boa nutrição em N (MOREIRA; MORAES; FAGERIA, 2015) tem-se que somente o controle não inoculado e sem N-mineral foi inferior a esse valor no segundo corte (26,82). O índice relativo de clorofila é utilizado como um indicador de respostas das plantas que apresentam maior conteúdo de N. No presente estudo, nos tratamentos sem inoculação, o índice foi diminuindo com os cortes indicando uma provável diminuição do mecanismo fotossintético, entretanto, as plantas inoculadas com *S. meliloti* e Ab-

V5+Ab-V6 tiveram maior concentração de pigmentos fotossintéticos (Tabela 2). Moreira, Moraes e Fageria (2015) avaliando a alfafa cultivar Crioula sob doses de Zn e na presença e ausência de aminoácidos encontrou valores do índice relativo de clorofila variando de 31,4 a 44,9, sendo esses similares aos obtidos neste trabalho.

Tabela 2 – Índice relativo de clorofila (SPAD) de alfafa inoculadas com *Sinorhizobium meliloti* e coinoculadas com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 + Ab-V6.

Tratamentos	1° Corte	2° Corte	3° Corte	Médias
	cm.....			
Sem N e sem inoculação	48,76 b	26,82 c	30,84 e	35,47
Com N e sem inoculação	51,18 ab	33,20 b	38,32 d	40,79
<i>S. meliloti</i> semia 116	50,54 b	36,62 ab	44,14 cd	43,77
<i>S. meliloti</i> semia 116 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	55,02 ab	38,70 ab	44,46 bcd	46,06
<i>S. meliloti</i> semia 134	53,70 ab	38,18 a	49,18 abc	47,02
<i>S. meliloti</i> semia 134 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	54,06 ab	40,80 a	50,02 abc	48,29
<i>S. meliloti</i> semia 135	57,04 a	41,36 a	51,66 ab	50,02
<i>S. meliloti</i> semia 135 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	54,48 ab	42,00 a	50,60 a	49,03
Médias	53,09	37,21	44,90	

Médias seguidas de mesma letra minúscula para tratamentos e maiúscula para cortes não diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A contagem para o número de perfilhos apresentou significância para a interação tratamentos e cortes (Tabela 3), no entanto, o número de perfilhos das plantas não variou estaticamente entre os tratamentos nos dois primeiros cortes e no terceiro corte o controle não inoculado e sem N-mineral foi inferior aos demais. O número médio de perfilhos variou de 21,7 a 36,7 entre os cortes e analisando a dinâmica dos três cortes observamos que houve um acréscimo no número de perfilhos do primeiro para o terceiro corte.

Tabela 3 – Número de perfilhos das plantas de alfafa inoculadas com *Sinorhizobium meliloti* e coinoculadas com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 + Ab-V6.

Tratamentos	1° Corte	2° Corte	3° Corte	Médias
	cm.....			
Sem N e sem inoculação	20,20 a	28,40 b	16,40 b	21,67
Com N e sem inoculação	19,60 a	31,80 ab	48,00 a	33,13
<i>S. meliloti</i> semia 116	20,40 a	34,20 ab	47,40 a	34,00
<i>S. meliloti</i> semia 116 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	21,00 a	39,20 a	50,00 a	36,73
<i>S. meliloti</i> semia 134	22,20 a	34,00 ab	51,40 a	35,87
<i>S. meliloti</i> semia 134 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	21,80 a	39,00 a	46,00 a	35,60
<i>S. meliloti</i> semia 135	20,40 a	37,60 ab	51,00 a	36,33
<i>S. meliloti</i> semia 135 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	23,40 a	36,40 ab	45,40 a	35,07
Médias	21,13	35,07	44,45	

Médias seguidas de mesma letra minúscula para tratamentos e maiúscula para cortes não diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A produção de massa seca da parte aérea (MSPA) apresentou significância para a interação tratamentos e cortes (Tabela 4) apesar de não variar estaticamente no primeiro corte, sendo que no segundo a menor produção foi obtida com o controle não inoculado e sem N-mineral, e no terceiro corte houve um destaque para os tratamentos inoculados com *S. meliloti* + Ab-V5 + Ab-V6 em relação ao obtida com o controle não inoculado e sem N-mineral e controle não inoculados e sem N-mineral e controle não inoculado com N-mineral. Observou-se uma redução da produção de MSPA do controle negativo evidenciando que a alfafa é exigente em N. Houve um maior acúmulo de MSPA do primeiro para terceiro em todos os tratamentos, exceto o controle negativo. Os tratamentos inoculados com *S. meliloti* + Ab-V5 + Ab-V6 produziram em média no terceiro corte de avaliação 63,3% a mais que o controle positivo, evidenciando a contribuição e importância da fixação simbiótica do N. Embora não tenha apresentado diferença estatística, a coinoculação com SEMIA 116 + Ab-V5 + Ab-V6 produziu 16,8% a mais que *S. meliloti* SEMIA 116. O efeito das cepas de *S. meliloti* não apresentarem diferenças significativas entre si indicando comportamento semelhante, o que pode ser atribuído à pouca variação entre as cepas, uma vez que foram selecionadas em raízes de alfafa.

Tabela 4 – Produção de massa seca (g vaso⁻¹) das plantas de alfafa inoculadas com *Sinorhizobium meliloti* e coinoculadas com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 + Ab-V6.

Tratamentos	1° Corte	2° Corte	3° Corte	Médias
	g/vaso.....			
Sem N e sem inoculação	3,50 a	2,88 b	5,58 d	3,99
Com N e sem inoculação	4,32 a	8,86 a	14,88 c	9,35
<i>S. meliloti</i> semia 116	4,62 a	8,14 a	21,00 b	11,25
<i>S. meliloti</i> semia 116 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	5,36 a	10,46 a	24,52 a	13,45
<i>S. meliloti</i> semia 134	5,34 a	10,02 a	22,64 ab	12,67
<i>S. meliloti</i> semia 134 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	5,26 a	10,56 a	23,04 ab	12,95
<i>S. meliloti</i> semia 135	5,40 a	10,18 a	24,18 ab	13,25
<i>S. meliloti</i> semia 135 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	5,18 a	10,98 a	24,28 a	13,48
Médias	4,87	9,01	20,01	

Médias seguidas de mesma letra minúscula para tratamentos e maiúscula para cortes não diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Houve diferença estatística para a produção acumulada de MSPA da alfafa, bem como a massa seca de raízes (MSR) e o volume de raízes (Tabela 5).

Tabela 5 – Produção acumulada de massa seca da parte aérea (g vaso⁻¹), massa seca de raízes (g vaso⁻¹) e volume de raízes de alfafa inoculadas com *Sinorhizobium meliloti* e coinoculadas com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 + Ab-V6.

Tratamentos	MS acumulada	MS raízes	Volume de raiz
	g/vaso.....		ml.....
Sem N e sem inoculação	11,96 c	3,28 c	50,00 b
Com N e sem inoculação	29,06 b	10,74 b	164,80 a
<i>S. meliloti</i> semia 116	39,30 a	16,20 a	201,20 a
<i>S. meliloti</i> semia 116 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	40,32 a	17,10 a	210,00 a
<i>S. meliloti</i> semia 134	38,00 a	17,06 a	198,00 a
<i>S. meliloti</i> semia 134 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	38,86 a	17,64 a	194,00 a
<i>S. meliloti</i> semia 135	39,76 a	17,32 a	184,00 a
<i>S. meliloti</i> semia 135 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	40,44 a	17,30 a	192,00 a
Médias	34,71	14,58	174,25

Médias seguidas de mesma letra minúscula para tratamentos não diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A produção acumulada MSPA das plantas variou de 12,0 a 40,4 gramas por vaso, sendo que o tratamento controle negativo foi inferior, seguido pelo controle positivo, enquanto os demais tratamentos inoculados não diferiram estatisticamente entre si. O tratamento coinoculado com *S. meliloti* SEMIA 135 + *A. brasilense* Ab-V5 +

Ab-V6 produziu 39,2% a mais quando comparado com o controle positivo, demonstrando que a cultura da alfafa responde positivamente a coinoculação.

