

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL
EM CAPIM PAIAGUÁS E CAPIM RUZIZIENSIS

Autor: Artur Roque Domingues Barreiros
Orientador: Prof. Dr. Ulysses Cecato
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Sandra Galbeiro

MARINGÁ
Estado do Paraná
fevereiro - 2020

BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL EM CAPIM PAIAGUÁS E CAPIM RUZIZIENSIS

Autor: Artur Roque Domingues Barreiros
Orientador: Prof. Dr. Ulysses Cecato
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Sandra Galbeiro

Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
fevereiro – 2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

B271b

Barreiros, Artur Roque Domingues

Bactérias promotoras de crescimento vegetal em capim paiguás e capim ruziziensis / Artur Roque Domingues Barreiros. -- Maringá, PR, 2020.
xii, 71 f.figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ulysses Cecato.

Coorientador: Prof. Dr. Sandra Galbeiro.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2020.

1. Capim paiguás (*Brachiaria brizantha*). 2. Capim ruziziensis (*Brachiaria ruziziensis*). 3. Bactérias - Crescimento vegetal - Capim Paiguás. 4. Bactérias - Crescimento vegetal - Capim ruziziensis. 5. *Brachiaria brizantha* - Pastejo. I. Cecato, Ulysses, orient. II. Galbeiro, Sandra, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CDD 23.ed. 636.202



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL
EM CAPIM PAIAGUÁS E CAPIM RUZIZIENSIS

Autor: Artur Roque Domingues Barreiros
Orientador: Prof. Dr. Ulysses Cecato

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADO em 20 de fevereiro de 2020.

Prof. Dr. Cecilio Viegas Soares
Filho

Profª Drª Tamara Tais Tres

Prof. Dr. Ulysses Cecato
Orientador

A única coisa que você tem que ninguém mais tem é você.

Sua voz, sua mente, sua história, sua visão.

Então, escreva e desenhe e construa e toque e dance e viva como só você pode.

(Neil Gaiman)

Aos meus pais e irmão,

**Roque Barreiros, Teresa de Fátima Domingues Barreiros (*in memoriam*) e Gabriel
Felipe Domingues Barreiros**

Que incansavelmente batalharam para minha formação profissional e crescimento pessoal, abdicando diversas vezes de seus próprios sonhos para me deixar sonhar.

À minha esposa,

Thaís Paola Giacomini

Pelo apoio e por se manter sempre presente, não deixando desaminar mesmo nas piores situações.

Às minhas avós e tia,

**Maria Terezinha Maia Ceccon Barreiros, Deusiana Arjona Domingues e Ruth
Ceccon Barreiros**

Pela ajuda, compreensão, carinho e orações.

Com muito carinho

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pelo dom da vida e por todas as bênção e coragem para sempre seguir em frente.

Universidade Estadual de Maringá, em especial ao Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia por tornar possível à realização dos meus estudos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Ulysses Cecato, pela orientação, dedicação na minha formação e especialmente, pelas conversas e conselhos sempre oportunos. Agradeço pela oportunidade de trabalhar com o senhor e, principalmente, conhecer esse ser humano incrível e honesto.

À Prof.^a Dr.^a Sandra Galbeiro, pela atenção, conselhos e ensinamentos.

À Dr.^a Mariângela Hungria, pela confiança depositada em mim, pelo carinho, disponibilidade na condução dos experimentos e elaboração dos artigos.

Ao Grupo de Estudo em Forragicultura Cecato (GEFORCE), em especial a Divaney Mamédio, Camila Fernandes Domingues Duarte, Thiago Trento Biserra, Diogo Rodrigues da Silva e Renan Sanches, que desde o início estiveram presentes. Aos demais companheiros, Pablo, Pedro Paulo, Marcos, Breno, Beatriz, Maria Eduarda e Luara, agradeço por toda ajuda e amizade, sem sombra de dúvidas que toda separação e coleta não seriam tão legais sem a presença de vocês.

Aos funcionários do LANA, Augusto e Angélica, pela ajuda nos trabalhos desenvolvidos no LANA, mas também pelas conversas e ensinamentos.

Aos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi, em especial ao “Seu Valdir” sempre disposto a nos atender.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, por contribuírem com minha formação acadêmica. Em especial ao Prof. Dr. Ricardo Vasconcelos, por disponibilizar seu tempo para a construção da curva do NIRS, sempre solícito e dedicado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de realizar meu doutorado. À CAPES, pela concessão da bolsa, ao CNPq e Fundação Agrisus, pelo financiamento do projeto de pesquisa.

A todos os que contribuíram com a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

ARTUR ROQUE DOMINGUES BARREIROS, filho de Roque Barreiros e Teresa de Fátima Domingues Barreiros, nasceu em 29 de outubro de 1991, na cidade de Maringá, Paraná, Brasil.

Em dezembro de 2008, concluiu o ensino médio na Escola Estadual Dr. Gastão Vidigal, na cidade de Maringá, Paraná.

Em fevereiro de 2011, matriculou-se no curso de Zootecnia, na Universidade Estadual de Maringá, concluindo em janeiro de 2017.

Em março de 2017, matriculou-se no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, realizando estudos na área de Produção e Manejo de Plantas Forrageiras, sob orientação da Professor Dr. Ulysses Cecato.

No dia 20 de fevereiro de 2020 submeteu-se a Defesa da Dissertação de Mestrado junto ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
I - INTRODUÇÃO	1
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
1.1. Pastagens no Brasil	2
1.2. Bactérias promotoras de crescimento vegetal em gramíneas forrageiras	3
1.2.1. <i>Azospirillum</i> sp.	5
1.2.2. <i>Pseudomonas</i> sp.	6
1.2.3. <i>Pantoea</i> sp.	7
1.3. Adubação nitrogenada.....	8
III - BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS NO DESENVOLVIMENTO DE <i>BRACHIARIA BRIZANTHA</i> CV. BRS PAIAGUÁS	20
1 INTRODUÇÃO	21
2 MATERIAL E MÉTODOS	23
3 RESULTADOS	28
4 DISCUSSÃO	30
5 CONCLUSÕES	33
REFERÊNCIAS.....	34

IV - BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS NO DESENVOLVIMENTO DE <i>UROCHLOA RUZIZIENSIS</i>	49
1 INTRODUÇÃO	50
2 MATERIAL E MÉTODOS	51
3 RESULTADOS	55
4 DISCUSSÃO	57
5 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA: ácido abscísico

AIA: ácido-3-inodolácetico

AR: Área radicular

BPCV: bactérias promotoras do crescimento vegetal

CO₂: gás carbônico

CR: Comprimento radicular

DIVMS: digestibilidade “in vitro” da matéria seca

DR: Diâmetro radicular

DSR: Densidade radicular

FBN: fixação biológica de nitrogênio

FDA: Fibra em detergente ácido

FDN: Fibra em detergente neutro

N: nitrogênio

PB: proteína bruta

PMF: produção de massa de forragem

LISTA DE TABELAS

Página

TABELA 1 Densidade populacional de perfilhos (DPP; perfilhos.m ²) e peso de perfilho (PP; g) de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Paiaguás inoculada com bactéria promotora do crescimento de plantas e doses de N-fertilizante	45
TABELA 2 Proteína bruta (PB; g kg ⁻¹), fibra em detergente neutro (FDN; g kg ⁻¹), fibra em detergente ácido (FDA; g kg ⁻¹) e digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS; g kg ⁻¹) de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Paiaguás inoculada com bactéria promotora do crescimento de plantas e doses de N-fertilizante	46
TABELA 3 Massa de raiz (MR; ton ha ⁻¹), área radicular (AR; mm ² .dm ³), diâmetro radicular (DiR; mm) e densidade radicular (DeR; mm) de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Paiaguás inoculada com bactéria promotora do crescimento de plantas e doses de N-fertilizante	47
TABELA 4 Efeito da interação entre bactéria x doses de N-fertilizante no comprimento radicular (CR; mm.dm ³) de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Paiaguás	48
TABLE 1 Tillers population density (TPD, tillers.m ²) of <i>Urochloa ruziziensis</i> inoculated with plant growth-promoting bacteria and N-fertilizer doses	68
TABLE 2 Effect of interaction between plant-growth promoting bacteria (PGPB) and x N-fertilizer doses in tiller weight (TW; g) of <i>Urochloa ruziziensis</i>	69
TABLE 3 Crude protein (CP; g kg ⁻¹), neutral detergent fiber (NDF; g kg ⁻¹), acid detergent fiber (ADF; g kg ⁻¹) and <i>in vitro</i> digestibility of dry matter (IVDDM; g kg ⁻¹) of <i>Urochloa ruziziensis</i> inoculated with plant growth-promoting bacteria and N-fertilizer doses	70
TABLE 4 Root mass (RM; kg ha ⁻¹) and root diameter (RD _i ; mm) of <i>Urochloa ruziziensis</i> inoculated with plant growth-promoting bacteria and N-fertilizer doses	71
TABLE 5 Effect of interaction between plant-growth promoting bacteria (PGPB) and x N-fertilizer doses in root area (RA, mm ² .dm ³), root length (RL, mm) and root density (RDe, mm.cm ³) of <i>Urochloa ruziziensis</i>	72

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Condições climáticas (precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar e temperaturas máxima e mínimas) registradas na Estação Meteorológica Automática da FEI-UEM ao longo do período experimental (outubro a dezembro de 2017 e janeiro a setembro de 2018).....	43
FIGURA 2 Lâmina foliar, colmo + bainha, produção de massa de forragem (2A e 2B), acúmulo diário e acúmulo anual de massa de forragem (2C e 2D) de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. BRS Paiaguás inoculada com bactérias promotoras do crescimento de plantas e doses de N-fertilizante.	44
FIGURE 1 Climatic conditions (rainfall, relative humidity, maximum and minimum temperatures) registered at the Automatic Meteorological Station (FEI-UEM) over the experimental period (October to December 2017 and January to September 2018).....	66
FIGURE 2 leaf blade, stem+sheath, forage mass (2A and 2B), daily forage mass accumulation and yearly forage mass accumulation (2C e 2D) of <i>Urochloa ruziziensis</i> inoculated with plant growth-promoting bacteria and N-fertilizer doses.	67

RESUMO

A inoculação de bactérias promotoras do crescimento de plantas é uma alternativa sustentável para a recuperação e manutenção de pastagens. Neste sentido, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito da inoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas nas características estruturais e produtivas de *Urochloa* (syn. *Brachiaria*) *brizantha* cv. BRS Paiaguás e *Urochloa ruziziensis*. O experimento foi desenvolvido em delineamento em blocos casualizados, em parcelas em esquema fatorial 4x3. Os tratamentos consistiram de três bactérias (*Azospirillum brasilense* Ab-V5, *Pseudomonas fluorescens* CCTB03 e *Pantoea ananatis* AMG521), mais o tratamento controle (sem bactéria), e três doses de N-fertilizante (zero, 50 e 100 kg de N ha⁻¹). Foram utilizados 15 mL de inóculo para cada kg de semente de cada capim. Os capins eram colhidos quando apresentavam, em média, 95% de interceptação luminosa, deixando-se 15 cm de altura de resíduo. Para o capim Paiaguás, a estirpe CCTB03 proporcionou os melhores parâmetros para massa de forragem, lâmina foliar, colmo+bainha e acumulo diário e anual de massa de forragem. Para valores nutritivos, não houve influência da inoculação. Houve interação entre as bactérias e N-fertilizante para o comprimento radicular. Para a *U. ruziziensis*, não houve influência dos fatores testados sobre a massa de forragem, lâmina foliar, colmo+bainha, acumulo diário e anual de massa de forragem e valor nutritivo. Contudo, houve interação entre as bactérias e N-fertilizante para área radicular, comprimento radicular e densidade radicular. A inoculação do capim Paiaguás proporcionou aumentos na produção de biomassa de raízes e melhor morfologia radicular. O uso de BPCP é uma prática viável a ser utilizada na inoculação de espécies de gramíneas do gênero *Urochloa*, promovendo benefícios para o crescimento e desenvolvimento, tornando-se, assim, uma opção de manejo para as gramíneas forrageiras nos trópicos.

Palavras-chave: biotecnologia, nitrogênio, fitormônios do crescimento vegetal, microrganismos endofíticos, rizobactérias

ABSTRACT

The inoculation of plant growth promoting bacteria (PGPB) is a sustainable alternative for pasture recovery and maintenance. In this sense, this study aimed to evaluate the effect of the inoculation of PGPB in the structural and productive characteristics of *Urochloa* (syn. *Brachiaria*) *brizantha* cv. BRS Paiaguás and *Urochloa ruziziensis*. The experiment was developed in a randomized block design, within plots in 4x3 factorial scheme. The treatments consisted of three bacteria (*Azospirillum brasilense* Ab-V5, *Pseudomonas fluorescens* CCTB03 and *Pantoea ananatis* AMG521) plus the control treatment (with no bacteria), and three doses of N-fertilizer (zero, 50 and 100 kg de N ha⁻¹). 15 mL of inoculum were used for each kg of seeds of each grass. The grass was harvested when they presented, on average, 95% of light interception, at 15 cm of stubble height. For Paiaguás grass, the CCTB03 strain allowed the best parameters for forage mass, leaf blade, stem+sheath and daily and yearly accumulation of forage mass. With regard to nutritious values, the inoculation had no influence. There was interaction between the bacteria and N-fertilizer regarding root length. As for *U. ruziziensis*, there was no influence of the factors tested on forage mass, leaf blade, stem+sheath, daily and yearly accumulation of forage mass and nutritious value. However, there was interaction between the bacteria and N-fertilizer when it comes to root area, root length and root density. The inoculation of Paiaguás grass led to increases in the production of root biomass and better root morphology. The use of PGPB is a viable practice to be applied in the inoculation of grass species of the *Urochloa* genera, providing benefits to the growth and development of the plant, thus, becoming an option of forage grass management in the tropics.

Keywords: biotechnology, *Urochloa*, plant growth phytohormones, endophytic microorganisms, rhizobacteria

I - INTRODUÇÃO

Uma das preocupações mais eminentes na atualidade é a grande demanda em aumentar o volume de produção de alimentos, devido ao crescimento da população mundial. Neste contexto, o Brasil tem um papel de destaque por ser um país de dimensões continentais e condições edafoclimáticas ideais para o cultivo, o que faz com que sempre figure entre os maiores produtores e exportadores de grãos e produtos de origem animal (Camargo et al., 2017).

O rebanho bovino mundial é de aproximadamente 1,47 bilhão de cabeças, dos quais 15%, algo em torno de 218 milhões de cabeças, se concentram no Brasil, (FAO, 2018). De acordo com dados preliminares do Censo Agro 2017, o rebanho brasileiro está distribuído em 165 milhões de ha (IBGE, 2017). Das áreas ocupadas por pastagens, mensura-se que cerca de 50% se encontram em estágio avançado de degradação (Dias-Filho, 2016).

A degradação de pastagens é um processo evolutivo que ocasiona perdas em sua capacidade de suporte, afetando sua perenidade e regeneração natural, tornando-as incapaz de atingir os níveis de produção sustentáveis e as exigências nutricionais requeridas pelos animais (Macedo et. al., 2000).

A escassa reposição de nutrientes para as plantas está entre as principais causas da degradação das pastagens (De Moraes et al., 2011). Dentre os nutrientes requeridos pelas plantas, o N se destaca como principal elemento para que seja assegurada a manutenção

da produtividade das pastagens (Werner, 1994), sendo sua aplicação mediante o uso de N-fertilizantes.

Porém, vale ressaltar que o N-fertilizante no sistema apresenta perdas expressivas via volatilização, desnitrificação e, em algumas regiões, por lixiviação (Martha Júnior et al., 2004), além de ocasionar problemas ambientais ligados ao seu mau uso (De Campos et al., 2003). Por essa razão, é crescente a preocupação em buscar tecnologias alternativas sustentáveis para a nutrição de plantas forrageiras.

A exploração do potencial da fixação biológica de nitrogênio (FBN) é considerada uma alternativa viável para a utilização em pastagens de gramíneas tropicais, devido à possibilidade de incrementar a produção de massa de forragem, ao passo que aumenta o valor nutritivo do pasto. A FBN é realizada por um grupo restrito de bactérias denominadas diazotróficas, comumente conhecidas como bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) (Reis, 2007). No processo, o N_2 atmosférico é convertido em compostos nitrogenados que podem ser assimilados pelas plantas (Nunes et al., 2003).