Resultados semelhantes tem sido encontrado com a cultura da soja (*Glycinemax* L.), como relatou Bracciniet *al.* (2016) que compararam vários tratamentos de coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* e concluíram que a coinoculação proporcionou incrementos nos caracteres fisiológicos, bem como no rendimento de grãos da soja, quando comparado com controle.

Já a MSR variou de 3,3 a 17,6 gramas por vaso, sendo que os tratamentos controle negativo e positivo foram inferiores aos demais, que não diferiram entre si. O tratamento inoculado com *S. meliloti* SEMIA 134 com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 produziu 64,2% a mais quando comparado com o controle positivo. Para o volume das raízes, houve destaque para o inoculado com *S. meliloti* SEMIA 116 com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6, que representou 27,4% a mais em relação ao controle positivo.

Para a MSR acumulada obtidas neste experimento, nota-se que a maioria das bactérias diazotróficas demonstraram produzir fito hormônios, a partir da estimulação da nodulação que pode ocorrer como resultado de uma resposta direta das raízes a esses compostos. Similarmente ao observado em várias gramíneas e cereais (OKON; KAPULNIK, 1986), a inoculação com *A. brasilense* promoveu a formação de pelos radiculares no feijoeiro ou alfafa (ITZIGSOHN *et al.*, 1993; BURDMAN *et al.*, 1996). Como a infecção por *Rhizobium* ocorre pela formação de fios de infecção nos pelos radiculares (LONG, 1989), a estimulação do número maior de células epidérmicas para diferenciar-se em células ciliadas radiculares infectáveis pode aumentar a probabilidade de infecção por *Rhizobium*, aumentando com isso, o potencial radicular de iniciação de nódulos (YAHALOM; OKON; DOVRAT, 1987).

Além da FBN, as BPCP também são conhecidas pela sua capacidade de produzir hormônios de crescimento das plantas. A produção dessas substâncias promotoras de crescimento pode estimular o aumento da densidade de pelos radiculares, da taxa de aparecimento de raízes secundárias e da superfície radicular. Esse incremento resulta em melhoria na absorção de água e nutrientes, aumentando assim a capacidade de a planta produzir e suportar estresses ambientais (ITZIGSOHN *et al.*, 1993).

As combinações de bactérias aplicadas podem proporcionar incremento nas características agrônômicas da alfafa, resultando em uma maior FBN. A utilização de

A. brasilense tem demonstrado efeitos benéficos, pois a bactéria tem capacidade de produzir fitohormônios, que resultam em maior desenvolvimento do sistema radicular e, portanto, a possibilidade de explorar um volume maior de solo (FERLINI, 2006).

Niewiadomska e Swedrzynska (2011) verificaram o efeito da coinoculação em alfafa com *S. meliloti* e *Herbaspirillumfrisingense* e concluíram que a inoculação das cepas apresentou um efeito benéfico no processo de simbiose com a semente e a produção de MSPA e MSR e aumento do número de nódulos e maior atividade da nitrogenase. Esses resultados confirmam os resultados do presente experimento, visto que as BPCP promovem uma influência benéfica na atividade das bactérias propiciando uma simbiose com a semente e confirmam o aumento da MSPA e MSR.

Martínez *et al.* (2015) avaliaram o efeito da coinoculação com *Ensifermeliloti* e *Halomonas maura* sobre o crescimento da alfafa em condições salinas e concluíram que a coinoculação com *Ensifermeliloti* e *Halomonas maura* pode aumentar a produção da alfafa sob condições específicas de salinidade, aumentando o valor nutricional e funcional das plantas. Esses resultados corroboram os obtidos neste trabalho em que a associação com bactérias diazotróficas melhora a produtividade das plantas e o acúmulo de N. Martínez *et al.* (2015) também observaram efeito positivo da dupla inoculação através de concentrações mais elevadas de Ca e Mg que melhoraram o valor nutritivo da alfafa. Este enriquecimento poderia ser através da ação combinada das bactérias com os exsudados derivados das raízes das plantas, e a presença destes exsudados na rizosfera com quantidades pequenas de citrato, malato e succinato, estando envolvida na solubilização de minerais como Fe e P.

4.3 Teor e Acúmulo de N-Total na Parte Aérea e Raízes

O teor de N total da parte aérea apresentou significância para a interação tratamentos e cortes (Tabela 6). O teor de N das plantas de alfafa foi menor para os tratamentos controle negativo e positivo na média dos nos cortes de avaliação, variaram de 22,7 a 31,9 g kg⁻¹ de N nas plantas. No terceiro corte de avaliação, o tratamento coinoculado com *S. meliloti* SEMIA 135 + *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 apresentou 59,3% a mais de nitrogênio no terceiro quando comparado com controle positivo. Embora não tenha apresentado diferença estatística o tratamento coinoculado com *S. meliloti* SEMIA 135 + *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 produziu 8,1% no terceiro corte a mais que *Sinorhizobiummeliloti* SEMIA 135 e 7,6% na média.

Tabela 6 – Médias do teor de nitrogênio total (g kg^{-1}) das plantas de alfafa inoculadas com *Sinorhizobium meliloti* e coinoculadas com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 + Ab-V6.

Tratamentos	1° Corte	2° Corte	3° Corte	Médias
	g/kg.....			
Sem N e sem inoculação	36,48 b	15,77 c	15,87 bc	22,71
Com N e sem inoculação	48,74 a	17,07 bc	15,09 c	26,97
<i>S. meliloti</i> semia 116	47,47 a	22,03 ab	21,28 a	30,26
<i>S. meliloti</i> semia 116 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	48,43 a	22,41 ab	20,51 ab	30,45
<i>S. meliloti</i> semia 134	48,05 a	23,24 a	20,96 ab	30,75
<i>S. meliloti</i> semia 134 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	46,78 a	23,29 a	20,55 ab	30,20
<i>S. meliloti</i> semia 135	44,42 a	22,26 ab	22,24 a	29,64
<i>S. meliloti</i> semia 135 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	45,42 a	26,25 a	24,04 a	31,90
Médias	45,72	21,53	20,07	

Médias seguidas de mesma letra minúscula para tratamentos e maiúscula para cortes não diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Xavier *et al.* (2005) estudando a eficiência de inoculantes comerciais em alfafa, também encontraram resultados similares aos observados neste experimento, sendo os tratamentos inoculados superiores ao tratamento com N e sem inoculação e sem N e sem inoculação. Isto demonstra a eficiência comprovada dos inoculantes e que a cultura da alfafa não pode ser estabelecida sem a prática da inoculação porque as estirpes de rizóbios presentes no solo não são suficientes para proporcionar a fixação simbiótica de N_2 . Moreira, Moraes e Fageria (2015) avaliando a alfafa sob doses de Zn e na presença e ausência de aminoácidos relataram resultados similares aos obtidos neste trabalho, sendo que a concentração de N variou de 18,1 a 24,3 g kg^{-1} .