As BPCP vêm sendo estudadas e descritas como promotoras do crescimento vegetal, em função da produção de substâncias que auxiliam no crescimento radicular e proporcionam uma interação das raízes das plantas com a ciclagem de nutrientes (Moreira et al., 2010).

Na literatura, já são de conhecimento comum os benefícios promovidos pelas BPCP em culturas agrícolas como o milho, o trigo e o arroz. Contudo, em se tratando de plantas forrageiras, esse conhecimento ainda é insuficiente devido à escassez de trabalhos com as espécies disponíveis no mercado. Por isso, a avaliação dos efeitos das BPCP no estabelecimento, manutenção e produção de plantas forrageiras de uso comercial se torna essencial para modernizar a produção animal a pasto e torná-la mais sustentável.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Pastagens no Brasil

A produção pecuária é realizada de diversas formas, em diferentes sistemas de produção e com uma ampla diversidade de raças em todo o planeta (Steinfeld et al., 2006). Na atual conjuntura, o Brasil se caracteriza como o segundo maior produtor e o maior exportador mundial de carne bovina. A produção pecuária brasileira é baseada na criação

a pasto e, portanto, um modelo de produção mais econômico (Carvalho et al., 2009; Jank et al., 2013). Dos 350 milhões de ha destinados as atividades agropecuárias no território nacional, 47,1% é ocupada por pastagens, sendo que 13,9% esta cultivada com pastagens naturais e 33,2% com pastagens cultivadas (IBGE, 2017).

As altas taxas de lotações exercidas nas pastagens do Brasil, devido a negligência empregada no manejo do pastejo e, a não utilização de técnicas difundidas como a altura ideal para a colheita do pasto, são algumas das causas que contribuem para a degradação das pastagens (Borghetti et al., 2013). Segundo Parsons e Chapman (2000), uma alta remoção da área foliar do pasto reduz a maquinaria fotossintética, e sucessivas desfolhas drásticas acarretam na perda da capacidade de rebrota do pasto. Nessas circunstâncias, a busca do equilíbrio entre rendimento e qualidade da forragem é reflexo da sustentabilidade do modelo pecuário, alavancando os indicadores produtivos (Nascimento Júnior et al., 1994).

A área destinada a produção animal é caracterizada por solos ácidos e de média a baixa fertilidade, ocupados por *Urochloa* sp. e *Panicum* sp., gêneros que possuem características adaptativas às condições tropicais brasileira (Ferraz e De Felício, 2010; Resende et al., 2015).

A produtividade média da atividade pecuária nessas áreas de pastagens situa-se em torno de 5,1 @.ha.ano, sendo assim, a adoção de tecnologias que venham a auxiliar no manejo das pastagens, podem trazer incrementos significativos (Torres Júnior et al., 2013).

1.2. Uso de BPCP em gramíneas forrageiras

A associação de gramíneas a bactérias promotoras do crescimento de plantas ocorre de forma natural no ambiente da rizosfera, uma vez que ambos organismos se beneficiam dos produtos sintetizados e disponibilizados no ambiente a partir das suas atividades metabólicas. Por essa razão, acredita-se no potencial da interação BPCP-gramínea como alternativa inovadora e sustentável ao modelo convencional de produção animal a pasto.

Há 60 anos, Döbereiner e Ruschel (1958) isolaram a primeira bactéria com potencial de associação com gramíneas. Desde então, as pesquisas se intensificaram e outras bactérias vêm sendo identificadas. O Brasil tem grande participação, contribuindo como fonte e referência nesta área de estudo. As rizobactérias promotoras do crescimento

de planta, assim denominadas por Kloepper e Schroth (1978), são definidas como a ampla gama de microrganismos que habitam a rizosfera e promovem o crescimento das espécies vegetais hospedeiras (Freitas, 2007). Bashan e Holguin (1997) sugeriram a alteração da nomenclatura de “rizobactérias” para “bactérias”, assim, surgindo o termo “bactérias promotoras do crescimento de plantas” (BPCP).

As BPCP, a partir da interação com as plantas, possibilitam a captação de recursos, a inibição de patógenos (Glick, 2012), além da produção de sideróforos, solubilização de fosfato, produção de auxinas como ácido indol-acético (AIA), 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase e FBN, usando o complexo enzimático da nitrogenase como substâncias promotoras do crescimento (Ahemad e Kibret, 2014).

O uso dessas bactérias surge em resposta à pressão exercida nos sistemas agrícolas, por causa da utilização de fontes poluidoras do meio ambiente, a exemplo do N-fertilizante. Essa fonte alternativa devido à capacidade de FBN, possibilita uma substituição total ou parcial do uso de N-fertilizantes (Baldani e Baldani, 2005; Bergamaschi et al., 2007; Hungria et al., 2010; Mus et al., 2016; Gouda, 2018).

O uso indiscriminado de fertilizantes como o N e o P, em algumas culturas, levou à poluição do solo, ar e água (Gupta et al., 2015). Assim, processos como fitorremediação, pelo sequestro de carbono (Hungria et al., 2016), e biorremediação, pelas BPCP (Glick, 2012), ganham espaço e trazem um novo conceito para a produção de alimentos. Dentre os microrganismos que apresentam benefícios às culturas agrícolas, podemos destacar as bactérias de vida livre, com ênfase para a *P. fluorescens*, a *P. putida* e a *A. brasilense* (De Melo et al., 1998).

A contribuição da FBN em gramíneas é de 25 a 50 kg N ha⁻¹ ano, contribuição esta que corresponde a cerca de 17% das demandas das culturas (Moreira et al., 2010), acarretando em redução nos custos de produção. Resultados expressivos têm sido obtidos com a inoculação de BPCP em trigo, milho e arroz, principais fontes de carboidrato na dieta humana.

Quando comparada com o tratamento sem bactérias, a inoculação proporcionou incremento médio de 26% na produtividade do milho (*Zea mays L.*) e de 31% na produtividade do trigo (*Triticuma estivum L.*) (Hungria, 2011). Lana et al. (2012) observou incrementos médios de 7 a 15% na produtividade do milho. Em experimentos com *U. brizantha* cv. Marandu e *U. ruziziensis* associadas a BPCP e doses de N-

fertilizantes, foram observados incrementos de 22% na produção de biomassa (Hungria et al., 2016).

Duarte et al. (2020) verificaram nos capins Marandu e Paiaguás melhores taxas de alongamento de folhas, colmos e número de perfilhos basais com a inoculação das estirpes CCTB03 e AMG521, e no capim Ruziziensis, maior duração de vida e taxa de renovação das folhas, e menor senescência foliar com a inoculação das estirpes AMG521, Ab-V5 e Ab-V6. Esse resultado indicou a especificidade dos efeitos das estirpes bacterianas em diferentes genótipos de *Urochloa*.

1.2.1. *Azospirillum* sp.

O gênero *Azospirillum* caracteriza-se como bactérias Gram-negativas, pertencentes à subdivisão – proteobacteria, aeróbica, não-fermentativa, vibróide, e que, em sua grande maioria, atuam como promotores do crescimento de plantas (Reis et al., 2010). Possuem 15 espécies descritas: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. dobereineriae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. canadense*, *A. zaeae*, *A. rugosum*, *A. palatum*, *A. picise*, *A. thiophilum*. Muitas dessas espécies foram descritas recentemente, e o maior número de estudos está pautado nas espécies *A. lipoferum*, *A. brasilense* (Tarrand et al. 1978).

Podemos citar alguns efeitos benéficos da utilização dessas bactérias, como a síntese de auxinas, citoquininas e giberelinas (Bashan et al. 2004; Orlandini et al. 2014). Em um compilado de dados de 22 anos de pesquisa, Okon e Vanderleyden (1997) concluíram que o gênero *Azospirillum* promove incrementos na produção de diversas culturas, e em variadas condições edafoclimáticas. Os mesmos autores enfatizam que, além da FBN, as plantas conseguem explorar melhor o solo, devido à modificação do sistema radicular. Cerca de 80% das bactérias podem sintetizar o AIA, dentre elas a *A. brasilense* (Vande Broek e Vanderleyden, 1995; Miransari e Smith, 2014; Fukami et al. 2017).

Impulsionada por práticas mais sustentáveis na agricultura, a utilização de inoculantes bacterianos tem crescido consideravelmente, tendo as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 alcançado a comercialização de cerca de 5 milhões de doses nas safras 2017 e 2018 (Hungria et al., 2018).

A partir da inoculação da *A. brasilense* associada a 40 kg de N ha⁻¹ em *U. brizantha* e *U. ruziziensis*, foi verificado incremento no acúmulo de massa de forragem de 16,7%, evidenciando que há um sinergismo dessa prática em baixas doses de N-fertilizantes (Hungria et al., 2016).

Em *U. brizantha* cv. Marandu inoculado com a *A. brasilense*, houve aumento no acúmulo de forragem de 11% em relação às plantas não inoculadas (Leite et al., 2019). A inoculação das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 em capim Coastcross-1, proporcionou melhor estabelecimento e produção de forragem, especialmente quando não associadas às doses N-fertilizantes (Aguirre et al., 2018). A associação das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 à *U. ruziziensis* possibilitou melhor desempenho na duração e taxa de renovação das folhas e senescência foliar (Duarte et al., 2020).

1.2.2. *Pseudomonas* sp.

O gênero *Pseudomonas* pertence à Família *Pseudomonadaceae*, caracterizadas como bacilos Gram-negativos, não esporulados, com flagelos, totalizando dez espécies conhecidas. Entre as bactérias promotoras do crescimento de plantas, esse gênero detém o maior volume de relatos, pela sua ampla distribuição e ocorrência natural em diferentes regiões.

As *Pseudomonas* possuem a habilidade de colonizar diferentes ambientes rizosférico, devido a versatilidade nutricional e a diversidade de metabólitos produzidos, como antibióticos, sideróforos e hormônios do crescimento. As espécies mais relevantes para a agricultura são a *P. fluorescens* e a *P. putida*, em razão da eficiência em promover o desenvolvimento e a produtividade de plantas (Sottero, 2003).

A *P. fluorescens* é reconhecida pela sua capacidade de estimular o crescimento vegetal. Apresenta-se em forma de bastonetes e necessita de oxigênio para sobreviver, além de possuir em sua extremidade vários flagelos que permitem a sua locomoção no solo. Possui capacidade de atuar nas plantas como inibidores de patógenos, solubilizadora de fosfatos e produtora de hormônios do crescimento (Coelho et al., 2007). Por isso tem se despontado como umas das mais importantes bactérias promotoras do crescimento de plantas com potencial para a produção de inoculantes comerciais (Naik et al., 2008).

As estirpes de *Pseudomonas* secretam diferentes quantidades de ácidos orgânicos, o que possibilita aumentar a disponibilidade de P para as plantas, por meio de

mineralização, que ocorre pela liberação de fosfatases ou solubilização de fosfatos inorgânicos, por meio dos ácidos orgânicos (Duijff et al., 1997).

A inoculação da estirpe ANP15 em trigo, possibilitou maior taxa de germinação das sementes e produção de massa seca das plantas (Hunter et al., 2014). Na cultura do milho, foi observado maior altura das plantas a partir da inoculação (Cardoso et al., 2008).

Chaves et al. (2013) observaram que a inoculação da *P. fluorescens* proporcionou no milho possibilitou maior eficiência da ação do superfosfato triplo e do fosfato reativo, resultando em maior teor de P nas folhas. Em outro estudo com fontes de fósforo menos solúveis, notou-se maior capacidade da *P. fluorescens* em solubilizar fosfatos, atribuindo a esta estirpe com alternativa sustentável para melhorar disponibilidade dessa fonte de P (Zamariolli, 2016).

A *P. fluorescens* está entre as 80%, aproximadamente, das bactérias que podem sintetizar o AIA (Miransari e Smith, 2014). Foi verificado no estudo de Benizri et al. (1997), maior síntese de AIA com a inoculação da *P. fluorescens* em sementes de milho, o que refletiu em maior produtividade. Outros autores também relataram os benéficos da inoculação de *P. fluorescens* no milho (Andreotti et al., 2008; Baldotto et al., 2012).

Para a *U. brizantha* inoculada com a *P. fluorescens*, houve aumento na produção de massa de forragem (Lopes et al., 2018). Nos capins Marandu e Paiaguás inoculados com a estirpe CCTB03, foi observado melhores taxas de alongamento de folhas, colmos e número de perfilhos basais (Duarte et al., 2020). Contudo, ainda são escassos os resultados de estudos com a inoculação de *P. fluorescens* plantassem gramíneas forrageiras de interesse zootécnico.

1.2.3. *Pantoea* sp.

O gênero *Pantoea* é pertencente à Família das *Enterobacteriaceae*, sendo ela descrita como bactéria endofítica Gram-negativa. Foi isolada por sua capacidade de promover o crescimento das plantas e maximizar a produtividade das culturas agrícolas (Kim et al., 2012; De Maayer et al., 2014) e pode ser encontrada em vários nichos e hospedeiros ecológicos (Weller-Stuart et al., 2017).

A *Pantoea* spp., é descrita como grupo bacteriano com estirpes de ação patogênica e não patogênica (De Maayer et al., 2014). Seus hospedeiros são amplos e englobam uma gama de plantas e humanos (Coutinho e Venter, 2009). Dentre as plantas colonizadas pela

Pantoea spp., destacam-se o milho, o algodão (McInroy e Kloepper, 1995), a soja (Son et al., 2006) e o eucalipto (Ferreira et al., 2008).

Esse gênero possui habilidades como a promoção do crescimento de plantas, a partir da produção de sideróforos, auxinas (ácido indol-acético) e celulase (Megías et al., 2017).

Resultados de estudos demonstram que a inoculação de *Pantoea* spp., promoveu aumentos na ordem de 10 a 60% na produção de biomassa e grãos de plantas como a alfafa (*Medicago sativa*), *U. brizantha* e o arroz (Megías et al., 2017).

Em culturas como o arroz, o gênero demonstra a capacidade de colonização e aumento da produção, a partir de mecanismos como a FBN, a produção de fito-hormônios e a solubilização de fosfato (Verma et al., 2001). Na cultura da soja, esse gênero promove a solubilização de fosfato (Son et al., 2008) e, no arroz, demonstra forte colonização de tecidos radiculares (Verma et al., 2004). Em *Urochloa* spp., também têm sido verificadas respostas positivas sobre os parâmetros morfogênicos e estruturais com a inoculação de *P. ananatis* (Duarte et al., 2020).

1.3. Adubação nitrogenada

A utilização de N-fertilizantes em pastagens é uma prática que visa aumentar a produção de massa de forragem e a perenidade dos pastos, refletindo no aumento dos indicadores do sistema pecuário (Martha Júnior et al., 2004; Martha Júnior et al., 2007; Cecato et al. 2011).

O nitrogênio é fundamental para a síntese de ácidos nucleicos, proteínas, hormônios, clorofila e outros compostos essenciais no desenvolvimento da planta, além de incrementos na produção de matéria seca (Santos, 2004).

O nitrogênio é o principal nutriente requerido para a manutenção da produtividade das pastagens (Werner, 1994), sendo necessária sua aplicação via N-fertilizantes. No entanto, o seu uso indiscriminado ocasiona poluição ambiental devido à ocorrência de perdas por volatilização, desnitrificação e lixiviação (Martha Júnior et. al., 2004).

A absorção de N se dá via sistema radicular, e ocorre tanto na forma de íons orgânicos (nitrato e amônio) (Marschner, 2011) quanto na forma orgânica (ureia e aminoácidos) (Majerowicz, 1997; Persson e Näsholm, 2003). Essas absorções dependem de sistemas específicos de transporte molecular, com alta e baixa afinidade pelos íons orgânicos, que ocorrem simultaneamente, permitindo absorções sob altas e baixas

concentrações de N (Le Bot et al., 1998; Gastal e Durant, 2000). Outra forma é a utilização do nitrogênio endógeno, oriundos da remobilização de órgãos da planta que estão em processo de senescência, para tecidos que estão em crescimento ou para a manutenção de órgãos já produtivos (Lemaire e Millard, 1999; Santos, 2004).

Durante o crescimento vegetativo, as características morfogênicas (taxa de aparência da folha, taxa de alongamento da folha e duração da folha) determinam a estrutura do pasto e, aliadas às variáveis tamanho de folha, número de folhas por perfilho e densidade populacional de perfilhos, refletem a quantidade de área foliar disponível para interceptação luminosa (Lemaire e Chapman, 1996; Cruz et al., 2000). O N-fertilizante atua diretamente nessas características para promover aumentos de produção.