Deve-se ressaltar que, no primeiro corte, o controle positivo (com N e sem inoculação) foi similar às estirpes e coinoculações avaliadas, provavelmente em decorrência da mineralização do N existente no solo, que foi suficiente para o desenvolvimento inicial das plantas. Esse processo é acentuado quando o solo é revolvido, e, principalmente quando da aplicação de calcário e fertilizantes minerais. No segundo e terceiro corte, porém, os dados de teor de N total obtidos com o controle positivo, que recebeu o correspondente a 50 kg ha^{-1} de N, indicam que essa dose não foi suficiente para garantir um crescimento satisfatório, o que refletiu em valores mais baixos que os obtidos nos tratamentos inoculados, mas com diferença estatística no terceiro corte. Segundo Moreira *et al.* (2007) o teor ideal de N para a cultura da alfafa deve estar entre 26,0 a 35,0 g kg^{-1} , sendo que no presente experimento esse teor só

foi encontrado no primeiro corte e nos demais ficaram abaixo de 26,0 g kg⁻¹ de N, exceto no segundo corte, onde tratamento coinoculado com *S. meliloti* SEMIA 135 + *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 apresentou teor de N total de 26,3 g kg⁻¹ de N, evidenciando a sua importância.

Resultados semelhantes foram reportados por Radkowski e Grygierzer (2006), que avaliando variedades e híbridos de alfafa encontraram valores de 27,2 a 35,2 g kg⁻¹ de N. O teor de N na MS da alfafa depende do tempo de colheita e da fase de desenvolvimento. Pietrzak (2011) encontrou para a alfafa colhida no primeiro corte o teor de 43,0 g kg⁻¹ de N (fase de emborrachamento) e 22,0 g kg⁻¹ de N (final do florescimento). Em cortes subsequentes da alfafa, o teor de N encontrado na MSPA foi de 24,0 a 35,0 g kg⁻¹ de N. Symanowicz e Skorupka (2019) avaliando o efeito da adubação na alfafa por três anos, verificaram teores de 36,9 g kg⁻¹, valores superiores aos encontrados neste trabalho.

Para o acúmulo de N total da parte aérea, a ANOVA apresentou significância para a interação tratamentos e cortes (Tabela 7). No primeiro corte, só não diferiu da SEMIA 116, o tratamento controle negativo apresentou o menor acúmulo de N em relação aos demais, enquanto no segundo corte o tratamento coinoculados com *S. meliloti* SEMIA 135 + Ab-V5 + Ab-V6 foi superior ao controle positivo (288,89 e 153,91 g kg⁻¹) e a SEMIA 116 apresentando maior acúmulo de N. Já no terceiro corte, os tratamentos *S. meliloti* + Ab-V5 + Ab-V6 foram superiores aos controles, evidenciando uma elevada superioridade em termos de acúmulo de N na parte aérea. No terceiro corte o tratamento coinoculado com *S. meliloti* SEMIA 135 + Ab-V5 + Ab-V6 acumulou 157,5% a mais de N e quando comparado com controle positivo. O tratamento coinoculado com *S. meliloti* SEMIA 116 + Ab-V5 + Ab-V6 acumulou 11,0% a mais de N quando comparado com a estirpe sozinha SEMIA 116, evidenciando assim, a participação das BPCP na fixação do N₂ e acúmulo de N nas plantas. Na média dos três cortes o tratamento coinoculado com *S. meliloti* SEMIA 135 com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 acumulou 369,8 g kg⁻¹ de N quando comparado com o tratamento controle positivo com N e sem inoculação acumulou 74,0% a mais de N. Resultados semelhantes com alfafa foram verificados por Symanowicz e Skorupka (2019), que encontraram um aumento consecutivo da absorção do N do primeiro para o terceiro ano de 382 kg ha⁻¹ para 649 kg ha⁻¹, respectivamente. No presente experimento também foi observado um aumento médio do acúmulo de N total do primeiro para o terceiro corte de 229,2 para 416,7 g kg⁻¹ (Tabela 7).

Tabela 7 – Acúmulo de nitrogênio (g kg^{-1}) das plantas de alfafa inoculadas com *Sinorhizobium meliloti* e coinoculadas com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 + Ab-V6.

Tratamentos	1° Corte	2° Corte	3° Corte	Médias
	g/kg.....			
Sem N e sem inoculação	127,36 b	45,64 c	88,35 d	87,12
Com N e sem inoculação	257,75 a	153,91 b	226,14 c	212,60
<i>S. meliloti</i> semia 116	218,67 ab	176,20 b	451,05 b	281,98
<i>S. meliloti</i> semia 116 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	257,54 a	233,96 ab	500,50 ab	330,67
<i>S. meliloti</i> semia 134	252,56 a	232,70 ab	477,74 b	321,00
<i>S. meliloti</i> semia 134 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	242,05 a	244,52 ab	473,28 b	319,95
<i>S. meliloti</i> semia 135	239,63 a	226,86 ab	535,43 ab	333,97
<i>S. meliloti</i> semia 135 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	238,21 a	288,89 a	582,34 a	369,81
Médias	229,22	200,34	416,85	

Médias seguidas de mesma letra minúscula para tratamentos e maiúscula para cortes não diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Esses resultados corroboram com os obtidos por Fontes *et al.* (1992), que trabalhando com alfafa onde as sementes foram inoculadas, verificaram que a adição de N mineral aumentou a produção de massa seca e o teor de proteína bruta. Entretanto, o aumento médio foi da ordem de 1,6 kg de MS por 1,0 kg de N adicionado, indicando baixa conversão do N aplicado sobre a produção de MSPA.

O teor de N total das raízes, apresentou significância para a interação tratamentos e cortes (Tabela 8). O teor de N das raízes variou de 13,1 a 17,8 g kg^{-1} , sendo que os tratamentos controle positivo e negativo apresentaram valores inferiores aos demais. O tratamento coinoculado com *S. meliloti* SEMIA 135 com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 apresentou um acréscimo no teor de 28,1% quando comparado com controle positivo. Embora não tenha apresentado diferença estatística, o tratamento coinoculado com *S. meliloti* SEMIA 135 com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 apresentou teor de N 9,2% maior que *S. meliloti* SEMIA 135.

Tabela 8 – Teor de nitrogênio total (g kg^{-1}) e acúmulo de N-total (g kg^{-1}) das raízes de alfafa inoculadas com *Sinorhizobium meliloti* e coinoculadas com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 + Ab-V6.

Tratamentos	Teor N	Acúmulo N
	g/kg.....	
Sem N e sem inoculação	13,14 b	43,47 c
Com N e sem inoculação	13,90 b	141,89 b
<i>S. meliloti</i> semia 116	15,76 a	224,18 a
<i>S. meliloti</i> semia 116 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	17,46 a	298,79 a
<i>S. meliloti</i> semia 134	17,54 a	302,41 a
<i>S. meliloti</i> semia 134 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	17,64 a	312,32 a
<i>S. meliloti</i> semia 135	16,30 a	284,54 a
<i>S. meliloti</i> semia 135 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	17,80 a	312,34 a

Médias seguidas de mesma letra minúscula para tratamentos não diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

As BPCV estimulam o crescimento das plantas, facilitando a absorção de nutrientes pela planta. Sugere-se que o aumento da captação de minerais pelas plantas se deva a um aumento geral no volume do sistema radicular, refletido por um número, espessura e comprimento de raízes aumentados, e não a qualquer aprimoramento específico do íon normal (BISWAS; LADHA; DAZZO, 2000).

Por outro lado, experimentos com espécies de *Azospirillum* sugeriram que esse organismo aprimora especificamente a absorção de nutrientes (KAPULNIK *et al.*, 1983; LIN; OKON; HARDY, 1983; MURTY; LADHA, 1988).

O acúmulo de N total nas raízes da alfafa, apresentou significância para a interação tratamentos e cortes (Tabela 8). O acúmulo de N total das raízes variou de 43,5 a 312,3 g kg^{-1} , sendo que os tratamentos controle positivo e negativo foram inferiores aos demais. O tratamento coinoculado com *S. meliloti* SEMIA 135 com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 acumulou 120,1% a mais que o controle positivo. Embora não tenha apresentado diferença estatística, o tratamento coinoculado com *S. meliloti* SEMIA 135 com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 apresentou um maior acúmulo de N total de 9,8% a mais que *S. meliloti* SEMIA 135.

Além de explorar sua capacidade individual de promover crescimento de plantas, o potencial das bactérias flavonoides selecionados podem ser melhorados com a inoculação com outros microrganismos para efeitos aditivos e ou sinérgicos. Os diazotróficos bacterianos capazes de colonizar as zonas radiculares das plantas leguminosas, por exemplo, podem estimular o desempenho de uma espécie

leguminosa, afetando o processo de fixação simbiótica de N₂. Demonstrou-se que a inoculação combinada de *Rhizobium* com *Azospirillum* ou *Azotobacter* aumenta a produção de MSPA, e o teor de N de várias leguminosas quando comparada à inoculação apenas com *Rhizobium* (BURDMAN; HAMAQUI; OKON, 2000).

Os resultados não apresentaram aumentos significativos da coinoculação, no entanto, Prasad e Chandra (2003) demonstraram o incremento da população de *Rhizobium* quando cultivados com BPCV. Pandey e Maheswari (2007) ao descreverem a relação entre dois isolados distantes, *Burkholderia* sp. BPCP e *Sinorhizobium meliloti* PP3, verificaram que, em combinação, ambas as linhagens promovem o crescimento de plantas hospedeiras devido ao aumento da produção de ácido indol-3-acético (IAA) e à solubilização de fosfato do que a inoculação única em condições de laboratório. Um aumento de cerca de 25% na taxa média de crescimento foi registrado para *S. meliloti* PP3 quando cultivado em culturas de duas espécies e espécies mistas em relação à cultura de espécies únicas. Essa interação também indica que, no solo, a associação com *Burkholderia* sp. BPCV favorece o *S. meliloti* PP3 como uma adaptação de alta taxa de reprodução, uma estratégia bem conhecida que permite que os organismos sobrevivam e se mantenham com sucesso nas comunidades. Seneviratne (2003) mencionou que a coinoculação e a co-cultura de micróbios têm desempenhado melhor as tarefas do que os micróbios individuais.

Como a maioria dos diazotróficos demonstrou produzir fitohormônios, a estimulação da nodulação pode ocorrer como resultado de uma resposta direta das raízes das plantas a esses compostos. Similarmente ao observado em várias gramíneas e cereais (OKOM; KAPULNIK, 1986), a inoculação com *A. brasilense* promoveu a formação de pelos radiculares de feijoeiro e na alfafa (ITZIGSOHN *et al.*, 1993; BURDMAN *et al.*, 1996). Como a interação por *Rhizobium* ocorre pela formação de fios de interação nos pelos radiculares (LONG, 1989), a estimulação de um número maior de células epidérmicas para diferenciar-se em células ciliadas radiculares infectáveis pode aumentar a probabilidade de infecção por *Rhizobium*, aumentando assim a iniciação de nódulos (YAHALOM; OKON; DOVRAT, 1987). Além de seu efeito direto na morfologia radicular, os fitos hormônios também podem influenciar o processo de nodulação (SYONO *et al.*, 1976; YAHALOM; OKON; DOVRAT, 1987).

Sabe-se que os flavonóides das raízes das plantas são os indutores da expressão do gene da nodulação (*nod*) no *Rhizobium* (BAMFALVI *et al.*, 1988; MAXWELL *et al.*, 1989; PETER; VERMA, 1990). Portanto, essa produção aumentada

de flavonóides pode ser um fator adicional na promoção de nódulos por essas bactérias. Além disso, a luteolina flavonóide teve efeitos semelhantes aos de *Azospirillum* no aumento do número principal de nódulos radiculares e do número total de nódulos de alfafa (ITZIGSOHN *et al.*, 1993).

Com relação a nodulação, verifica-se que os tratamentos controle negativo (sem N e sem inoculação) e controle positivo (com N e sem inoculação) não nodularam, indicando que no solo trabalhado não há presença de *S. meliloti* na população nativa de rizóbio. Estas observações reforçam a necessidade de se inocular a alfafa. Xavier *et al.* (2005), avaliando a eficiência de inoculantes comerciais na cultura da alfafa, também encontraram resultados similares. Demonstrando que a ausência de estirpes específicas nos solos tropicais propicia maior possibilidade de sucesso com a inoculação.

4.4 Composição Bromatológica

As características da qualidade nutricional da alfafa variaram em função da coinoculação com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 e das cepas de *S. meliloti* utilizadas. O teor de proteína bruta (PB) apresentou significância para a interação tratamentos e cortes (Tabela 9). Na avaliação dos três cortes os tratamentos controle negativo e positivo apresentaram os menores teores de PB, exceto para o primeiro corte para o controle positivo. Os teores de PB variaram em média de 14,2 a 20,1% de PB, sendo que o tratamento coinoculado com *S. meliloti* SEMIA 135 com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 apresentou 19,33% de PB a mais quando comparado com controle positivo. Embora não tenha apresentado diferença estatística tratamento coinoculado com *S. meliloti* SEMIA 135 com *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 apresentou um maior teor de PB 8,63% superior a inoculação com *S. meliloti* SEMIA 135, na média dos três cortes de avaliação. Gashaw (2015), avaliando a qualidade nutricional da alfafa relatou teores médios de PB de 18,0 a 25,0%, sendo que estes teores estão em consonância com os encontrados no presente trabalho, que variaram de 14,0 a 20,0%, na média dos três cortes.

Tabela 9 – Teor de proteína bruta (%) das plantas de alfafa inoculadas com *Sinorhizobium meliloti* e coinoculadas com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 + Ab-V6

Tratamentos	1° Corte	2° Corte	3° Corte	Médias
	% PB.....			
Sem N e sem inoculação	22,80 b	9,85 c	9,92 bc	14,19
Com N e sem inoculação	30,46 a	10,67 bc	9,44 c	16,86
<i>S. meliloti</i> semia 116	29,67 a	13,77 ab	13,30 a	18,91
<i>S. meliloti</i> semia 116 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	30,27 a	14,01 ab	12,82 ab	19,03
<i>S. meliloti</i> semia 134	30,03 a	14,53 a	13,10 ab	19,22
<i>S. meliloti</i> semia 134 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	29,24 a	14,56 a	12,84 ab	18,88
<i>S. meliloti</i> semia 135	27,76 a	13,91 ab	13,90 a	18,52
<i>S. meliloti</i> semia 135 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	28,38 a	16,94 a	15,02 a	20,12
Médias	28,58	13,53	12,54	

Médias seguidas de mesma letra minúscula para tratamentos e maiúscula para cortes não diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A diminuição do teor de PB com os cortes está relacionada com o teor de N que foi diminuindo na planta, e não teve influência da idade de maturidade de corte porque o mesmo foi realizado com 4 semanas de crescimento, sendo considerado ideal e com 10% do início do florescimento das plantas.