Existem três formas de o N ser importado no sistema solo-planta, sendo elas: decomposição atmosférica, FBN e adubações químicas ou orgânicas. Ao passo que são importados, sua exportação do sistema se dá por meio de remoção das culturas e perdas inerentes à sua aplicação (Cecato et al., 2011).

Estudos têm testado os efeitos do N-fertilizante em cultivares de *Urochloa* como a *U. brizantha* cv. Marandu (Alexandrino et al., 1999; Santos Júnior et al., 2001; Cecato et al., 2004), *U. brizantha* cv. Xaráes (Martuscello et al., 2005; Cabral et al., 2012), *U. brizantha* cv. Piatã (Santos et al., 2017), *U. brizantha* cv. Paiaguás (Germano et al., 2018), *U. decumbens* (Primavesi et al., 2004; Fagundes et al., 2005; Da Silva et al., 2012), *U. ruziziensis* (De Andrade et al., 1996).

CITAÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre, P. F., Olivo, C. J., Rodrigues, P. F., Falk, D. R., Adams, C. B., Schiafino, H. P. (2018). Forage yield of Coastcross-1 pastures inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 40, e36392.

Ahemad, M., Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science*, 26, 1-20.

Alexandrino, E., Nascimento Jr, D., Mosquim, P. (1999). Efeito da adubação nitrogenada e da frequência de corte na rebrotação da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. II. Características morfogênicas e estruturais. In G. Lemaire, J. Hodgson, A. Moraes, P. C. F. Carvalho, C. Nabinger (Eds.), *Grassland Ecophysiology and Grazing Ecology*, (pp. 287-290). University Press, Cambridge: CABI Publishing

- Andreotti, M., Lodo, B. N., Basso, F. C., Pariz, C. M., Buzetti, S. (2008). Avaliação da eficiência agrônômica do inoculante Rizofós contendo *Pseudomonas fluorescens* em cultivo de milho safrinha. *Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas*, Londrina, Paraná, Brasil, 28.
- Baldani, J. I., Baldani, V. L. (2005). History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77, 549-579.
- Baldotto, L. E. B., Silva Jr, L. G., Canellas, L. P., Olivares, F. L., Baldotto, M. A. (2012). Initial growth of maize in response to application of rock phosphate, vermicompost and endophytic bacteria. *Revista Ceres*, 59, 262-270.
- Bashan, Y., Holguin, G. (1997). *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*, 43, 103-121.
- Bashan, Y., Holguin, G., De-Bashan, L. E. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian journal of microbiology*, 50, 521-577.
- Benizri, E., Schoeny, A., Picard, C., Courtade, A., Guckert, A. (1997). External and internal root colonization of maize by two *Pseudomonas* strains: enumeration by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Current microbiology*, 34, 297-302.
- Bergamaschi, C., Roesch, L. F. W., Quadros, P. D. D., Camargo, F. A. D. O. (2007). Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. *Ciência Rural*, 37, 727-733.
- Borghini, E. C. A. C., Crusciol, C. A. C., Nascente, A. S., Sousa, V. V., Martins, P. O., Mateus, G. P., Costa, C. (2013). Sorghum grain yield, forage biomass production and revenue as affected by intercropping time. *European Journal of Agronomy*, 51, 130-139.
- Cabral, W. B., Souza, A. L. D., Alexandrino, E., Toral, F. L. B., Santos, J. N. D., Carvalho, M. V. P. D. (2012). Características estruturais e agrônômicas da *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés submetida a doses de nitrogênio. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41, 846-855.
- Camargo, F. A. O., Silva, L. S., Merten, G. H., Carlos, F. S., Baveye, P. C., Triplett, E. W. (2017). Brazilian agriculture in perspective: great expectations vs reality. *Advances in Agronomy*, 41, 53-114.

- Cardoso, I. C. M.; Mariotto, J. R.; Klauberg Filho, O.; Santos, J. C. P.; Felipe, A. F.; Neves, A.N.; Miquelutti, D. J. (2008). Resposta de milho (*Zea mays* L.) precoce à inoculação de rizobactérias em casa-de-vegetação. In *Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas*, Londrina, Paraná, Brasil, 28.
- Carvalho, T.B., Zen, S., Tavares, E.C.N. (2009). Comparação de custo de produção na atividade de pecuária de engorda nos principais países produtores de carne bovina. In *Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural*, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 47. Disponível em <https://docplayer.com.br/15583452-Comparacao-de-custo-de-producao-na-atividade-de-pecuaria-de-engorda-nos-principais-paises-produtores-de-carne-bovina.html>
- Cecato, U., Pereira, L. A. F., Jobim, C. C., Martins, E. N., Branco, A. F., Galbeiro, S., Machado, A. O. (2004). Influência das adubações nitrogenada e fosfatada sobre a composição químico-bromatológica do capim Marandu (*Brachiaria brizantha* (Hochst) Stapf cv. Marandu). *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 26, 399-407.
- Cecato, U., Galbeiro, S., Paris, W., Soares Filho, C. V., Teixeira, S. (2011). Uso de nitrogênio em pastagens. In U. Cecato, M. A. A. F. Barbosa, S. Galbeiro, W. Paris, F. C. A. R. Grecco, C. S. Viegas, S. Teixeira (Eds.), *Simpósio de Produção Animal a Pasto*, (pp. 117-162). Maringá: Sthampa.
- Chaves, D. P., Zucareli, C., de Oliveira Junior, A. (2013). Fontes de fósforo associadas à inoculação com *Pseudomonas fluorescens* no desenvolvimento e produtividade do milho. *Semina: Ciências Agrárias*, 34, 57-72.
- Coelho, L. F., Freitas, S. D. S., Melo, A. M. T. D., Ambrosano, G. M. B. (2007). Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus* spp. com a rizosfera de diferentes plantas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 31, 1413-1420.
- Coutinho, T. A., Venter, S. N. (2009). *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Molecular plant pathology*, 10, 325-335.
- Cruz, P., Boval, M. (2000). Effect of nitrogen on some morphogenetic traits of temperate and tropical perennial forage grasses. In G. Lemaire, J. Hodgson, A. de Moraes, C. Nabinger and P.C. de F. Carvalho (Eds.), *Grassland Ecophysiology and Grazing Ecology*, (pp. 151-168). University Press, Cambridge: CABI Publishing.

Da Silva, T. C., Perazzo, A. F., Macedo, C. H. O., Batista, E. D., Pinho, R. M. A., Bezerra, H. F. C., Santos, E. M. (2012). Morfogênese e estrutura de *Brachiaria decumbens* em resposta ao corte e adubação nitrogenada. *Archivos de Zootecnia*, 61, 91-102.

de Andrade, J. B., Benintende, R. P., Junior, E. F., Paulino, V. T., Henrique, W., Werner, J. C., de Mattos, H. B. (1996). Efeito das adubações nitrogenada e potássica na produção e composição da forragem de *Brachiaria ruziziensis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 31, 617-620.

De Campos, D. V. B., De Resende, A. S., José, B. (2003). Contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura de arroz sob inundação. *Agronomia*, 37, 41-46.

De Maayer, P., Chan, W. Y., Rubagotti, E., Venter, S. N., Toth, I. K., Birch, P. R., Coutinho, T. A. (2014). Analysis of the *Pantoea ananatis* pan-genome reveals factors underlying its ability to colonize and interact with plant, insect and vertebrate hosts. *BMC genomics*, 15, 404.

De Melo, I. S. (1998). Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. De I. S. Melo, De J. L. Azevedo (Eds.), *Ecologia microbiana*, (pp. 87-116). Jaguariúna: Embrapa-CNPMA.

De Moraes, A., Piva, J. T., Dieckow, J., Carvalho, P. C. F., Monteiro, A. L. G. (2011). Degradação de pastagem – ILP como instrumento de manejo para a recuperação. In U. Cecato, M. A. A. F. Barbosa, S. Galbeiro, W. Paris, F. C. A. R. Grecco, C. S. Viegas, S. Teixeira (Eds.), *Simpósio de Produção Animal a Pasto*, (pp. 13-38). Maringá: Sthampa.

Dias-Filho, M. B. (2014). *Diagnóstico das pastagens no Brasil*. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental.

Dias-Filho, M. B. (2016). *Uso de pastagens para a produção de bovinos de corte no Brasil: passado, presente e futuro*. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental.

Döbereiner, J., Ruschel, A. P. (1958). Uma nova espécie de *Beijerinckia*. *Revista de Biologia*, 1, 261-272.

Duarte, C. F. D., Cecato, U., Hungria, M., Fernandes, H. J., Biserra, T. T., Galbeiro, S., Toniato, A.K.B., & da Silva, D. R. (2020). Morphogenetic and structural characteristics of *Urochloa* species under inoculation with plant-growth-promoting bacteria and nitrogen fertilisation. *Crop and Pasture Science*, 71, 82-89.

Duijff, B. J., Gianinazzi-Pearson, V., Lemanceau, P. (1997). Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by

biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *The New Phytologist*, 135, 325-334.

Fagundes, J. L., Fonseca, D. M. D., Gomide, J. A., Nascimento Junior, D. D., Vitor, C. M. T., Morais, R. V. D., R.V.D., Mistura, C., Reis, G.D.C., Martuscello, J. A. (2005). Acúmulo de forragem em pastos de *Brachiaria decumbens* adubados com nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40, 397-403.

FAO. Food And Agriculture Organization Of The United Nations (FAO). FAO, 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>>. Acesso em: 14 nov. 2019.

Ferraz, J. B. S., de Felício, P. E. (2010). Production systems-An example from Brazil. *Meat science*, 84, 238-243.

Ferreira, A., Quecine, M. C., Lacava, P. T., Oda, S., Azevedo, J. L., & Araújo, W. L. (2008). Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS microbiology letters*, 287, 8-14.

Freitas, S. S. (2007). Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. In A. P. D. Silveira, S. S. Freitas (Eds.), *Microbiologia do solo e qualidade ambiental*, (pp. 1-20). Campinas: Instituto Agrônomo.

Fukami, J., Ollero, F. J., Megías, M., Hungria, M. (2017). Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express*, 7, 153.

Gastal, F., Durand, J. L. (2000). Effects of nitrogen and water supply on N and C fluxes and partitioning in defoliated swards. In G. Lemaire, J. Hodgson, A. de Moraes, PC de F. Carvalho and C. Nabinger (Eds.), *Grassland Ecophysiology and Grazing Ecology*, (pp. 15-39). University Press, Cambridge: CABI Publishing.

Germano, L. H. E., Vendruscolo, M. C., Daniel, D. F., Dalbianco, A. B. (2018). Produtividade e características agronômicas de *Brachiaria brizantha* cv. Paiaguás submetida a doses de nitrogênio sob cortes. *Boletim De Indústria Animal*, 75, 1-14.

Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 1-15.

Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H. S., Patra, J. K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological research*, 206, 131-140.

- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K., Singh, V. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 7, 096-102.
- Hungria, M., Campo, R. J., Souza, E. M., Pedrosa, F. O. (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and soil*, 331, 413-425.
- Hungria, M. (2011). *Inoculação com Azospirillum brasilense: inovação em rendimento a baixo custo*. Londrina: Embrapa Soja.
- Hungria, M., Nogueira, M. A., Araujo, R. S. (2016). 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*, 221, 125-131.
- Hungria, M., Ribeiro, R. A., Nogueira, M. A. (2018). Draft genome sequences of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6, commercially used in inoculants for grasses and legumes in Brazil. *Genome Announcements*, 6, e00393-18.
- Hunter, P. J., Teakle, G., Bending, G. D. (2014). Root traits and microbial community interactions in relation to phosphorus availability and acquisition, with particular reference to Brassica. *Frontiers in plant science*, 5, 27.
- IBGE. (2017). *Censo Agropecuário 2017*. Rio de Janeiro: IBGE.
- Jank, L., Barrios, S., Do Valle, C. B., Resende, R., Alves, G. (2013). The value of improved pastures to Brazilian beef. In International Symposium of Forage Breeding, Melbourne, Australia, 4. <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/970537/1/digitalizar0015.pdf>
- Jeon, J. S., Lee, S. S., Kim, H. Y., Ahn, T. S., Song, H. G. (2003). Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. *The Journal of Microbiology*, 41, 271-276.
- Kim, H. J., Lee, J. H., Kang, B. R., Rong, X., Gardener, B. B. M., Ji, H. J., Park, C.S., Kim, Y. C. (2012). Draft genome sequence of *Pantoea ananatis* B1-9, a nonpathogenic plant growth-promoting bacterium. *Journal of Bacteriology*, 194, 729-729.
- Kloepper, J. W., Schroth, M. N. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, INRA, Angers, France 4. https://www.researchgate.net/publication/284682983_Plant_growth-

promoting_rhizobacteria_on_radishes_IV_international_conference_on_plant_pathogenic_bacteria.

Lana, M. D. C., Dartora, J., Marini, D., Hann, J. E. (2012). Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. *Revista Ceres*, 59, 399-405.

Le Bot, J., Andriolo, J. L., Gary, C., Adamowicz, S., Robin, P. (1997). Dynamics of N accumulation and growth of tomato plants in hydroponics: an analysis of vegetative and fruit compartments. *Colloques de l'INRA* (France).

Leite, R. D. C., dos Santos, J. G., Silva, E. L., Alves, C. R., Hungria, M., Leite, R. D. C., dos Santos, A. C. (2019). Productivity increase, reduction of nitrogen fertiliser use and drought-stress mitigation by inoculation of Marandu grass (*Urochloa brizantha*) with *Azospirillum brasilense*. *Crop and Pasture Science*, 70, 61-67.

Lemaire, G., Chapman, D. (1996). Tissue flows in grazed plant communities. In J. Hodgson, A.W. Illius, (Eds.), *The ecology and management of grazing systems*, (pp. 3-36). Guildford: CAB International.

Lemaire, G., Millard, P. (1999). An ecophysiological approach to modelling resource fluxes in competing plants. *Journal of Experimental Botany*, 50, 15-28.

dos Santos Lopes, M. J., Dias Filho, M. B., dos Reis Castro, T. H., de Filippi, M. C. C., da Silva, G. B. (2018). Effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Burkholderia pyrrocinia* on the Growth Improvement and Physiological Responses in *Brachiaria brizantha*. *American Journal of Plant Sciences*, 9, 250-265.

Macedo, M. C. M., Kichel, A. N., Zimmer, A. H. (2000). *Degradação e alternativas de recuperação e renovação de pastagens*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte.

Majerowicz, N. (1997). *Crescimento, assimilação e teores de compostos nitrogenados em plantas de *Catasetum fibriatum* (Morren) Lindl. (Orchidaceae) cultivadas in vitro com diferentes fontes de nitrogênio*. Tese de Doutorado. USP: Universidade de São Paulo.

Marschner, H. (2011). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Academic press.

Martha Júnior, G. B., Vilela, L., Barioni, L. G., Sousa, D. D., Barcellos, A. D. O. (2004). *Manejo da adubação nitrogenada em pastagens*. In Simpósio sobre manejo da pastagem, Piracicaba, São Paulo, Brasil, 21.

Martha Junior, G. B., Vilela, L., De Sousa, D. M. G. (2007). *Cerrado: uso eficiente de corretivos e fertilizantes em pastagens*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados.