Delicet *et al.* (2007) avaliando o efeito de diferentes cepas de *S. meliloti* em alfafa encontraram resultados do teor de PB superiores aos obtidos no presente experimento, sendo que somente no primeiro corte os teores de PB foram superiores aos relatados pelos autores. A aplicação efetiva de cepas de *S. meliloti* em alfafa associadas as BPCP mostrou ser importante para o aumento do teor de PB em 19,0 a 42,0% quando comparadas com o controle negativo e positivo, respectivamente.

Bernardi *et al.* (2013), trabalhando com a mesma cultivar Crioula sob doses de calcário e gesso agrícola encontraram teores de PB superiores aos relatados neste trabalho, que variaram de 23 a 25%.

A fibra em detergente neutro (FDN) apresentou significância para a interação tratamentos versus cortes (Tabela 10). Na média dos três cortes os tratamentos coinoculados foram os que apresentaram menor teor de FDN foram *S. meliloti* SEMIA 116 + Ab-V5 + Ab-V6, *S. meliloti* SEMIA 134 + Ab-V5 + Ab-V6 e *S. meliloti* SEMIA 135 + Ab-V5 + Ab-V6, exceto no terceiro corte o tratamento SEMIA 116 + Ab-V5 + Ab-V6 demonstrando o efeito positivo das BPCP.

O conteúdo de FDN indica a taxa de ingestão de matéria seca da alfafa. Quanto maior o valor de FDN, menor a qualidade da alfafa e o conteúdo de nutrientes é reduzido comprometendo o desempenho dos animais (GASHAW, 2015).

Tabela 10 – Teores de fibra em detergente neutro (%) das plantas de alfafa inoculadas com *Sinorhizobium meliloti* e coinoculadas com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 + Ab-V6.

Tratamentos	1° Corte	2° Corte	3° Corte	Médias
	% FDN.....			
Sem N e sem inoculação	47,64 ab	46,17 b	63,60 a	52,47
Com N e sem inoculação	47,69 ab	50,99 ab	60,98 ab	53,15
<i>S. meliloti</i> semia 116	46,90 ab	51,62 ab	57,94 ab	52,15
<i>S. meliloti</i> semia 116 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	41,74 b	48,72 ab	59,88 ab	50,08
<i>S. meliloti</i> semia 134	50,20 a	52,52 a	59,88 ab	54,20
<i>S. meliloti</i> semia 134 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	43,12 b	47,61 ab	55,80 b	48,85
<i>S. meliloti</i> semia 135	45,49 ab	50,54 ab	57,98 ab	51,34
<i>S. meliloti</i> semia 135 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	41,97 b	47,91 ab	56,68 b	48,85
Médias	45,57	49,51	59,08	

Médias seguidas de mesma letra minúscula para tratamentos e maiúscula para cortes não diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Bernardi *et al.* (2013) trabalhando com a mesma cultivar obtiveram valores de FDN entre 28 a 35%, e Monteiro, Costa e Silveira (1998) relataram valores médios de 42%, sendo estes superiores em qualidade dos resultados encontrados neste trabalho. A porcentagem de FDN compõe a estrutura da parede celular, composta principalmente de carboidratos estruturais, que são de baixa disponibilidade no processo de digestão (SILVA; QUEIROZ, 2002). Portanto a redução no teor de FDN implica em aumento dos constituintes do conteúdo celular: carboidratos solúveis, proteínas e lipídeos, os quais apresentam maior disponibilidade.

A fibra em detergente ácida (FDA) apresentou significância para a interação tratamentos versus cortes (Tabela 11). A FDA das plantas não variou estaticamente entre os tratamentos no primeiro corte e no segundo a diferença observada foi para o tratamento controle negativo em relação aos demais. No terceiro corte as plantas inoculadas apresentaram significativamente menor teor de FDA quando comparadas com o controle negativo e positivo.

Valores altos de FDA indicam baixa produção de energia, isto é, a qualidade é reduzida (GASHAW, 2015). Os teores de FDA nos primeiros dois cortes ficaram bem abaixo do nível máximo tolerado (entre 24,0 e 35,0%), e o terceiro corte passou um

ponto percentual (42,0%), mas na média dos três cortes os teores foram considerados bons.

Bernardi *et al.* (2013) trabalhando com a cultivar ‘Crioula’ relatou valores bem inferiores (entre 24 e 32%) e Monteiro, Costa e Silveira (1998) encontrou valores médios de 30% de FDA, sendo estes similares aos obtidos no primeiro corte e nos demais cortes os valores foram superiores. A fração de FDA representa a fração fibrosa do alimento ou a composição da parede celular, e está intimamente ligada à digestibilidade, uma vez que a lignina é o principal componente químico da parede celular das forrageiras (SILVA; QUEIROZ, 2002).

Tabela 11 – Teores de fibra em detergente ácido (%) das plantas de alfafa inoculadas com *Sinorhizobium meliloti* e coinoculadas com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 + Ab-V6.

Tratamentos	1° Corte	2° Corte	3° Corte	Médias
	% FDA.....			
Sem N e sem inoculação	26,85 a	28,13 b	47,36 a	34,11
Com N e sem inoculação	26,50 a	33,19 a	43,87 ab	34,52
<i>S. meliloti</i> semia 116	25,93 a	35,17 a	41,65 bc	34,25
<i>S. meliloti</i> semia 116 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	24,44 a	33,74 a	40,39 bc	32,86
<i>S. meliloti</i> semia 134	26,43 a	34,88 a	41,91 bc	34,41
<i>S. meliloti</i> semia 134 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	24,74 a	32,85 a	40,30 bc	32,63
<i>S. meliloti</i> semia 135	26,18 a	34,70 a	41,09 bc	33,99
<i>S. meliloti</i> semia 135 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	26,06 a	32,46 a	39,96 c	32,83
Médias	25,89	33,14	42,07	

Médias seguidas de mesma letra minúscula para tratamentos e maiúscula para cortes não diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A digestibilidade in vitro na matéria seca (DIVMS) apresentou significância para a interação tratamentos versus cortes (Tabela 12). No primeiro e segundo cortes não houve diferenças entre os tratamentos. No terceiro corte os tratamentos inoculados foram superiores estatisticamente ao controle negativo e positivo, sendo que, a coinoculação *S. meliloti* SEMIA 135 + Ab-V5 + Ab-V6 apresentou 12,69% maior digestibilidade quando comparado com controle positivo. Na média dos três cortes a digestibilidade variou 67 a 71%, ficando dentro do valor considerado adequado (70%) por Conrad, Pratt e Hibbs (1964) para uma dieta de ruminantes. Bernardi *et al.* (2013) obteve valores de 68 a 71%, sendo estes similares aos encontrados no presente trabalho.

A DIVMS da alfafa depende do conteúdo de celulose e lignina. Como a lignina é virtualmente indigestível, lignificações intensas da parede celular em estágios avançados de crescimento da alfafa tende a reduzir o coeficiente de DIVMS. No presente experimento observamos que os tratamentos controle negativo e positivo no terceiro corte apresentaram menor DIVMS e altos teores de FDN e FDA.

Tabela 12 – Digestibilidade in vitro na MS (%) das plantas de alfafa inoculadas com *Sinorhizobium meliloti* e coinoculadas com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 + Ab-V6.