- Martuscello, J. A., Fonseca, D. M. D., Nascimento Júnior, D. D., Santos, P. M., Ribeiro Junior, J. I., Cunha, D. D. N. F. V., Moreira, L. D. M. (2005). Características morfogênicas e estruturais do capim-xaraés submetido à adubação nitrogenada e desfolhação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34, 1475-1482.
- McInroy, J. A., Kloepper, J. W. (1995). Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and soil*, 173, 337-342.
- Megías, E., Junior, F. B. R., Ribeiro, R. A., Ollero, F. J., Megías, M., Hungria, M. (2017). Genome Sequence of *Pantoea ananatis* Strain AMG 501, a Plant Growth-Promoting Bacterium Isolated from Rice Leaves Grown in Paddies of Southern Spain. *Genome Announcements*, 5, e00848-17.
- Miransari, M., Smith, D. L. (2014). Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, 99, 110-121.
- Moreira, F. M. D. S., Da Silva, K., Nóbrega, R. S. A., De Carvalho, F. (2010). Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, 1, 74.
- Mus, F., Crook, M. B., Garcia, K., Costas, A. G., Geddes, B. A., Kouri, E. D., Paramasivan, P., Ryu, M.H., Oldroyd, G.E., Poole, P.S., Udvardi, M. K. (2016). Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 3698-3710.
- NAÇÕES UNIDAS; DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS. POPULATION DIVISION. Population Division (2017). World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables. 2017.
- Naik, P. R., Raman, G., Narayanan, K. B., Sakthivel, N. (2008). Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BMC microbiology*, 8, 230.
- Nascimento Júnior, D. D., Queiroz, D. S., Santos, M. D. (1994). *Degradação das pastagens e critérios para avaliação*. In Simpósio sobre manejo de pastagem, Piracicaba, São Paulo, Brasil, 11.
- Nunes, F. S., Raimondi, A. C., Niedwieski, A. C. (2003). Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. *Química Nova*, 26, 872-879.
- Okon, Y., Vanderleyden, J. (1997). Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *ASM news*, 63, 366-370.

- Orlandini, V., Emiliani, G., Fondi, M., Maida, I., Perrin, E., Fani, R. (2014). Network analysis of plasmidomes: The *Azospirillum brasilense* Sp245 case. *International journal of evolutionary biology*, 1-14.
- Parsons, A. J., Chapman, D. F. (2000). The principles of pasture growth and utilization. In A. Hopkins (Ed.), *Grass, its production and utilization*, (pp. 31-89). London: Blackwell Science.
- Persson, J., Näsholm, T. (2003). Regulation of amino acid uptake by carbon and nitrogen in *Pinus sylvestris*. *Planta*, 217, 309-315.
- Primavesi, O., Primavesi, A. C., Corrêa, L. D. A., Armelin, M. J. A., Freitas, A. D. (2004). *Calagem em pastagem de Brachiaria decumbens recuperada com adubação nitrogenada em cobertura*. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste.
- Reis, V. M. (2007). *Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas*. Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia.
- Reis, V. M., Pedraza, R. O., Teixeira, K. D. S. (2010). *O gênero Azospirillum: diversidade e relação filogenética das espécies*. Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia.
- Santos Júnior, J. D. D. G. D. (2001). *Dinâmica de crescimento e nutrição do capim-marandu submetido a doses de nitrogênio*. Tese de Doutorado. USP: Universidade de São Paulo.
- Santos, M., Sousa, B. M. L., Rocha, G. O., Freitas, C. A. S., Silveira, M. C. T., Sousa, D. O. C. (2017). Sward structure and tiller characteristics in piatã grass pastures managed with variable nitrogen doses and deferment periods. *Ciência Animal Brasileira*, 18, 1-13.
- Santos, P. (2004). *Aspectos fisiológicos e metabólicos da nutrição nitrogenada de plantas forrageiras*. In Simpósio sobre manejo de pastagem, Piracicaba, São Paulo, Brasil, 21. Disponível em <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/46899/1/digitalizar0013.pdf>
- Son, H. J., Park, G. T., Cha, M. S., Heo, M. S. (2006). Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt-and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource technology*, 97, 204-210.
- Sottero, A. N. (2003). *Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias*. Dissertação de Mestrado. IAC: Instituto Agronômico de Campinas.
- Steinfeld, H., Wassenaar, T., Jutzi, S. (2006). Livestock production systems in developing countries: status, drivers, trends. *Revue Scientifique Et Technique*, 25, 505-516.

- Tarrand, J. J., Krieg, N. R., Döbereiner, J. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian journal of microbiology*, 24, 967-980.
- Torres Junior, A. D. M., Aguiar, G. A. M. (2013). Pecuária de corte no Brasil-potencial e resultados econômicos. In Encontro de Adubação de Pastagens da Scot Consultoria-Tec-Fértil, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 1.
- Vande Broek, A., Vanderleyden, J. (1995). Genetics of the *Azospirillum*-plant root association. *Critical reviews in plant sciences*, 14, 445-466.
- Verma, S. C., Singh, A., Chowdhury, S. P., Tripathi, A. K. (2004). Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. *Biotechnology letters*, 26, 425-429.
- Verma, S. C., Ladha, J. K., Tripathi, A. K. (2001). Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of biotechnology*, 91, 127-141.
- Weller-Stuart, T., De Maayer, P., Coutinho, T. (2017). *Pantoea ananatis*: genomic insights into a versatile pathogen. *Molecular plant pathology*, 18, 1191-1198.
- Werner, J. C. (1994). Adubação de pastagens de *Brachiaria* spp. In Simpósio sobre manejo de pastagem, Piracicaba, São Paulo, Brasil, 11.
- Zamariolli, L. E. R. (2016). Inoculação de *Pseudomonas* via semente e eficiência agrônômica de fosfatos na cultura do milho. Dissertação de Mestrado. UNESP: Universidade Estadual Paulista.

II - HIPÓTESE E OBJETIVOS GERAIS

Hipótese

A inoculação de bactérias promotoras do crescimento de plantas associadas a doses de N-fertilizante promove incrementos na massa de forragem e valor nutritivo de *Urochloa* spp.

Objetivos gerais

Avaliar o efeito da inoculação de bactérias promotoras do crescimento e doses de N-fertilizante na composição morfológica das plantas, produção de massa de forragem, acúmulo de forragem, perfilhamento e desenvolvimento do sistema radicular de *Urochloa brizantha* cv. BRS Paiaguás e *Urochloa ruziziensis*.

CAPÍTULO III

(Normas: Grass and Forage Science)

III - BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS NO DESENVOLVIMENTO DE *UROCHLOA BRIZANTHA* CV. BRS PAIAGUÁS

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito da inoculação de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) na massa de forragem, perfilhamento, valor nutritivo e sistema radicular de *Urochloa* (syn. *Brachiaria*) *brizantha* cv. BRS Paiaguás associadas a doses de N-fertilizante. As bactérias inoculadas foram *Azospirillum brasilense* Ab-V5, *Pseudomonas fluorescens* CCTB03 e *Pantoea ananatis* AMG 521, mais o tratamento controle (sem bactéria), associada a doses de N-fertilizante (0, 50 e 100 kg N ha⁻¹). O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 4x3, com quatro repetições, totalizando 48 parcelas (12 m²). A estirpe CCTB03 proporcionou incrementos de 15% (276 kg de MS ha⁻¹) na produção de lâmina foliar, 16% (609 kg de MS ha⁻¹) na massa de forragem e 15% (3218 kg de MS ha⁻¹ ano⁻¹) no acúmulo anual de massa de forragem. O uso de N-fertilizante contribuiu para a maior produção de forragem. As BPCP e o N-fertilizante não demonstraram efeito sobre a proteína bruta, fibra em detergente neutro e ácido, digestibilidade *in vitro* da matéria seca, massa de raiz, área radicular, diâmetro radicular e densidade radicular. Houve interação entre BPCP e doses de N-fertilizante, com maior comprimento radicular (660 mm.dm³) observado com inoculação da estirpe AMG 521, na dose de 100 kg de N ha⁻¹. O uso de inoculantes é uma tecnologia alternativa viável e sustentável a produção de pastagem de capim Paiaguás, que demonstra potencial competitivo frente ao uso de N-fertilizantes.

PALAVRAS-CHAVE

massa de forragem, inoculação, N-fertilizante, perfilhamento, rizobactérias.

Abstract

The aim of this study was evaluating the effects of the inoculation of plant growth promoting bacteria (PGPB) on forage mass, tillering, nutritious values and root system of *Urochloa* (syn. *Brachiaria*) *brizantha* cv. BRS Paiaguás associated with doses of N-fertilizer. The bacteria inoculated were *Azospirillum brasilense* Ab-V5, *Pseudomonas fluorescens* CCTB03 and *Pantoea ananatis* AMG 521, plus the control treatment (with no bacteria), associated with doses of N-fertilizer (0, 50 and 100 kg N ha⁻¹). The experiment was designed within randomized blocks, in a 4x3 factorial scheme, with four replicates, totaling 48 plots (12 m²). The CCTB03 strain provided increments of 15% (276 kg of MS ha⁻¹) in the production of leaf blade, 16% (609 kg of MS ha⁻¹) in forage mass and 15% (3218 kg of MS ha⁻¹ year⁻¹) in the yearly accumulation of forage mass. The use of N-fertilizer contributed to a greater forage production. The PGPB and the N-fertilizer did not have any effects on crude protein, neutral detergent fiber, acid detergent fiber, *in vitro* digestibility of the dry matter, root mass, root area, root diameter and root density. There was an interaction between the PGPB and the doses of N-fertilizer with greater root length (660 mm.dm³) regarding the inoculation of the AMG 521 strain, in the dose of 100 kg de N ha⁻¹. The use of inoculants is a viable and sustainable alternative technology for pasture production of Paiaguás grass, which has a competitive potential in face of N-fertilizers.

KEYWORDS

herbage mass, inoculation, N-fertilizer, rhizobacteria, tillering.

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é considerado o principal nutriente limitante para o crescimento e desenvolvimento de pastagens tropicais (Werner, 1994). Porém, o uso de N-fertilizantes em pastagens é uma pratica comumente negligenciada pelos pecuaristas, o que contribui para o surgimento de áreas com degradação. Estima-se que dos 162,53 milhões de hectares de área de pastagem no Brasil, 1,6 mil ha⁻¹ apresenta estágio avançado de deterioração agrícola, 4,2 mil ha⁻¹ estão em estágio avançado de deterioração biológica,

9,7 mil ha⁻¹ requerem recuperação e 134,7 mil ha⁻¹ se encontram em bom estado (ABIEC, 2020).

A condição de degradação faz com que as pastagens apresentem baixa produtividade, não permitindo a máxima exploração do potencial das espécies de gramíneas forrageiras e dos animais criados a pasto. Macedo et. al. (2000) enfatizaram que a degradação de pastagens é um processo evolutivo que ocasiona perdas em sua capacidade de suporte, afetando sua perenidade e regeneração natural, tornando-as incapazes de atingir os níveis de produção sustentáveis e as exigências nutricionais requeridas pelos animais.

Se nas pastagens que se apresentam nessas condições forem usadas adequadamente as técnicas e tecnologias já existentes, como o correto manejo da pastagem e do pastejo, e as adubações, como o uso de N-fertilizantes, pode-se incrementar significativamente a produção animal a pasto. Contudo, o uso de algumas tecnologias necessita de maiores cuidados. A aplicação de N-fertilizante, por exemplo, proporciona à planta maior desenvolvimento, devido à aceleração do alongamento foliar e aumento do perfilhamento (Monteiro, 2013). No entanto, essa é uma prática que eleva os custos de produção, além de ser prejudicial ao meio ambiente, uma vez que até 50% do N é perdido por volatilização ou lixiviação (Reis Junior et al., 2010). Por essa razão, é crescente a preocupação em buscar tecnologias alternativas sustentáveis para a nutrição de plantas forrageiras.

A exploração do potencial das bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) a partir de seus mecanismos como a fixação biológica de nitrogênio e a síntese de hormônios do crescimento, é considerada uma alternativa viável para a utilização em pastagens de gramíneas tropicais, devido à possibilidade de incrementar a produção de massa de forragem, ao passo que aumenta o valor nutritivo do pasto.

É comum encontrar em estudos relatos sobre os benefícios promovidos pelas BPCP em culturas agrícolas como o milho, o trigo e o arroz. Contudo, em se tratando de plantas forrageiras, esse conhecimento ainda é insuficiente devido à escassez de trabalhos com as espécies disponíveis no mercado. Por isso, a avaliação dos efeitos das BPCP no estabelecimento, manutenção e produção de plantas forrageiras de uso comercial se torna essencial para modernizar a produção animal a pasto e torná-la mais sustentável.

Desde 2009, as bactérias do gênero *Azospirillum* estão autorizadas para a produção e uso de inoculantes comerciais em gramíneas no Brasil, devido à comprovação de aumento de produtividade em culturas como o milho e o trigo, aliada à redução do uso de N-fertilizantes (Hungria et al., 2010). Outro grupo de bactérias que tem se mostrado bastante promissor quando em associação com gramíneas são as *Pseudomonas* spp. Porém, ainda não estão disponíveis no mercado (Brennecke et al., 2016; Nascente et al., 2017; Lopes et al., 2018).

É possível encontrar estudos que demonstraram a eficiência das BPCP em reduzir a necessidade de uso de N-fertilizantes em gramíneas tropicais comumente utilizadas para a alimentação de animais a pasto, ao mesmo tempo em que foram observadas melhoras no estabelecimento e incrementos na produção de massa de forragem, a exemplo do gênero *Urochloa* (Hungria et al., 2016; Leite et al., 2018; Hungria et al., 2019; Duarte et al., 2020a), *Cynodon* (Aguirre et al., 2018) e *Megathyrsus* (syn. *Panicum*) (Andrade et al., 2019; Manarin et al., 2019; Luz et al., 2019).

Entender de fato como os efeitos das BPCP interagem com doses de N-fertilizante em diferentes fases de crescimento do pasto se torna fundamental não só para que possamos conhecer as respostas da inoculação desses microrganismos refletidas na estrutura da pastagem, como também para a obtenção de guias de tomadas de decisão para que os cientistas façam a transferência dessa tecnologia para o campo.

Neste contexto, objetivou-se avaliar o efeito da inoculação de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) na massa de forragem, perfilhamento, valor nutritivo e sistema radicular de *Urochloa brizantha* cv. BRS Paiaguás associadas a doses de N-fertilizante.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e design experimental

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), distrito de Iguatemi, Maringá, Paraná, Brasil (23°25'S, 51°57'W; 550 m a.m.s.l.), de outubro de 2016 a setembro de 2018.

O solo da área experimental é classificado como Latossolo Vermelho distrófico (Santos et al., 2018), e foi coletado na camada de 0-0,2 m de profundidade, apresentando as seguintes características químicas: potencial de hidrogênio (pH em H₂O) - 5,6; índice SMP - 6,6; fósforo (P-Mehlich) - 10,75 mg dm⁻³; potássio (K⁺) - 0,12 cmol_cdm⁻³; alumínio (Al³⁺) - 0,00 cmol_cdm⁻³; cálcio (Ca²⁺) - 1,36 cmol_cdm⁻³; magnésio (Mg²⁺) - 0,59 cmol_cdm⁻³ e saturação de bases (V) - 39,4%; capacidade de troca catiônica (CTC pH 7,0) - 5,25; matéria orgânica (MO) - 11,8 g dm⁻³; areia - 830 g kg⁻¹; silte - 30 g kg⁻¹ e argila - 140 g kg⁻¹. A correção da acidez do solo foi feita com calcário dolomítico, com elevação da saturação de bases para 50%, com incorporação de calcário dolomítico com PRNT = 91% (poder real de neutralização total).

A espécie de gramínea utilizada foi a *Urochloa ruziziensis* (Germain e Evrard). O experimento foi conduzido em delineamento experimental em blocos casualizados, arranjado em esquema fatorial 4x3 com quatro repetições, totalizando 48 parcelas, com dimensões de 4 x 3 m cada (12 m²).

As bactérias inoculadas foram *Azospirillum brasilense* Ab-V5 (=CNPSo 2083), *Pseudomonas fluorescens* CCTB03 (=CNPSo 2719) e *Pantoea ananatis* AMG 521 (=CNPSo 2798), mais o tratamento controle (sem bactéria), associadas a três doses de N-fertilizante (0, 50 e 100 kg N ha⁻¹).

As estirpes estão depositadas na “Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja: Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas” (World Federation Culture Collection-WFCC#1213, World Data Centre for Microorganisms-WDCM#1054). As bactérias são derivadas de programas de seleção de BPCP da Embrapa Soja: *Azospirillum brasilense* Ab-V5, selecionada no Brasil, inicialmente para as culturas de milho (*Zea mays*) e trigo (*Triticum aestivum*) (Hungria et al., 2010); *Pseudomonas fluorescens* CCTB03 da empresa Total Biotecnologia e *Pantoea ananatis* AMG 521, isolada na Espanha (Megías et al., 2016).