Tratamentos	1º Corte	2º Corte	3º Corte	Médias
	% DIVMS.....			
Sem N e sem inoculação	75,40 ab	70,00 a	55,24 c	66,88
Com N e sem inoculação	75,97 ab	68,53 a	60,60 b	68,37
<i>S. meliloti</i> semia 116	75,23 ab	69,94 a	64,77 ab	69,98
<i>S. meliloti</i> semia 116 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	76,98 a	70,42 a	66,50 a	71,30
<i>S. meliloti</i> semia 134	71,77 b	70,71 a	65,83 a	69,44
<i>S. meliloti</i> semia 134 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	75,15 ab	71,19 a	65,53 a	70,62
<i>S. meliloti</i> semia 135	72,85 ab	72,97 a	65,11 ab	70,31
<i>S. meliloti</i> semia 135 + <i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	75,11 ab	70,31 a	68,29 a	71,24
Médias	74,81	70,51	63,98	

Médias seguidas de mesma letra minúscula para tratamentos e maiúscula para cortes não diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5 CONCLUSÕES

A alfafa coinoculada com *A. brasilense* não diferiu das plantas inoculadas somente com *S. meliloti*. No entanto, para a maioria das variáveis foi superior ao tratamento com N e sem inoculação (controle positivo), ou seja, a coinoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal, promoveram resultados positivos no desenvolvimento da alfafa, na altura, índice relativo de clorofila, PB, DIVMS, e principalmente na produção de MSPA, MSR, e no teor acumulado de N da planta e suas raízes.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A.; CONDÉ, A.; COSTA, R.; POMELA, A.; SOARES, A.; MARTINS, F.; LIMA, W.; OLIVEIRA, C. Produtividade de milho em função da redução do nitrogênio e da utilização de *Azospirillum brasilense*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 15, n. 2, p. 229-239, 2016.
- ARAÚJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/*Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 1633-1643, 1999.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.
- BAMFALVI, Z.; NIEKOOP, M.; SCHELL, M.; BESL, L.; STACEY, G. Regulation of nod gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. **Mol. Gen. Gen.**, v. 214, p. 420-424, 1988.
- BÁRBARO, I. M.; BRANCALIÃO, S. R.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. Técnica alternativa: co-inoculação de soja com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* visando incremento de produtividade. **Informações tecnológicas**, Campinas, 2008. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/coinoculacao/index.htm. Acesso em: 18 out. 2018.
- BASHAN, Y.; BASHAN, L. E. Bacteria/plant growth-promoting. In: HILLEL, D. (Ed.) **Encyclopedia of soils in the environment**. New York: Elsevier, 2005. v. 1, p. 103-115.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth: a critical assessment. **Adv. Agron.** v. 78, p. 77-136, 2010.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, n. 8, p. 521-577, 2004.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 103-121, 1997.
- BERGAMASCHI, C.; ROESCH, L. F. W.; QUADROS, P. D.; CAMARGO, F. A. O. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. **Ciência rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 727-733, maio/jun. 2007.
- BERNARDI, A. C. C.; CARDOSO, R. D.; MOTA, E. P.; FERREIRA, R. P. Produção, estado nutricional e qualidade da alfafa sob pastejo e ocorrência de plantas daninhas em resposta à calagem, gessagem e adubação potássica. **B. Indústr. Anim.**, v. 70, n. 1, p. 67-74, 2013.

BIONDI, E.; PILLI, E.; GIUNTINI, E.; ROUMIANTSEVA, M. L.; ANDRONOV, E. E.; ONICHTCHOUK, O. P.; KURCHAK, O. N.; SIMAROV, B. V.; DZYUBENKO, N. I.; MENGONI, A.; BAZZICALUPO, M. Genetic relationship of *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae* strains isolated from Caucasian region. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 220, p. 207-213, 2003.

BISWAS, J. C.; LADHA, J. K.; DAZZO, F. B. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 64, p. 1644-1650, 2000.

BODDEY, R. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field grown wheat. **Plant and Soil**, Crawley, v. 95, p. 109-121, 1986.

BRACCINI, A. L.; MARIUCCI, G. E. G.; SUZUKAWA, A. K.; LIMA, L. H. S.; PICCININ, G. G. Co-inoculação e modos de aplicação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada na nodulação das plantas e rendimento da cultura da soja. **Sci. Agrar. Parana.**, v. 15, n. 1, p. 27-35, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução normativa SDA nº. 13, de 24 de março de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 58, 25 mar. 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2017.

BRIGHENTI, A.; CASTRO, C. Controle de plantas daninhas em alfafa. In: FERREIRA, R. P.; RASSINI, J. B.; RODRIGUES, A. A.; FREITAS, A. R.; CAMARGO, A. C.; MENDONÇA, F. C. (Ed.). **Cultivo e utilização da alfafa nostrópica**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008. p. 54-93.

BURDMAN, S.; HAMAQUI, B.; OKON, Y. **Improvement of legume crop yields by coinoculation with *Azospirillum* and *Rhizobium***: the Otto Warburg Center for Agricultural biotechnology. Israel: The Hebrew University of Jerusalem, 2000.

BURDMAN, S.; VOLPIN, H.; KIGEL, J.; KAPULNIK, Y.; OKON, Y. Promotion of nod gene inducers and nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris*) roots inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 3030-3033, 1996.

CAMPOS, F. P.; NUSSIO, C. M. B.; NUSSIO, L. G. **Métodos de análise de alimentos**. Piracicaba: FEALQ, 2004.

CONRAD, H. R.; PRATT, A. D.; HIBBS, J. W. Regulation of feed intake in dairy cows. I. Change in importance of physical and physiological factors with increasing digestibility. **J. Dairy Sci.**, v. 47, p. 54-62, 1964.

COSTA, C.; MONTEIRO, A. L. G. Alfafa como forrageira para corte e pastejo. In: SIMPÓSIO SOBRE ECOSISTEMAS DE PASTAGENS, 3., 1997, Jaboticabal. **Anais [...]**. Jaboticabal: FCAV, UNESP, 1997. p. 297-317.

DARDANELLI, M. S.; CÓRDOBA, F. J. F.; ESPUNY, M. R.; CARVAJAL, M. A. R.; DÍAZ, M. E. S.; SERRANO, A. M. G.; OKON, Y.; MEGÍAS, M. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 11, p. 2713-2721, 2008.

DELAMUTA, J. R. M.; MENNA, P.; RIBEIRO, P. A.; HUNGRIA, M. Phylogenies of symbiotic genes of *Bradyrhizobium* symbionts of legumes of economic and environmental importance in Brazil support the definition of the new symbiovars pachyrhizi and sojae. **Syst Appl Microbiol.**, v. 40, n. 5, p. 254-265, 2017.

DELANEY, R. H.; DOBRENZ, A. K.; POOLE, H. T. Seasonal variation in photosynthesis, respiration, and growth components of nondormant alfalfa (*Medicago sativa*). **Crop Science**, Madison, WI, v. 14, n.1, p. 58-61, 1974.

DELIC, D.; STAJKIVIC, O.; MILIEIE, B.; KUZMANOVIC, D.; RASULUE, N.; RADOVIC, J.; TOMIC, Z. Effects of different strains of *Sinorhizobium meliloti* on alfalfa (*Medicago sativa* L.) biomass yield. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 23, n. 5-6, p. 601-607, 2007.

DOMINGUEZ-NUÑEZ, J. A.; MUÑOZ, D.; PLANELLES, R.; GRAU, J. M.; ARTERO, F.; ANRIQUEZ, A.; ALBANESI, A. Inoculation with *Azospirillum brasilense* enhances the quality of mesquite *Prosopis juliflora* seedlings. **Forest Syst.**, v. 21, p. 364–372, 2012.