Para o preparo dos inoculantes, as estirpes foram cultivadas em meio DYGS (Fukami et al., 2018) e a concentração foi ajustada para 10⁸ células mL⁻¹, obtida a partir da correlação das curvas de crescimento previamente obtidas pela Coleção de Cultura para cada estirpe e as correspondentes densidades óticas. Para a inoculação, 15 mL de cada inóculo foram usados por kg de semente antes da semeadura. As sementes foram secas por aproximadamente 30 minutos em local fresco e protegido do sol, e

posteriormente semeadas em quantidade equivalente a 10 kg ha⁻¹ (valor cultura da semente não tratada de 50%).

Uma semana antes da semeadura, foi realizada a fertilização com aplicação de 84 kg P₂O₅ ha⁻¹ (superfosfato simples 18% P₂O₅), 42,5 kg K₂O ha⁻¹ (cloreto de potássio 60% de K₂O). Posterior à emergência das plântulas, foi aplicado em todas as parcelas experimentais o equivalente à dose basal de 20 kg N ha⁻¹ (ureia 45 % de N). A incorporação do calcário e fertilizantes foram feitas mediante uso de gradagem leve.

Quando o capim Ruziziensis atingiu, em média, 35-40 cm de altura, foi realizado o corte de uniformização a 15 cm de altura de resíduo. As alturas eram mensuradas com o auxílio de régua milimetrada de um metro. Posteriormente, foi realizada a aplicação de N-fertilizante nas parcelas, de acordo com os tratamentos (0, 50 e 100 kg N ha⁻¹). A aplicação de 100 kg N ha⁻¹ foi parcelada em duas aplicações, com intervalo de 15 dias.

Durante o período experimental, foram monitoradas as condições climáticas, com registro de média de precipitação pluviométrica (119 mm), umidade relativa do ar (83 %) e médias de temperaturas máximas (27 °C) e mínimas (17 °C), conforme mostrado na Figura 1.

2.2 Mensuração dos parâmetros estudados

Os manejos dos cortes ocorreram com base na interceptação luminosa (IL) de 95%. A IL foi medida com equipamento AccuPAR (PAR/LAI ceptometer®) modelo LP-80 (Decagon Devices Inc, Pullman, Estados Unidos). O monitoramento da IL incidente sobre o dossel forrageiro foi feito através da leitura de 6 pontos aleatórios por parcela a cada sete dias.

Após a média da parcela atingir a IL pretendida, eram coletados aleatoriamente 10 perfilhos representativos da parcela. Estes eram pesados e secos em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas, e pesados novamente para determinação da massa seca. Em seguida, era feita aleatoriamente a colheita de duas amostras de massa de forragem, com corte a 15 cm de altura de resíduo, com auxílio de podador STIHL® modelo HS 82 R (STIHL, Rio Grande do Sul, Brasil), usando um quadrado de 0,5x0,5 m (0,25 m²). Após a obtenção da massa de forragem, fez-se o corte de uniformização à mesma altura de resíduo, em toda a parcela experimental.

Após a colheita, o material era identificado, pesado e eram feitas duas subamostras, sendo uma para a separação dos componentes morfológicos (lâmina foliar, colmo+bainha e material senescente), e a outra para a determinação da massa seca de forragem. As amostras eram acondicionadas em sacos de papel, pesadas e secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas, pesadas novamente para determinação da massa seca e, posteriormente, moídas em moinho estacionário "Thomas Wiley", adaptado com peneira de 2 mm.

A proteína bruta (PB, g kg⁻¹), fibra em detergente neutro (FDN g kg⁻¹) e fibra em detergente ácido (FDA g kg⁻¹), bem como a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS g kg⁻¹) foram quantificadas na lâmina foliar, por meio de espectrofotometria de refletância no infravermelho proximal [(Near Infrared Reflectance Spectroscopy – NIRS), (Foss NIRSystems, XDS Rapid Content Analyzer, Dinamarca).

Para as leituras no NIRS foi construída uma curva de calibração a partir dos dados analíticos laboratoriais de 110 amostras, as quais foram analisadas para N usando o método micro-Kjeldahl (Tecator, Suécia) e convertidas para proteína usando o fator 6,25, segundo a metodologia descrita pela AOAC (1990). A FDN e FDA foram determinadas segundo Van Soest et al. (1991), a LIG segundo Goering e Van Soest (1970) e a DIVMS obtida segundo as técnicas (metodologia tradicional) descritas por Tilley e Terry (1963), e Holden (1999), com o uso de rúmen artificial DAISYII (ANKOM™ Technology Corp., Fairport, NY).

Para elaboração da curva de calibração os espectros das amostras foram escaneados pelo software ISIScan e exportados para o software WinISI III Project Manager 1.50e (Infrasoft International, LLC, 2000, Port Matilda, PA, EUA). Os dados de reflectância foram estocados com log 1/R em intervalos de 2 nm entre 700 e 2500 nm.

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada antes de as curvas de calibração serem elaboradas, usando o modelo de regressão dos quadrados mínimos parciais (PLS). Realizou-se a validação cruzada pelo software confrontando os dados de análise laboratorial e estimados pela curva de calibração do NIRS. Após a eliminação dos *outliers*, foram utilizadas 77 amostras para PB, 79 para FDN, 79 para FDA e 71 para DIVMS. Para PB, FDN, FDA e DIVMS, respectivamente, foram obtidos os seguintes parâmetros de validação da curva: coeficiente de determinação

(R^2 ; 0,99; 0,92; 0,94 e 0,86), erro de validação cruzada (SECV; 0,48; 1,43; 0,66 e 4,62%), R^2 corrigido pelo erro de validação cruzada (1-VR; 0,99; 0,88; 0,91 e 0,76), erro de predição (SEP; 0,34; 1,03; 0,50 e 3,28) e média \pm desvio padrão ($X \pm SD$; 12,65 \pm 3,33; 51,39 \pm 3,73, 24,72 \pm 2,12 e 68,54 \pm 8,68).

A densidade populacional de perfilhos (DPP, perfilhos.m²) foi estimada a cada 28 dias, através da contagem manual de perfilho nas parcelas, de todos os perfilhos vivos observados dentro da armação metálica de 0,5x0,15 m (0,075 m²), de acordo com a metodologia proposta por Sbrissia e Silva (2008). Foram demarcados dois pontos representativos dentro de cada parcela com um cano, e as medidas eram feitas posicionando o retângulo no ponto demarcado.

A taxa de acúmulo diário de massa de forragem (AMFd, kg de MS ha⁻¹ dia) foi obtida pela divisão da forragem acumulada pelo número de dias referente ao intervalo das colheitas. A taxa de acúmulo anual de massa de forragem (AMFa, kg de MS ha⁻¹ ano) foi calculada por meio do somatório de todas as colheitas parciais do período experimental (Barbosa et al., 2007).

A massa seca de raiz (MR, kg ha⁻¹) foi determinada ao final de cada estação do ano (outono, inverno, primavera e verão), a partir da coleta de duas amostras de solo com raízes na profundidade de 0 a 20 cm em cada parcela experimental, com auxílio de uma sonda de aço (10 cm de diâmetro e 50 cm de comprimento), e abertura no meio para facilitar a estratificação da amostra. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos previamente identificados, lavadas em água corrente para a retirada total do solo (Soares Filho et al., 2013), pesadas e secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas.

Para a geometria das raízes, retirou-se 1 g de raízes das amostras após secagem para determinação do diâmetro radicular (DiR, mm), área radicular (AR, mm².dm³), comprimento radicular (CR, mm) e densidade radicular (DeR, mm.cm³), e por meio de digitalização das raízes em Scanner HP 3400, e as leituras das imagens utilizando o software DELTA T SCAN[®].

2.3 Análise Estatística

Utilizou-se o PROC GLIMMIX do SAS University (Sas Institute Inc. Cary, CA) em todas as análises estatísticas. As variáveis em estudo foram inicialmente testadas quando à

normalidade (Shapiro–Wilk teste). Os dados foram analisados em esquema fatorial de quatro tratamento, o controle - não inoculado, *Azospirillum brasilense* Ab-V5, *Pseudomonas fluorescens* CCTB03 e *Pantoea ananatis* AMG 521) x três doses de N-fertilizante, zero, 50 e 100 kg N/ha. Considerou-se ainda os dados de cada estação como medidas repetidas no tempo, e os efeitos aleatórios de bloco e de ano na análise. A escolha da matriz de covariância foi feita utilizando o Critério de Informações de Akaike (Wolfinger, 1993). As médias foram estimadas, utilizando-se o “LSMEANS”, e a comparação entre elas realizada por meio da probabilidade da diferença (PDIF), usando o teste de Tukey a 5% de significância.

3 RESULTADOS

Em todo o experimento foram realizadas nove colheitas de forragem nas parcelas, distribuídas da seguinte forma: duas no verão de 2016/2017, uma no outono de 2017, uma no inverno de 2017, uma na primavera de 2017, duas no verão de 2017/2018, uma no outono de 2018 e uma no inverno de 2018.

Não houve interação entre bactérias × estações, doses de N-fertilizante × estações e bactérias x doses de N-fertilizante para lâmina foliar (LF, kg de MS ha⁻¹), colmo+bainha (CB, kg de MS ha⁻¹), produção de massa de forragem (MF, kg de MS ha⁻¹), acúmulo diário de massa de forragem (AMFd, kg de MS ha⁻¹ dia⁻¹) e acúmulo anual de massa de forragem (AMFa, kg de MS ha⁻¹ ano⁻¹). Entretanto, houve efeito isolado de bactérias e doses de N-fertilizante para estas variáveis (Figura 2).

A estirpe CCTB03 proporcionou maior produção de LF ($p = 0,0061$), 2068 kg de MS ha⁻¹, enquanto que as demais estirpes, Ab-V5 e AMG 52, mais o tratamento controle, apresentaram LF semelhantes, com produção média de 1885 kg de MS ha⁻¹ (Figura 2A). Os incrementos na produção de LF foram da ordem de 6 a 15% com a inoculação, com destaque para a estirpe CCTB03, com incremento de 276 kg de MS ha⁻¹, sendo 15% maior que a produção observada no tratamento controle. Para uso de N-fertilizante, houve maior produção de LF ($p = 0,0082$) nas doses de 50 e 100 kg de N ha⁻¹, 1983 e 2001 kg de MS ha⁻¹, respectivamente (Figura 2B).

As estirpes CCTB03 e AMG 521 proporcionaram maior massa de CB ($p = 0,0049$), 1450 e 1413 kg de MS ha⁻¹, respectivamente, enquanto a estirpe Ab-V5 mais o tratamento

controle apresentaram CB semelhantes, com massa média de 1258 kg de MS ha⁻¹ (Figura 2A). A variação na produção de massa de CB estimulada pelas bactérias foi de 2 a 17%. Para uso de N-fertilizante, houve maior massa de CB ($p = 0,0003$) nas doses de 50 e 100 kg de N ha⁻¹, 1412 e 1416 kg de MS ha⁻¹, respectivamente (Figura 2B).

Para a MF ($p = 0,0144$), foi observado maior incremento com a inoculação da estirpe CCTB03, 4415 kg de MS ha⁻¹, enquanto que as demais estirpes, Ab-V5 e AMG 521, mais o tratamento controle, apresentaram MF semelhantes, com produção média de 3982 kg de MS ha⁻¹ (Figura 2A). Os incrementos na produção de MF foram da ordem de 5 a 16% com a inoculação, com destaque para a estirpe CCTB03, com incremento de 609 kg de MS ha⁻¹, o que corresponde a um incremento de 16% a mais para a MF. Para uso de N-fertilizante, houve maior produção de MF ($p = 0,0026$) nas doses de 50 e 100 kg de N ha⁻¹, 4277 e 4327 kg de MS ha⁻¹, respectivamente (Figura 2B).

As estirpes CCTB03 e AMG 521 proporcionaram maior AMFd ($p = 0,0031$), 79,74 e 74,46 kg de MS ha⁻¹ dia⁻¹, respectivamente, enquanto a estirpe Ab-V5 mais o tratamento controle apresentaram AMFd semelhantes, com produção média de 69 kg de MS ha⁻¹ dia⁻¹ (Figura 2C). Os incrementos na produção de AMFd foram da ordem de 15 e 8% com a inoculação das estirpes CCTB03 e AMG 521. Para uso de N-fertilizante, houve maior AMFd ($p = 0,0189$) nas doses de 50 e 100 kg de N ha⁻¹, 75,15 e 78,34 kg de MS ha⁻¹ dia⁻¹, respectivamente (Figura 2D).

A estirpe CCTB03 proporcionou o maior AMFa ($p = 0,0286$), 25232 kg de MS ha⁻¹ ano⁻¹, enquanto as demais estirpes, Ab-V5 e AMG 521, mais o tratamento controle, apresentaram AMFa semelhantes, com produção média de 23123 kg de MS ha⁻¹ ano⁻¹ (Figura 2C). Os incrementos na produção de AMFd com as inoculações foram da ordem de 6 e 15%, com destaque para a estirpe CCTB03, com incremento de 3218 kg de MS ha⁻¹ ano⁻¹. Com relação ao uso de N-fertilizante, houve maior AMFa ($p = 0,0219$) nas doses de 50 e 100 kg de N ha⁻¹, 25269 e 25845 kg de MS ha⁻¹ ano⁻¹, respectivamente (Figura 2D).

Não houve interação entre bactérias × estações, doses de N-fertilizante × estações, e bactérias x doses de N-fertilizante para densidade populacional de perfilhos (DPP; perfilhos.m²) e peso de perfilho (PP, g). Não foi observado efeito da inoculação de BPCP e de doses de N-fertilizante sobre os resultados de DPP e PP, ambos apresentando uma média de 1031 perfilhos.m² e 1,17 g (Tabela 1).

Não houve interação entre bactérias × estações, doses de N-fertilizante × estações, e bactérias x doses de N-fertilizante para proteína bruta (PB; g kg⁻¹), fibra em detergente neutro (FDN; g kg⁻¹), fibra em detergente ácido (FDA; g kg⁻¹) e digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS; g kg⁻¹). Não foi observado efeito da inoculação de BPCP e de doses de N-fertilizante sobre os resultados de PB, FDN, FDA e DIVMS, tendo estes apresentado uma média de 77, 600, 293 e 714 g kg⁻¹, respectivamente (Tabela 2).

Não houve interação entre bactérias × estações, doses de N-fertilizante × estações, e bactérias x doses de N-fertilizante para massa de raiz (MR; ton ha⁻¹), área radicular (AR; mm².dm³), diâmetro radicular (DiR; mm) e densidade radicular (DeR; mm).

Não foi observado efeito da inoculação de BPCP sobre os resultados de MR, AR, DiR e DeR, apresentando uma média de 10417 kg ha⁻¹, 138 mm².dm³, 0,27 mm e 0,67 mm, respectivamente (Tabela 3). Para MR e DiR, não foi observado efeito das doses de N-fertilizante, apresentando média de 10417 ton ha⁻¹ e 0,26 mm. Porém, o uso de doses de N-fertilizante proporcionou maior AR ($p = 0,0068$) nas doses de 50 e 100 kg de N ha⁻¹, 147 e 148 mm².dm³, respectivamente, e maior DeR ($p = 0,0143$) na dose de 100 kg de N ha⁻¹, 0,72 mm (Tabela 3).

A interação entre BPCP e doses de N-fertilizante para comprimento radicular (CR; $p = 0,0070$) está apresentada na Tabela 4. Os resultados mostraram que, para o grupo de tratamento com a inoculação e sem doses de N-fertilizantes, o maior valor de AR foi proporcionado com a estirpe CCTB03, 584 mm.dm³. Na dose de 50 kg de N ha⁻¹, os resultados foram semelhantes entre as inoculações e o tratamento controle, com média de 498 mm.dm³. Na dose de 100 kg de N ha⁻¹, o maior valor de AR foi proporcionado com a estirpe AMG 521, 660 mm.dm³.

4 DISCUSSÃO

A associação entre bactérias promotoras do crescimento de plantas e gramíneas tropicais ocorre de forma natural no ambiente da rizosfera, uma vez que ambas se beneficiam dos produtos sintetizados e disponibilizados no ambiente a partir de suas atividades metabólicas. Por essa razão, acredita-se no potencial da interação BPCP-gramínea como alternativa sustentável ao modelo convencional de produção animal a pasto.

As BPCP, a partir da interação com as plantas, promove a fixação biológica de nitrogênio (Hungria, et al. 2016), usando o complexo enzimático da nitrogenase como

substâncias promotoras do crescimento, além de possibilitar a inibição de patógenos (Glick, 2012), a produção de sideróforos, solubilização de fosfato, produção de auxinas como ácido indol-acético (AIA), 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase (Ahemad e Kibret, 2014).

Os resultados deste estudo, com relação ao incremento na produção de massa de forragem (Figura 2), vêm como confirmação das informações já descritas na literatura no que tange aos efeitos positivos das BPCP em algumas espécies de gramíneas forrageiras. É a partir desses efeitos atribuídos a alguns fatores, como a capacidade dessas bactérias de sintetizar hormônios promotores do crescimento e de FBN, que se tem comprovado a possibilidade de substituição total ou parcial do uso de N-fertilizantes para a formação e manutenção das pastagens, conforme observado por Baldani e Baldani (2005), Bergamaschi et al. (2007), Hungria et al. (2010), Mus et al. (2016) e Gouda (2018).

A contribuição da FBN em gramíneas é de 25 a 50 kg N ha⁻¹ ano, o que corresponde a cerca de 17% das demandas das culturas (Moreira et al., 2010), acarretando em redução nos custos de produção.

Neste estudo, foi possível verificar incrementos na produção de massa de forragem de até 16% com a inoculação das BPCP. Esses resultados seguem os mesmos padrões de aumento na produção verificados em outros estudos, a exemplo do incremento médio de 26% na produtividade do milho (*Zea mays L.*) e 31% na produtividade do trigo (*Triticuma estivum L.*) (Hungria, 2011), 7 a 15% na produtividade do milho (Lana et al., 2012), 22% na produção de biomassa de *U. brizantha* cv. Marandu e *U. ruziziensis* (Hungria et al., 2016) e 25% na massa de forragem da *U. ruziziensis* (Duarte et al., 2020).

Apesar de a bactéria *A. brasilense* não ter se destacado neste estudo, existem relatos que demonstram as suas contribuições positivas na produção de forragem, como observado nos resultados apresentados por Hungria et al. (2016), em que, a partir da associação a 40 kg de N ha⁻¹, foi verificado incremento no acúmulo de massa de forragem de cerca de 17%, evidenciando que há um sinergismo dessa prática em baixas doses de N-fertilizantes. Em *U. brizantha* cv. Marandu, houve um aumento no acúmulo de forragem de 11% (Leite et al., 2019).

A estirpe CCTB03, pertencente à espécie *P. fluorescens*, foi a que mais se destacou na maioria dos parâmetros produtivos aqui analisados. Nossos resultados estão de acordo com os apresentados por Lopes et al. (2018), em que a inoculação em *U. brizantha* cv.

BRS Piatã contribuiu para o aumento na produção de massa de forragem, e com os resultados demonstrados por Duarte et al. (2020b), com *U. brizantha* cv. Marandu e *U. brizantha* cv. Paiaguás, em que foram observadas melhores taxas de alongamento de folhas, colmos e número de perfilhos basais.

Os resultados obtidos a partir da inoculação de *P. fluorescens* deveu-se, possivelmente, à capacidade que essa estirpe demonstra de colonizar diferentes ambientes rizosféricos, a hábitos nutricionais e à diversidade de metabólitos produzidos, sendo, portanto, considerada uma das BPCP mais relevantes para a agricultura em razão da eficiência em promover o desenvolvimento e a produtividade de plantas (Sottero, 2003; Naik et al. 2008).

A *Pantoea* sp. também é uma das BPCP que tem sido testadas em gramíneas devido à sua capacidade de colonização de vários nichos e hospedeiros ecológicos (Weller-Stuart et al., 2017), e pelo fato de promover o crescimento das plantas e maximizar a produtividade das culturas agrícolas (Kim et al., 2012; De Maayer et al., 2014). Resultados de estudos demonstram que a inoculação de *Pantoea ananatis* AMG 501 promoveu aumentos da ordem de 10 a 60% em plantas forrageiras como a alfafa (*Medicago sativa*) e *U. brizantha* (Megías et al., 2017).

Em nosso estudo, também foi possível verificar o efeito isolado de N-fertilizante sobre os parâmetros analisados. Os resultados aqui observados para a produção de massa de forragem (Figura 2) estão de acordo com aqueles apresentados na literatura para gramíneas do gênero *Urochloa*, em que o N, dentre os nutrientes essenciais, é o que mais produz incrementos de massa seca (Santos, 2004; Silva et al., 2013; Germano et al., 2018).

O uso de N-fertilizantes impacta diretamente na produção de folhas e perfilhos, o que se refletirá na massa de forragem e determinará a capacidade de suporte das pastagens (Cruz et al., 2000; Cecato et al., 2011), além de ser uma prática que também visa aumentar a perenidade dos pastos, refletindo no aumento dos indicadores da produção animal a pasto (Martha Júnior et al., 2004; Martha Júnior et al., 2007; Cecato et al. 2011).

A associação entre BPCP e doses de N-fertilizantes na cultura do milho proporcionou respostas positivas na produção de biomassa seca da parte aérea (Lana et al., 2012) e no capim Coastcross-1 (*C. dactylon* (L.) Pers), com melhor estabelecimento e produção de forragem (Aguirre et al., 2018). Porém, como constatado por Lopes et al.

(2018), a depender da espécie de bactéria associada ao N-fertilizante, pode haver a supressão dos efeitos benéficos da mesma. Estudos desenvolvidos por Zhu et al. (2016) demonstraram que altas doses de N podem afetar a atividade das comunidades microbianas da rizosfera e diminuir a sua eficiência de utilização do nitrogênio.

A ausência de efeitos das BPCP observados nos valores nutritivos do capim Paiaguás (Tabela 2) pode ser atribuída à combinação inadequada de estirpe-gramínea, pois, nem toda bactéria é responsiva a toda espécie de gramínea (Mamédio et al., 2020).

A ausência de efeito neste estudo sobre alguns parâmetros radiculares (Tabela 3) também foi observada em outros estudos. Em capim Mombaça (*M. maximus*) não houve diferença na produção de raízes (Beloni, 2012), e em capim Tanzânia (*M. maximum*) também foi observado o mesmo comportamento (Soares filho et al., 2013). Contudo, alguns estudos apresentam respostas positivas da aplicação de N-fertilizante, com aumento da produção de massa de raízes (Manarin, 2000; Silveira, 2005; Artur, 2010; Bonfim-Silva e Monteiro, 2010).

A interação entre BPCP e doses de N-fertilizante para comprimento radicular (Tabela 4) pode estar relacionada à ação dos fito-hormônios, como as auxinas, na morfologia radicular (Dobbelaere et al., 1999), podendo favorecer a absorção de nutrientes através da melhor exploração do perfil do solo pelas raízes (Walker et al., 2003; Sureshbabu et al., 2016; Verbon e Liberman, 2016), além de melhorar a absorvidade e prevenir a compactação do solo nas diferentes camadas do perfil do solo (Cecato et al., 2006).

5 CONCLUSÕES

O uso de inoculantes de *Pseudomonas fluorescens* CCTB03 para a produção de *Urochloa brizantha* cv. BRS Paiaguás, é uma prática viável e sustentável para a modernização da pastagem, uma vez que contribui para a sua manutenção e proporciona incrementos na produção de lâmina foliar, refletindo em maior acúmulo de massa de forragem disponível para o uso animal. As bactérias promotoras do crescimento de plantas não foram eficientes em promover melhoria no valor nutritivo e na morfologia de raiz desta gramínea. Porém, o uso de inoculantes em pastagens de gramíneas tropicais é uma tecnologia que demonstra potencial competitivo frente ao uso de N-fertilizantes.

O uso de doses de N-fertilizante, 50 e 100 kg de N ha⁻¹, promoveu maiores incrementos na produção de massa de forragem.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Grupo de pesquisa apoiado pelo INCT-Microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas Visando à Sustentabilidade Agrícola e à Responsabilidade ambiental – MPCPAgro - (CNPq 465133/2014-4, Fundação Araucária-STI, CAPES). M. Hungria é também bolsista de pesquisa do CNPq. Grupo de Estudo em Forragicultura Cecato (GEFORCE); Fundação Agrisus PA1732/16, CNPq e CAPES. U. Cecato também é bolsista de pesquisa do CNPq (CNPq-307838/2014-5).

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não conflito de interesse neste estudo

ORCID

Artur Roque Domingues Barreiros <https://orcid.org/0000-0002-3477-8203>

REFERÊNCIAS

- ABIEC - Beef Exporters' Association. Beef report: Brazilian livestock profile. (2020). Disponível em: file:///C:/Users/Divaney/Downloads/SUM%C3%81RIO-BEEF-REPORT-2020_INGL%C3%8AS_NET-1-1.pdf (acessado em 24 junho de 2020).
- Aguirre, P. F., Olivo, C. J., Rodrigues, P. F., Falk, D. R., Adams, C. B., & Schiafino, H. P. (2018). Forage yield of Coastcross-1 pastures inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 40, e36392. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v40i1.36392>
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science*, 26, 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Ahemad, M., Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science*, 26, 1-20.

- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 163, 173-181. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001>
- Andrade, R. A.; Porto, M. O.; Cavali, J.; Ferreira, E.; Bergamin, A. C.; Souza, F. R. D.; Aguiar, I. S. D. (2019). *Azospirillum brasilense* e fosfato natural reativo no estabelecimento de forrageira tropical. *Revista de Ciências Agrárias*, 42:141-150.
- AOAC. *Official Methods of Analysis Association of Official Analytical Chemists*. Washington, DC (1990). 771 p.
- Artur, A. G. (2010). *Adubações com nitrogênio e enxofre: frações no solo, características estruturais, nutricionais, produtivas e uso da água pelo capim-marandu*. 2010. Tese de Doutorado. USP: Universidade de São Paulo.
- Balsalobre, M. A. A., Santos, P. M., & de Barros, A. L. M. (2002). Inovações tecnológicas, investimentos financeiros e gestão de sistema de produção animal em pastagens. In Simpósio sobre manejo da pastagem, Piracicaba, São Paulo, Brasil, 19. <file:///C:/Users/Divaney/Downloads/Binder1.pdf>
- Bonfim-Silva, E. M., & Monteiro, F. A. (2010). Nitrogênio e enxofre na adubação e em folhas diagnósticas e raízes do capim braquiária em degradação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 1641-1649. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000800004>
- Brennecke, K.; Bertipaglia, L. M. A.; Antoniazzi, A.; Souza, E. F. (2016). Inoculação da bactéria *Pseudomonas fluorescens* no índice de crescimento da *Brachiaria decumbens* spp. *Revista Acadêmica: Ciência Animal*, 14:217-224.
- Cecato, U., Galbeiro, S., Paris, W., Soares Filho, C. V., Teixeira, S. (2011). Uso de nitrogênio em pastagens. In U. Cecato, M. A. A. F. Barbosa, S. Galbeiro, W. Paris, F. C. A. R. Grecco, C. S. Viegas, S. Teixeira (Eds.), *Simpósio de Produção Animal a Pasto*, (pp. 117-162). Maringá: Sthampa.
- Cruz, P., Boval, M. (2000). Effect of nitrogen on some morphogenetic traits of temperate and tropical perennial forage grasses. In G. Lemaire, J. Hodgson, A. de Moraes, C. Nabinger and P.C. de F. Carvalho (Eds.), *Grassland Ecophysiology and Grazing Ecology*, (pp. 151-168). University Press, Cambridge: CABI Publishing.
- De Maayer, P., Chan, W. Y., Rubagotti, E., Venter, S. N., Toth, I. K., Birch, P. R., Coutinho, T. A. (2014). Analysis of the *Pantoea ananatis* pan-genome reveals factors

- underlying its ability to colonize and interact with plant, insect and vertebrate hosts. *BMC genomics*, 15, 404.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Broek, A. V., & Vanderleyden, J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and soil*, 212, 153-162. <https://doi.org/10.1023/A:1004658000815>
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., & Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical reviews in plant sciences*, 22, 107-149. <https://doi.org/10.1080/713610853>
- Duarte, C. F. D., Cecato, U., Hungria, M., Fernandes, H. J., Biserra, T. T., Mamédio, D., Galbeiro, S., & Nogueira, M. A. (2020). Inoculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal em *Urochloa Ruziziensis*. *Research, Society and Development*, 9, eXX. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i8.XX>
- Duarte, C. F. D., Cecato, U., Hungria, M., Fernandes, H. J., Biserra, T. T., Mamédio, D., Galbeiro, S., & Nogueira, M. A. (2020a). Inoculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal em *Urochloa Ruziziensis*. *Research, Society and Development*, 9, eXX. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i8.XX>
- Duarte, C. F. D., Cecato, U., Hungria, M., Fernandes, H. J., Biserra, T. T., Galbeiro, S., Toniato, A.K.B., & da Silva, D. R. (2020b). Morphogenetic and structural characteristics of *Urochloa* species under inoculation with plant-growth-promoting bacteria and nitrogen fertilisation. *Crop and Pasture Science*, 71, 82-89. <https://doi.org/10.1071/CP18455>
- Fukami, J., Cerezini, P., & Hungria, M. (2018). *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*, 8, 73. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>
- Fukami, J., Ollero, F. J., Megías, M., Hungria, M. (2017). Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express*, 7, 153. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0453-7>
- Germano, L. H. E., Vendruscolo, M. C., Daniel, D. F., & Dalbianco, A. B. (2018). Produtividade e características agronômicas de *Brachiaria brizantha* cv. Paiaguás

- submetida a doses de nitrogênio sob cortes. *Boletim De Indústria Animal*, 75, 1-14.
<https://doi.org/10.17523/bia.2018.v75.e1419>
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 1-15.
- Goering, H. K., & Van Soest, P. J. (1970). *Forage fiber analyses: apparatus, reagents, procedures, and some applications (No. 379)*. Disponível em https://books.google.com.br/books?id=yn8wAAAAYAAJ&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K., & Singh, V. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 7, 096-102. DOI: 10.4172/1948-5948.1000188
- Holden, L. A. (1999). Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *Journal of dairy science*, 82, 1791-1794. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75409-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75409-3)
- Hungria, M. (2011). *Inoculação com Azospirillum brasilense: inovação em rendimento a baixo custo*. Londrina: Embrapa Soja.
- Hungria, M., Duarte, C. F. D., Mamédio, D., Sanches, R., Cecato, U., Biserra, T. T. (2019). Bactérias promotoras de crescimento de plantas em sistemas agropecuários. In Cecato, U., Mamédio, D., Sanches, R., Rodrigues, V. O., Galbeiro, S. (Eds), *V Simpósio de Produção Animal a Pasto*, (pp. 181-212). Maringá: Nova Sthampa.
- Hungria, M., Nogueira, M. A., & Araujo, R. S. (2016). 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*, 221, 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.01.024>
- Hungria, M., Nogueira, M. A., Araujo, R. S. (2016). 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*, 221, 125-131.