EDGAR, R. C. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

ELBOUTAHIRI, N.; THAMI-ALAMI, I.; UDUPA, S. M. Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. **BMC Microbiol.**, v. 10, n. 15, 2010.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, v. 17, p. 368-376, 1981.

FERLINI, H. A. **Co-inoculação de Soja (*Glycine max*) com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense***. 2006. Disponível em: <http://www.engormix.com/co_inoculacion_soja_glicyne_s_articulos_800_AGR.htm>. Acesso: 24 out. 2019.

FERREIRA, D. F. **Sisvar**. Lavras: UFLA, 2000.

FERREIRA, E.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Destino do ¹⁵N urina bovina aplicado na superfície de um solo Podzólico descoberto, ou sob cultura de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. In: CONGRESSO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 32., Brasília, 1995. **Anais**. Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1995. p. 109-110.

FIELD, T. R. O.; PERARSON, C. J.; HUNT, L. A. Effects of temperature on the growth and development of alfalfa. **Herbage Abstracts**, Wallingford, v. 46, n. 4, p. 145-150, 1976.

- FONTES, P. C. R.; CÓSER, A. C.; MARTINS, C. E.; VILELA, D. Produção e níveis de nutrientes em alfafa (*Medicago sativa*) no primeiro ano de cultivo, na Zona da Mata de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 22, n. 2, p. 205-211, 1993.
- FONTES, P. C. R.; CÓSER, A. C.; MARTINS, C. E.; VILELA, D. Resposta da cultura de alfafa (*Medicago sativa* L.) à adubação nitrogenada. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 21, n. 6, p. 996-997, 1992.
- FUKAMI, J.; ABRANTE, J. L. F.; DEL CERRO, P.; NOGUEIRA, M. A.; MEGÍAS, M.; OLLERO, F. J.; HUNGRIA, M. Revealing diferentes strategies of quórum sensing in *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6. **Archives of Microbiology**, v. 200, n. 1, p. 47-56, 2018.
- FUKAMI, J.; DA OSA, C.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Co-inoculação de milho com *Azospirillum brasilense* e *Rhizobium tropici* como estratégia para mitigar o estresse salino. **Functional Plant Biology**, Melbourne, v. 45, p.328-339, 2017.
- GASHAW, M. Review on biomass yield dynamics and nutritional quality of alfafa (*Medicago sativa*). J. Harmoniz. **Res. Appl. Sci.**, v. 3, n. 4, p. 241-251, 2015.
- GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012.
- GOUDA, S.; KERRY, R. G.; DAS, G.; PARAMITHIOTIS, S.; SHIN, H. S.; PATRA, J. K. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. **Microbiological research**, v. 206, p. 131-140, jan. 2018.
- GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. Sea view version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 2, p. 221-224, 2010.
- HANSON, C. H.; TYSDAL, H. M.; DAVIS, R. L. Alfafa. In: HUGLES, H. D.; HEALTH, M. E.; METCALF, D. S. **Forages**: la ciência de la Agricultura baseada em la produccion de pastos. México: Companhia Editorial Continental, 1978. p. 151-162.
- HUERGO, L. F.; MONTEIRO, R. A.; BONATTO, A. C.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F. D.; SALAMONE, I. G. (Ed.). **Azospirillum sp.**: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Córdoba: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 17-28.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F. J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 1515-1528, 2000.
- HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. Relato da VI Reunião de laboratórios para recomendação de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E. L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D. S. (Ed.). **Microbiologia do solo: desafios para o século XXI**. Londrina: IAPAR/EMBRAPA-CNPSO, 1995. p. 476-489.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yield of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil** v.331, n. 1-2, p.413-425, 2010.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 7, p. 791-801, 2013.

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

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 811-917, 2015.

HUNGRIA, M.; O'HARA, G. W.; ZILLI, J. E.; ARAUJO, R. S.; DEAKER, R.; HOWIESON, J. G. Isolation and growth of rhizobia. In: HOWIESON, J.G.; DILWORTH, M. J. (Ed.). **Working with rhizobia**. Canberra, Australia: Australian Center for International Agricultural Research (ACIAR), 2016. p. 39-60.

HUNGRIA, M.; RIBEIRO, R. A.; NOGUEIRA, M. A. Draft genome sequence of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6, commercially used in inoculants for grasses and legumes in Brazil. **Genome Announcements**, v. 6, n. 20, p. e00393-18, 2018.

INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E. W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Burlington, v. 17, n. 1078-1085, 2004.

ITZIGSOHN, R.; KAPULNIK, Y.; OKON, Y.; DOVRAT, A. Physiological and morphological aspects of interactions between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*) in association with *Azospirillum brasilense*. **Can J. Microbiol.**, v. 39, p. 610-615, 1993.

JACCARD, P. The distribution of flora in the alpine zone. **New Phytologist**, v. 11, n. 2, p. 37-50, 1912.

KAPULNIK, Y.; SARIG, S.; NUR, I.; OKON, Y. Effect of *Azospirillum* inoculation on yield of field-grown wheat. **Can. J. Microbiol.**, v. 29, p. 895-899, 1983.

- KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CAMPO, R. J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Appl Soil Ecol.**, v. 32, p. 210-220, 2006.
- KLEPA, M. S.; URQUIAGA, M. C. O.; SOMASEGARAN, P.; DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M. *Bradyrhizobium niftali* sp. nov., an effective nitrogen-fixing symbiont of partridge pea [*Chamaecrista fasciculata* (Michx.) Greene], a native caesapinioid legume broadly distributed in USA. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 10, p. 3448-3459, 2019.
- LIN, W.; OKON, Y.; HARDY, R. W. F. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 45: p. 1775-1779, 1983.
- LONG, S. R. Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground. **Cell**, v. 56, p. 203-214, 1989.
- MARTÍNEZ, R.; NEBOT, E.; PORRES, J. M.; KAPRAVELOU, G.; MORAL, A.; TALBI, C.; BEDMAR, E. J.; LÓPEZ-JURADO, M. *Medicago sativa* L: mejora y nuevos aspectos de su valor nutritivo y funcional por coinoculación bacteriana. **Nutrición Hospitalaria**, v. 32, n. 6, p. 2741-2748, 2015.
- MAXWELL, C. A.; HARTWIG, U. A.; JOSEPH, C. M.; PHILLIPS, D. A. Chalcone and two related flavonoids from alfalfa roots induce nod genes of *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiol**, v. 91, p. 842-847, 1989.
- MIRANSARI, M.; SMITH, D. L. Plant hormones and seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, v. 99, p. 110-121, 2014.
- MONTEIRO, A. L. G.; COSTA, C.; SILVEIRA, A. C. Produção e distribuição de matéria seca e composição bromatológica de cultivares de alfafa (*Medicago sativa* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, p. 868-874, 1998.
- MOREIRA, A.; BERNARDI, A. C. C.; RASSINI, J. B.; FERREIRA, R. P.; OLIVEIRA, P. P. A. Fertilidade do solo e estado nutricional da alfafa cultivada nos trópicos. **Documentos**, São Carlos, n. 67, maio 2007. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPPSE/17146/1/Documentos67.pdf>>. Acesso em: 24 fev. 2020.
- MOREIRA, A.; MORAES, L. A. C.; FAGERIA, N. K. Zinc and amino-acids on the yield and nutritional state of alfalfa grown in the tropical soil. **J. of Plant Nutrition**, v. 38, p. 780-794, 2015.
- MURTY, M. G.; LADHA, J. K. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. **Plant Soil**, v. 108, p. 281-285, 1988.