- Hungria, M.; Campo, R. J.; Souza, E. M.; Pedrosa, F. O. (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, 331:413-425.
- Jeon, J. S., Lee, S. S., Kim, H. Y., Ahn, T. S., & Song, H. G. (2003). Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. *The Journal of Microbiology*, 41, 271-276.
- Kim, H. J., Lee, J. H., Kang, B. R., Rong, X., Gardener, B. B. M., Ji, H. J., Park, C.S., Kim, Y. C. (2012). Draft genome sequence of *Pantoea ananatis* B1-9, a nonpathogenic plant growth-promoting bacterium. *Journal of Bacteriology*, 194, 729-729.
- Lana, M. D. C., Dartora, J., Marini, D., & Hann, J. E. (2012). Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. *Revista Ceres*, 59, 399-405. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2012000300016>
- Lana, M. D. C., Dartora, J., Marini, D., & Hann, J. E. (2012). Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. *Revista Ceres*, 59, 399-405. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2012000300016>
- Leite, R. D. C., dos Santos, J. G., Silva, E. L., Alves, C. R., Hungria, M., Leite, R. D. C., & dos Santos, A. C. (2019). Productivity increase, reduction of nitrogen fertiliser use and drought-stress mitigation by inoculation of Marandu grass (*Urochloa brizantha*) with *Azospirillum brasilense*. *Crop and Pasture Science*, 70, 61-67. <https://doi.org/10.1071/CP18105>
- Leite, R. D. C.; Santos, J. G.; Silva, E. L.; Alves, C. R.; Hungria, M.; Leite, R. D. C.; Santos, C. (2018). Productivity increase, reduction of nitrogen fertiliser use and drought-stress mitigation by inoculation of Marandu grass (*Urochloa brizantha*) with *Azospirillum brasilense*. *Crop and Pasture Science*.
- Lemaire, G., Chapman, D. (1996). Tissue flows in grazed plant communities. In J. Hodgson, A.W. Illius, (Eds.), *The ecology and management of grazing systems*, (pp. 3-36). Guildford: CAB International.
- Lopes, M. J. S., Dias Filho, M. B., dos Reis Castro, T. H., de Filippi, M. C. C., & da Silva, G. B. (2018). Effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Burkholderia pyrrocinia* on the Growth Improvement and Physiological Responses in *Brachiaria brizantha*. *American Journal of Plant Sciences*, 9, 250-265. doi: 10.4236/ajps.2018.92021

- Luz, M. V. C., Pinheiro, D. F., Santos, G. O.; Souza, J. V. M., Santim. G. Q., Trevisan, Y. F. *Massa de forragem e componentes morfológicos do capim Massai inoculado com bactérias promotoras de crescimento no período de estabelecimento*. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia, 29, Uberaba. Uberaba, MG: SBZ, 2019.
- Macedo, M. C. M., Kichel, A. N., Zimmer, A. H. (2000). *Degradação e alternativas de recuperação e renovação de pastagens*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte.
- Malavolta, E. (2006). *Manual de nutrição mineral de plantas*. Agronômica Ceres.
- Mamédio, D., Cecato, U., Sanches, R., Silva, S. M. S., Silva, D. R., Rodrigues, V. O., Galbeiro, S., Barreiros, A. R. D., & Vicente, J. V. R. (2020). Do plant-growth promoting bacteria contribute to greater persistence of tropical pastures in water deficit? - A Review. *Research, Society and Development* 9, eXX. doi: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i8.XX>
- Manarin B. B., Galvão, L. L., Ceneviva, G. P. W., Vagacs, B., Barbosa M. E. B., Silva, A.R. Avaliações no estabelecimento de *Panicum maximum* cv. Tamani inoculado com bactérias promotoras de crescimento. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia, 29., Uberaba. Resumos. Uberaba: SBC, 2019.
- Manarin, C. A. (2000). *Respostas fisiológicas, bioquímica e produtivas do capim-mombaça a doses de nitrogênio*. Tese de Doutorado. USP: Universidade de São Paulo.
- Martha Júnior, G. B., Vilela, L., Barioni, L. G., Sousa, D. D., Barcellos, A. D. O. (2004). *Manejo da adubação nitrogenada em pastagens*. In Simpósio sobre manejo da pastagem, Piracicaba, São Paulo, Brasil, 21.
- Martha Junior, G. B., Vilela, L., De Sousa, D. M. G. (2007). *Cerrado: uso eficiente de corretivos e fertilizantes em pastagens*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados.
- Megías E, Megías M, Ollero FJ, Hungria M (2016) Draft genome sequence of *Pantoea ananatis* strain AMG521, a rice plant growth-promoting bacterial endophyte isolated from the Guadalquivir marshes in southern Spain. *Genome Announcements* 4, e01681-15.
- Megías, E., Junior, F. B. R., Ribeiro, R. A., Ollero, F. J., Megías, M., & Hungria, M. (2017). Genome Sequence of *Pantoea ananatis* Strain AMG 501, a Plant Growth-Promoting Bacterium Isolated from Rice Leaves Grown in Paddies of Southern Spain. *Genome Announcements*, 5, e00848-17. doi: 10.1128/genomeA.00848-17

- Megías, E., Junior, F. B. R., Ribeiro, R. A., Ollero, F. J., Megías, M., & Hungria, M. (2017). Genome Sequence of *Pantoea ananatis* Strain AMG 501, a Plant Growth-Promoting Bacterium Isolated from Rice Leaves Grown in Paddies of Southern Spain. *Genome Announcements*, 5, e00848-17. doi: 10.1128/genomeA.00848-17
- Miransari, M., & Smith, D. L. (2014). Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, 99, 110-121. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.11.005>
- Monteiro, K. D. (2013). Desempenho agronômico e estrutura do dossel em pastagens de capim Marandu sob estratégias de manejo e aporte nitrogenado (Tese de Doutorado, Universidade Federal de Mato Grosso).
- Moreira, F. M. D. S., Da Silva, K., Nóbrega, R. S. A., & De Carvalho, F. (2010). Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, 1, 74-99.
- Naik, P. R., Raman, G., Narayanan, K. B., Sakthivel, N. (2008). Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BMC microbiology*, 8, 230.
- Nascente, A. S.; Filippi, M. C. C.; Lanna, A. C.; Souza, A. C. A.; Silva Lobo, V. L.; Silva, G. (2017). Biomass, gas exchange, and nutrient contents in upland rice plants affected by application forms of microorganism growth promoters. *Environmental Science and Pollution Research*, 24:2956-2965.
- Okon, Y., & Labandera-Gonzalez, C. A. (1994). Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, 26, 1591-1601. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90311-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90311-5)
- Rajkumar, M., & Freitas, H. (2008). Effects of inoculation of plant-growth promoting bacteria on Ni uptake by Indian mustard. *Bioresource Technology*, 99, 3491-3498. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.046>
- Reis, V. M., Pedraza, R. O., Teixeira, K. D. S. (2010). *O gênero Azospirillum: diversidade e relação filogenética das espécies*. Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia.
- Rosolem, C. A., Ritz, K., Cantarella, H., Galdos, M. V., Hawkesford, M. J., Whalley, W. R., & Mooney, S. J. (2017). Enhanced plant rooting and crop system management

- for improved N use efficiency. *Advances in agronomy*, 146, 205-239.
<https://doi.org/10.1016/bs.agron.2017.07.002>
- Santos, H. G., Jacomine, P. K. T., Dos Anjos, L. H. C., De Oliveira, V. A., Lumbrreras, J. F., Coelho, M. R., & Cunha, T. J. F. (2018). *Sistema brasileiro de classificação de solos*. Brasília, DF: Embrapa.
- Santos, P. (2004). *Aspectos fisiológicos e metabólicos da nutrição nitrogenada de plantas forrageiras*. In Simpósio sobre manejo de pastagem, Piracicaba, São Paulo, Brasil, 21. Disponível em <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/46899/1/digitalizar0013.pdf>
- Sbrissia, A. F., & Silva, S. C. D. (2008). Compensação tamanho/densidade populacional de perfilhos em pastos de capim-marandu. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37, 35-47. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008000100005>
- Silva, D. R. G., Costa, K. A. D. P., Faquin, V., Oliveira, I. P. D., & Bernardes, T. F. (2013). Doses e fontes de nitrogênio na recuperação das características estruturais e produtivas do capim-marandu. *Revista Ciência Agrônômica*, 44, 184-191. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902013000100023>
- Silveira, C. P. (2005). *Produção e nutrição mineral do capim-Tanzânia com variável disponibilidade de nitrogênio e cálcio*. Tese de Doutorado. USP: Universidade de São Paulo.
- Soares Filho, C. V., Cecato, U., Ribeiro, O. L., Cruz Roma, C. F. D., Jobim, C. C., Beloni, T., & Venturoli Perri, S. H. (2013). Root system and root and stem base organic reserves of pasture Tanzania grass fertilizer with nitrogen under grazing. *Semina: Ciências Agrárias*, 34, 2415-2426. doi: 10.5433/1679-0359.2013v34n5p2415
- Sottero, A. N. (2003). *Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias*. Dissertação de Mestrado. IAC: Instituto Agrônomo de Campinas.
- Souza, M. S., de Baura, V. A., Santos, S. A., Fernandes-Júnior, P. I., Junior, F. B. R., Marques, M. R., Paggi, G. M., & da Silva Brasil, M. (2017). *Azospirillum* spp. from native forage grasses in Brazilian Pantanal floodplain: biodiversity and plant growth promotion potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 81. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2251-4>
- Sureshbabu, K., Amaresan, N., & Kumar, K. (2016). Amazing multiple function properties of plant growth promoting rhizobacteria in the rhizosphere soil.

- International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5, 661-683.
<http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.502.074>
- Taiz, L., Zeiger, E. (2013). *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Artemed.
- Tilley, J. M. A., & Terry, R. A. (1963). A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass and forage science*, 18, 104-111.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583-3597. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2
- Vande Broek, A., & Vanderleyden, J. (1995). Genetics of the *Azospirillum*-plant root association. *Critical reviews in plant sciences*, 14, 445-466.
<https://doi.org/10.1080/07352689509701932>
- Verbon, E. H., & Liberman, L. M. (2016). Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends in plant science*, 21, 218-229.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.013>
- Walker, T. S., Bais, H. P., Grotewold, E., & Vivanco, J. M. (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant physiology*, 132, 44-51.
- Weller-Stuart, T., De Maayer, P., Coutinho, T. (2017). *Pantoea ananatis*: genomic insights into a versatile pathogen. *Molecular plant pathology*, 18, 1191-1198.
- Werner, J.C. Adubação de pastagens de *Brachiaria* spp. In: Anais do XI Simpósio Sobre Manejo de Pastagens, 1994, Piracicaba, FEALQ.
- Wolfinger, R. (1993). Covariance structure selection in general mixed models. *Communications in statistics-Simulation and computation*, 22, 1079-1106.
<https://doi.org/10.1080/03610919308813143>
- Zhu, S., Vivanco, J. M., & Manter, D. K. (2016). Nitrogen fertilizer rate affects root exudation, the rhizosphere microbiome and nitrogen-use-efficiency of maize. *Applied Soil Ecology*, 107, 324-333. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.07.009>

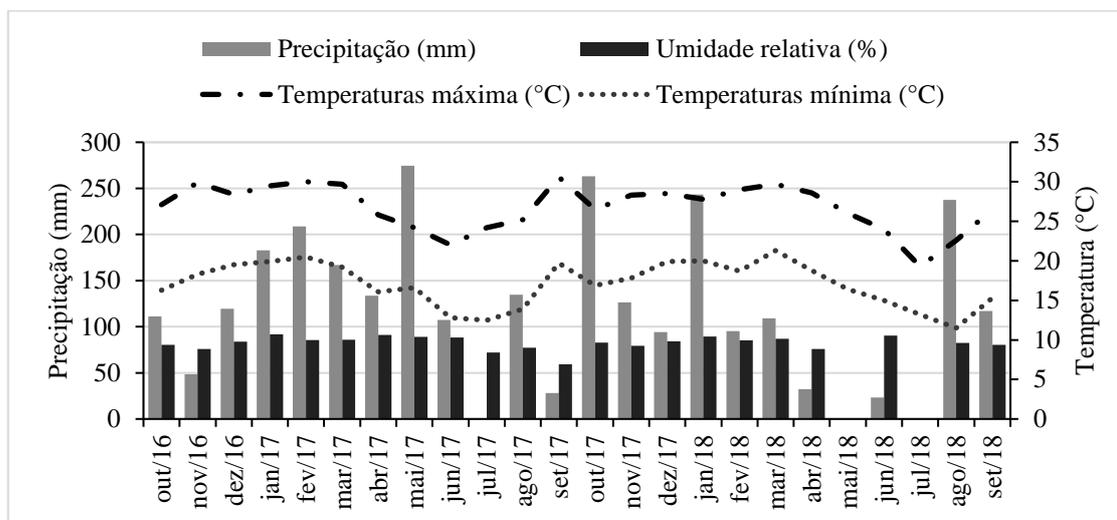


FIGURA 1 Condições climáticas (precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar e temperaturas máxima e mínimas) registradas na Estação Meteorológica Automática da FEI-UEM ao longo do período experimental (outubro a dezembro de 2017 e janeiro a setembro de 2018).

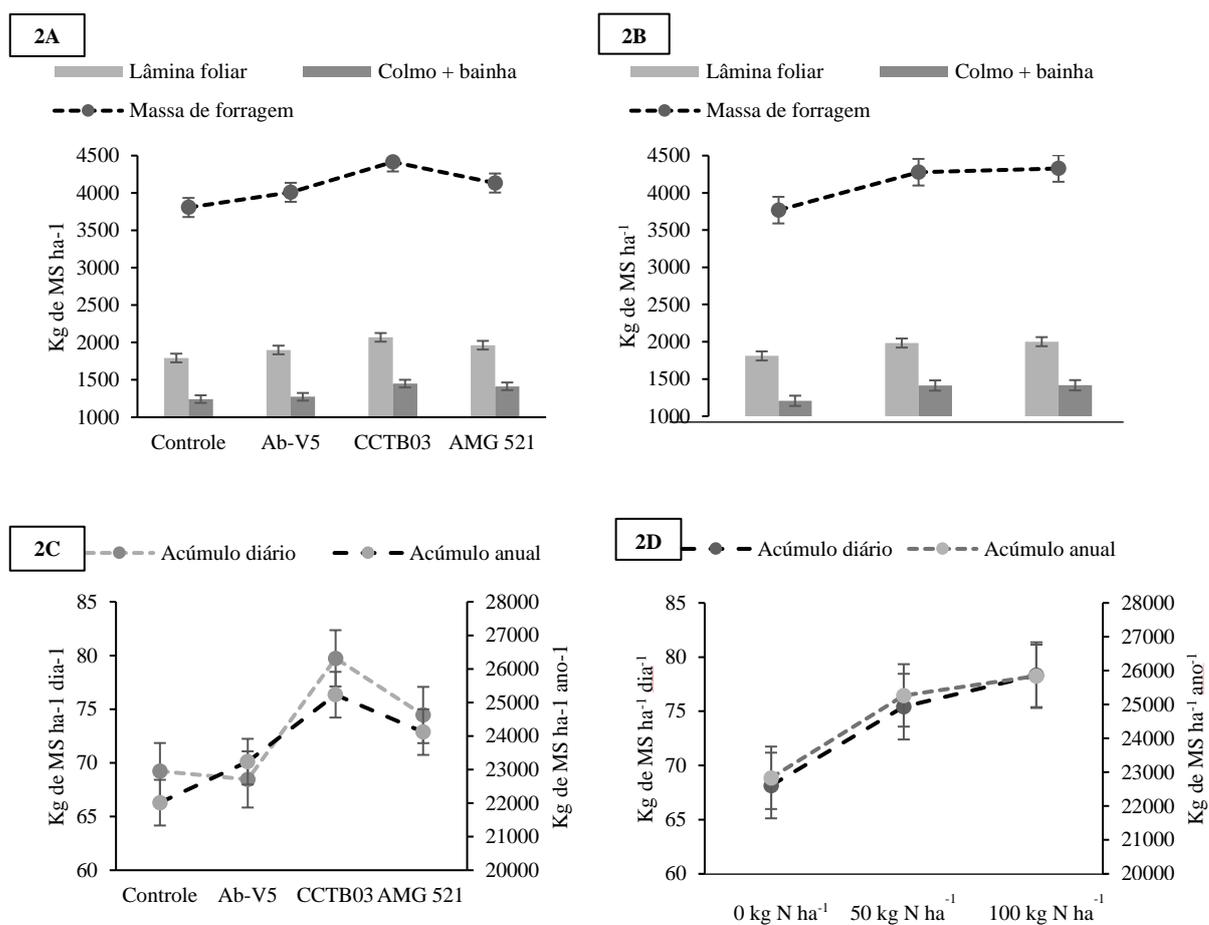


FIGURA 2 Lâmina foliar, colmo + bainha, produção de massa de forragem (2A e 2B), acúmulo diário e acúmulo anual de massa de forragem (2C e 2D) de *Brachiaria brizantha* cv. BRS Paiaguás inoculada com bactérias promotoras do crescimento de plantas e doses de N-fertilizante.

TABELA 1 Densidade populacional de perfilhos (DPP; perfilhos.m²) e peso de perfilho (PP; g) de *Brachiaria brizantha* cv. Paiaguás inoculada com bactéria promotora do crescimento de plantas e doses de N-fertilizante

Tratamentos	Bactéria Promotora do Crescimento de Plantas				EPM
	Controle	Ab-V5	CCTB03	AMG 521	
DPP (perfilhos.m ²)	1013	1016	1065	1030	22
PP (g)	1,15	1,11	1,21	1,21	0,03
Tratamentos	Doses de N-fertilizantes (kg de N ha ⁻¹)			EPM	
	Controle	50 N	100 N		
DPP (perfilhos.m ²)	994	1033	1067	22	
PP (g)	1,19	1,13	1,19	0,03	

Azospirillum brasilense Ab-V5; *Pseudomonas fluorescens* CCTB03; *Pantoea ananatis* AMG 521. Médias seguidas de letras iguais, nas linhas, não são diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). EPM = Erro padrão da média.