MUS, F.; CROOK, M. B.; GARCIA, K.; COSTAS, A. G.; GEDDES, B. A.; KOURI, E. D.; PARAMASIVAN, P.; RYU, M.; OLDROYD, G. E. D.; POOLE, P. S.; UDVARDI, M. K.; VOIGT, C. A.; ANÉ, J.; PETERS, J. W. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 82, n. 13, p. 3698-3710, 2016.

NIEWIADOMSKA, A.; SWERDRZYNSKA, D. Effect of the co-inoculation of lucerne (*Medicago sativa* L.) with *Sinorhizobium meliloti* and *Herbaspirillum frisingense* in relation to the interactions between bacterial strain. **Archives of environmental protection**, v. 37, n. 4, p. 37-48, 2011.

OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Development and function of *Azospirillum* inoculated roots. **Plant Soil**, v. 90, p. 3-16, 1986.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **ASM news**, v. 63, p. 366-370, 1997.

ORLANDINI, V.; EMILIANI, G.; FONDI, M.; MAIDA, I.; PERRIN, E.; FANI, R. Network analysis of plasmidomes: the *Azospirillum brasilense* Sp245 case. **International journal of evolutionary biology**, v. 2014, 2014.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; HUNGRIA, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Dinitrogen-fixing prokaryotes. In: ROSEMBERG, E.; DE LONG, E. F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (Ed.). **The Prokaryotes: prokaryotic physiology and biochemistry**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. p.427-451.

PANDEY, P.; MAHESWARI, D. K. Two-species microbial consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*. **Curr. Sci.**, v. 92, p. 1137-1142, 2007.

PETER, N. K.; VERMA, D. P. S. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interaction. **Mol. Plant-Microbe Interact**, v. 3, p. 4-8, 1990.

PIETRZAK, S. Estimation of nitrogen fixed symbiotically by legume plants. **Water Environ. Ruras Area**, v. 11, n. 3, p. 197-207, 2011. (in Polish).

PIMENTEL-GOMES, F.; GARCIA, C. H. **Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais**: exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos. Piracicaba: FEALQ, 2002.

PRASAD, H.; CHANDRA, R. Growth pattern of urdbean *Rhizobium* sp. with PSB and PGPR in consortia. **J. Ind. Soc. Soil. Sci.**, v. 51, p. 7678, 2003.

QUADROS, P. D. **Inoculação de *Azospirillum* spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul**, 2009. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

RADKWSKI, A.; GRYGIERZE, C. B. The diversification of the yield and the total protein content in some (*Medicago media* Pers.) and (*Medicago sativa* L.). **Acta Agr. Silv. Agraria**, v. 48, p. 41-48, 2006. (in Polish).

RAIJ, B. V.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. (Ed.) **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001.

RASSINI, J. B. **Alfafa (*Medicago sativa*):** estabelecimento e cultivo no estado de São Paulo. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 1998. (Embrapa Pecuária Sudeste. Comunicado Técnico, 15).

RASSINI, J. B.; FERREIRA, R. P.; CAMARGO, A. C. Cultivo e estabelecimento da Alfafa. In: FERREIRA, R. P.; RASSINI, J. B.; RODRIGUES, A. A.; FREITAS, A. R.; CAMARGO, A. C.; MENDONÇA, F. C. (Ed.). **Cultivo e utilização da Alfafa nos trópicos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008.

REIS, V. M.; PEDRAZA, R. O.; TEIXEIRA, K. R. S. Diversidade e relação filogenética de espécies do gênero *Azospirillum*. **Documentos**, Seropédica, n. 273, 2010.

RIBEIRO, R. A.; ROGEL, M. A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ORMENO-ORRILLO, E.; BARCELLOS, F. G.; MARTÍNEZ, J.; THOMPSON, F. L.; MATÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. **Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium***. [S.l.: s.n], 2012.

RODRIGUES, A. A.; COMERON, E. A.; VILELA, D. Utilização de alfafa em pastejo para alimentação de vacas leiteiras. In: FERREIRA, R. P.; RASSINI, J. B.; RODRIGUES, A. A.; FREITAS, A. R.; CAMARGO, A. C.; MENDONÇA, F. C. (Ed.). **Cultivo e utilização da alfafa nos trópicos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008. p. 345-378.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; LUBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; ARAUJO FILHO, J. C.; OLIVEIRA, J. B.; CUNHA, T. J. F. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**, 4. Ed. DF: Embrapa, 2018. 356 p.

SENEVIRATNE, G. Development of eco-friendly, beneficial microbial biofilms. **Curr. Sci.**, v. 85, p. 1395-1396, 2003.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos:** métodos químicos e biológicos. 3. ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002.

SNEATH, P.; SOKAL, R. **Numerical taxonomy:** the principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, 1973.

SOARES, L. H. B.; MICHEL, D. C.; ZILLI, J. E. Fixação biológica do nitrogênio. In: VILELA, D.; FERREIRA, R. P.; BASIGALUP, D. H.; FONSECA, D. M. **Manejo da alfafa:** do cultivo aos seus múltiplos usos. Brasília: Embrapa, 2020. (no prelo).

SOBRAL, J.K. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycinemax*) e estudo da interação endófitos-planta**. 2003. 174 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

SYMANOWICZ, B.; SKORUPKA, W. Effect of mineral fertilization on nitrogenase activity, yield, nitrogen content and uptake with alfalfa (*Medicago sativa* L.) yield. **J. Elem.**, v. 24, n. 1, p. 181-191, 2019.

SYONO, K.; NEWCOMB, W.; TORREY, J.G. Cytokinin production in relation to the development of pea root nodules. **Can. J. Bot.**, v. 54, p. 2155-2162, 1976.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Mol BiolEvol.**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TRENTINI, D. B. **Identificação dos alvos celulares das proteínas de transdução de sinal PII do diazotrófico de vida livre *Azospirillum amazonense***. 2010. 122f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Genetics of the *Azospirillum*-plant root association. **Criticalreviews in plantsciences**, v. 14, n. 5, p. 445-466, 1995.

VILELA, D. Potencialidade da alfafa na região Sudeste do Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 16, n. 175, p. 50-53, 1992.

VOGEL, G. F.; MARTINKOSKI, L.; RUZICKI, M. Efeitos da utilização de *Azospirillum brasilense* em poáceas forrageiras: importâncias e resultados. **ACSA Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 10, p. 1-6, 2014.

WERNER, J. C.; PAULINO, V. T.; CANTARELLA, H.; ANDRADE, N. O.; QUAGGIO, J. A. Forrageiras. In: RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendação de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. v. 100. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 1996. p. 245-258.

WERNER, J. C.; PAULINO, V. T.; CANTARELLA, H.; ANDRADE, N. O.; QUAGGIO, J. A. Forrageiras. In: RAIJ, B. V.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: IAC, 1997. p. 261-273. (Boletim Técnico, 100).

XAVIER, D. F.; GOMES, F. T.; LÉDO, F. J. S.; PEREIRA, A. V. Eficiência de inoculantes de rhizobium na nodulação de alfafa em solo de cerrado. **R. Bras. Zootec.**, v. 34, n. 3, p. 781-785, 2005.

YAHALOM, E.; OKON, Y.; DOVRAT, A. *Azospirillum* effects on susceptibility to Rhizobium nodulation and on nitrogen fixation of several forage legumes. **Can. J. Microbiol.**, v. 33, p. 510-514, 1987.