TABELA 2 Proteína bruta (PB; g kg⁻¹), fibra em detergente neutro (FDN; g kg⁻¹), fibra em detergente ácido (FDA; g kg⁻¹) e digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS; g kg⁻¹) de *Brachiaria brizantha* cv. Paiaguás inoculada com bactéria promotora do crescimento de plantas e doses de N-fertilizante

Tratamentos	Bactéria Promotora do Crescimento de Plantas				EPM
	Controle	Ab-V5	CCTB03	AMG 521	
PB (g kg ⁻¹)	74,60	74,80	78,40	78,50	1,30
FDN (g kg ⁻¹)	599,70	600,70	598,90	599,50	1,50
FDA (g kg ⁻¹)	294,80	292,90	292,60	292,80	1,00
DIVMS (g kg ⁻¹)	713,30	713,60	716,10	714,60	1,60
Tratamentos	Doses de N-fertilizantes (kg de N ha ⁻¹)			EPM	
	Controle	50 N	100 N		
PB (g kg ⁻¹)	74,70	77,40	77,60	1,10	
FDN (g kg ⁻¹)	600,10	601,00	597,90	1,30	
FDA (g kg ⁻¹)	291,90	294,40	292,00	0,80	
DIVMS (g kg ⁻¹)	712,40	715,30	715,60	1,60	

Azospirillum brasilense Ab-V5; *Pseudomonas fluorescens* CCTB03; *Pantoea ananatis* AMG 521. Médias seguidas de semelhantes letras minúsculas na coluna não são diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). EPM = Erro padrão da média.

TABELA 3 Massa de raiz (MR; ton ha⁻¹), área radicular (AR; mm².dm³), diâmetro radicular (DiR; mm) e densidade radicular (DeR; mm) de *Brachiaria brizantha* cv. Paiaguás inoculada com bactéria promotora do crescimento de plantas e doses de N-fertilizante

Tratamentos	Bactéria Promotora do Crescimento de Plantas				EPM
	Controle	Ab-V5	CCTB03	AMG 521	
MR (ton ha ⁻¹)	9.501	11.237	10.684	10.246	553,99
AR (mm ² .dm ³)	129,18	140,91	139,71	149,29	6,68
DiR (mm)	0,26	0,27	0,27	0,26	0,01
DeR (mm)	0,63	0,67	0,69	0,67	0,03
Tratamentos	Doses de N-fertilizantes (kg de N ha ⁻¹)			EPM	
	Controle	50 N	100 N		
MR (ton ha ⁻¹)	9558	10.684	11.010	553,99	
AR (mm ² .dm ³)	124,70b	146,81a	147,81a	5,78	
DiR (mm)	0,26	0,26	0,27	0,01	
DeR (mm)	0,63b	0,65ab	0,72a	0,03	

Azospirillum brasilense Ab-V5; *Pseudomonas fluorescens* CCTB03; *Pantoea ananatis* AMG 521. Médias seguidas de semelhantes letras minúsculas na coluna não são diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). EPM = Erro padrão da média.

TABELA 4 Efeito da interação entre bactéria x doses de N-fertilizante no comprimento radicular (CR; mm.dm³) de *Brachiaria brizantha* cv. Paiaguás

Tratamentos	Controle	Ab-V5	CCTB03	AMG 521	EPM
Controle	490,14 B	462,99 B	584,02 A	500,14 B	19,168
50 kg de N ha ⁻¹	525,95 A	492,45 A	511,05 A	462,18 A	19,168
100 kg de N ha ⁻¹	542,66 B	565,03 B	534,70 B	659,58 A	19,168

Azospirillum brasilense Ab-V5; *Pseudomonas fluorescens* CCTB03; *Pantoea ananatis* AMG 521. Médias seguidas de semelhantes letras minúsculas na coluna não são diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). EPM = Erro padrão da média.

CAPÍTULO IV

(Normas: Grass and Forage Science)

IV - PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA IN THE DEVELOPMENT OF *UROCHLOA RUZIZIENSIS*

Abstract

The aim of this study was evaluating the effect of the inoculation of plant growth promoting bacteria (PGPB) in forage mass, tillering, nutritious value and root system of *Urochloa ruziziensis* associated with doses of N-fertilizer. The bacteria inoculated were *Azospirillum brasilense* Ab-V5, *Pseudomonas fluorescens* CCTB03 and *Pantoea ananatis* AMG 521, plus the control treatment (non-inoculated), associated with doses of N-fertilizer (0, 50 and 100 kg N ha⁻¹). The experiment was performed in a randomized block design, in a 4x3 factorial scheme, with four replicates, totaling 48 plots (12 m²). There were no effects of the PGPB and the use of N-fertilizer on the leaf blade, stem+sheath, forage mass, daily and yearly accumulation of forage mass. The PGPB did not have influence on the density of tillers. The doses of 50 and 100 kg of N ha⁻¹ increased the amount of tillers. The AMG 521 strain associated with N-fertilizer provided heavier tillers. There was no effect of the PGPB on crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), as well as acid detergent fiber (ADF), and *in vitro* digestibility of the dry matter (IVDDM). The use of 100 kg of N ha⁻¹ contributed to an increase in CP and a decrease in NDF. The AMG 521 strain contributed to a smaller diameter of the root. Strains CCTB03 and AMG 521 demonstrated a smaller area, length and root density when associated with the dose of 50kg of N ha⁻¹. In general, the PGPB were not efficient in promoting productive increments in Ruziziensis grass.

KEYWORDS

growth promotion, plant biomass, plant growth hormones.

1 INTRODUCTION

Nitrogen (N) is one of the most required nutrients by plants (Dobbelaere and Okon, 2007). When it is applied, plants have positive responses in terms of production and nutritious value of forage mass (Palmer et al, 2014). However, its use in pasture management leads to an increase in production costs (Guimarães et al., 2011), besides damaging the environment due to the fact that, out of the total of N-fertilizer applied, plants' assimilation barely exceeds 50% (Freitas e Rodrigues, 2010). As for the rest, it ends up being wasted in the system (Van Groenigen et al., 2015).

For that reason, it is indispensable to use more efficient and sustainable agricultural technologies capable of reducing dependence on the use of N-fertilizer. An alternative to mitigate the negative impact of conventional practices for pasture fertilization is the use of plant growth promoting bacteria (PGPB) associated with grasses. PGPB have the ability of N₂ fixation (Sarathambal et al., 2015), and they can promote plants growth by synthesizing hormones, solubilizing phosphate and producing siderophores (Kavamura et al., 2013).

Studies with PGPB associated with tropical grasses started in the 50's, with the isolation and description of *Azospirillum* sp. in sugar cane rhizosphere, by Döbereiner and Ruschel (1958). Since then, other bacterial genera have been isolated and studied with the same potential of bringing benefits to tropical grasses.

Nowadays, it is possible to find studies that present the positive effects of inoculation in grasses, such as the increment of forage mass and the reduction in the need for the support of N-fertilizer in pastures of *Urochloa* sp. (Hungria et al., 2016; Leite et al., 2018; Lopes et al., 2018; Duarte et al., 2020) and *Cynodon* sp. (Aguirre et al., 2018).

Studies on the behavior of PGPB in association with N-fertilizer have been demonstrating that, for bacteria such as *A. brasilense*, the use of high doses of N-fertilizer reduces its effects on grasses productive parameters (Cassán e Diaz-Zorita, 2016), or completely inhibits the plant's response to the inoculation (Ozturk et al., 2003). Yet, in sites where N limits production, the effects of the inoculation are more evident, or when moderate doses of N-fertilizer are used in association with PGPB, we can see the complementary effect of such association with increments mainly in biomass production, as reported by Cassán and Diaz-Zorita (2016).

Nonetheless, since we are talking about studies whose some aspects must be elucidated, the results are still inconclusive, and more data are necessary to support the indication of inoculant tests as a commercial product for tropical pastures.

The development of alternative methods capable of modernizing and enabling pasture production systems, besides studying their effects at different stages of pasture growth, allows understanding the biological responses of forages when associated with PGPB, and serves as guidelines for scientists' decision-making, and further transference of such technology to producers (Mamédio et al., 2020).

In this context, this study aimed to evaluate the effect of the inoculation of PGPB on the production of forage mass, tillering, nutritious value and root system of *Urochloa ruziziensis* associated with doses of N-fertilizer.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Site and experimental design

The experiment was carried out on Iguatemi Experimental Farm, which belongs to the State University of Maringá (UEM), in Iguatemi, city of Maringá, state of Paraná – Brazil (23°25'S, 51°57'W; 550 m a.m.s.l.), from October 2016 to September 2018.

The soil of the experimental area is classified as Dystrophic Red Latosol (Santos et al., 2018). It was collected from the 0-0.2 m depth layer, and presented the following chemical characteristics: hydrogen potential (pH in H₂O) - 5,6; SMP index - =6,6; phosphorus (P-Mehlich) - 10,75 mg dm⁻³; potassium (K⁺) - 0,12 cmol_cdm⁻³; aluminum (Al³⁺) - 0,00 cmol_cdm⁻³; calcium (Ca²⁺) - 1,36 cmol_cdm⁻³; magnesium (Mg²⁺) - 0,59 cmol_cdm⁻³ and base saturation (V) - 39,4%; cation exchange capacity (CTC pH 7.0) - 5,25; organic matter (MO) - 11,8 g dm⁻³; sand - 830 g kg⁻¹; silt - 30 g kg⁻¹ and clay - 140 g kg⁻¹. Acidity correction of the soil was performed with dolomitic limestone, with an increase in base saturation to 50% and incorporation of dolomitic limestone with RPTN = 91% (real power of total neutralization).

The grass species used was *Urochloa ruziziensis* (Germain and Evrard). The experiment was conducted in randomized blocks, arranged in a 4x3 factorial scheme, with four replicates, totaling 48 plots, with 4 x 3 m each (12 m²).

The bacteria inoculated were *Azospirillum brasilense* Ab-V5 (=CNPSo 2083), *Pseudomonas fluorescens* CCTB03 (=CNPSo 2719) and *Pantoea ananatis* AMG 521 (=CNPSo 2798), plus the control treatment (with no bacteria), associated with three doses of N-fertilizer (0, 50 and 100 kg N ha⁻¹).

The strains are deposited in the *Embrapa Soja* Multifunctional Microorganisms Collection: Diazotrophic and Plant Growth Promoting Bacteria (World Federation Culture Collection-WFCC#1213, World Data Centre for Microorganisms-WDCM#1054). The bacteria derive from selection programs of PGPB of Embrapa Soja: *Azospirillum brasilense* Ab-V5, selected in Brazil, initially for the culture of corn (*Zea mays*) and wheat (*Triticum aestivum*) (Hungria et al., 2010); *Pseudomonas fluorescens* CCTB03 from the company Total Biotecnologia, and *Pantoea ananatis* AMG 521, isolated in Spain (Megías et al., 2016).

For the inoculants preparation, the strains were cultivated in DYGS media (Fukami et al., 2018) and their concentration was adjusted to 10⁸ cells mL⁻¹, obtained from the correlation of growth curves previously obtained by the Culture Collection for each strain and the corresponding optical densities. For inoculation, 15 mL of each inoculum were used per Kg of seeds before sowing. The seeds were dried for approximately 30 minutes at a cool place and protected from the sun. Then we sowed the amount of 10 kg ha⁻¹ (culture value of the non-treated seeds of 50%).

One week before sowing, fertilization was performed with the application of 84 kg P₂O₅ ha⁻¹ (simple superphosphate 18% P₂O₅), 42,5 kg K₂O ha⁻¹ (potassium chloride 60% de K₂O). After seedling emergence, the basal dose of 20 kgN ha⁻¹ (urea 45 % of N) was applied in all experimental plots. The incorporation of limestone and fertilizers was done with the use of light harrowing.

When the Ruziziensis grass reached, on average, 35-40 cm of height, it was uniformly cut at 15 cm. The heights were measured with the help of a 1-meter millimetered ruler. After that, the plots received N-fertilizer, according to the treatments (0, 50 and 100 kg N ha⁻¹). The amount of 100 kg N ha⁻¹ was divided into two applications, with a 15-day interval.

During the experimental period, climate conditions were monitored, with an average record of rainfall (119 mm), relative humidity (83%) and maximum average temperatures (27°C) and minimum (17°C), as shown in Figure 1.

2.2 Measurement of the studied parameters

Cutting management was done based on a light interception (LI) of 95 %. LI was measured with the AccuPAR equipment, PAR/LAI ceptometer[®]) model LP-80 (Decagon Devices Inc, Pullman, United States). The monitoring of the LI focusing on the forage canopy was performed through the scanning of six random spots per plot every seven days.

After the plot mean reached the expected LI, we randomly collected 10 tillers representing the plot. They were weighed and dried in a stove with forced air circulation at 55 °C for 72 hours and weighed again for determination of dry mass. Afterwards, we randomly collected two samples of forage mass, with cuts at 15 cm of stubble height, by using a STIHL[®] pruner, model HS 82 R (STIHL, Rio Grande do Sul, Brazil), with the following measures: 0,5x0,5 m (0,25 m²). After obtaining forage mass, we performed uniformity cutting at the same stubble height, in the entire experimental plot.

After harvesting, the material was identified, weighed, and turned into two sub-samples: one for separating the morphological components (leaf blade, stem+sheath and senescent material), and the other for determining dried forage mass. The samples were conditioned in paper bags, weighed and dried in a stove with forced air circulation at 55 °C for 72 hours. Then, it was all weighed again for determination of dry mass and, after that, milled with a stationary "Thomas Wiley" mill adapted with a 2 mm sieve.

Crude protein (CP, g kg⁻¹), neutral detergent fiber (NDF g kg⁻¹), acid detergent fiber (ADF g kg⁻¹) and *in vitro* digestibility of the dry matter (IVDDM g kg⁻¹) were quantified in the leaf blade by Near Infrared Reflectance Spectroscopy – NIRS), (Foss NIRSystems, XDS Rapid Content Analyzer, Denmark).

For the NIRS scanning, we constructed a calibration curve from the laboratorial analytical data of 110 samples, which were analyzed for N using the micro-Kjeldahl method (Tecator, Sweden), and converted into protein by using the 6,25 factor, according to the methodology described by the AOAC (1990). NDF and ADF were determined in accordance with Van Soest et al. (1991), LIG according to Goering and Van Soest (1970) and IVDDM was obtained in compliance with techniques (traditional

methodology) described by Tilley and Terry (1963) and Holden (1999), using a DAISYII artificial rumen (ANKOM™ Technology Corp., Fairport, NY).

For the elaboration of the calibration curve, the samples spectra were scanned by the software ISIScan and exported to the software WinISI III Project Manager 1.50e (Infrasoft International, LLC, 2000, Port Matilda, PA, USA). Reflectance data were stored with $\log 1/R$, with intervals of 2 nm between 700 and 2500 nm.

Principal component analysis (PCA) was carried out before the calibration curves were elaborated by using the partial least squares (PLS) regression model. Then we performed the crossed validation with the software confronting the data from the laboratorial analysis with those estimated by the calibration curve of the NIRS.

After the elimination of the outliers, we used 77 samples for CP, 79 for NDF, 79 for ADF and 71 for IVDDM. For CP, NDF, ADF and IVDDM, respectively, we obtained the following parameters of curve validation: determination coefficient (R^2 ; 0.99, 0.92, 0.94 and 0.86), cross validation error (SECV; 0.48, 1.43, 0.66 and 4.62%), R^2 corrected by the cross validation error (1-VR; 0.99, 0.88, 0.91 and 0.76), prediction error (SEP; 0.34, 1.03, 0.50 and 3.28) and mean \pm standard deviation ($X \pm SD$; 12.65 ± 3.33 , 51.39 ± 3.73 , 24.72 ± 2.12 e 68.54 ± 8.68).

Tillers population density (TPD, tillers.m²) was estimated every 28 days by manually counting the tillers of the plots, considering all the live tillers observed inside the metal frame of 0,5x0,15 m (0,075 m²), according to the methodology proposed by Sbrissia and Silva (2008). Two representative points were marked inside each plot with a pipe, and the measurements were taken by placing the rectangle at the marked point.

The daily forage mass accumulation rate (dFMA, kg of DM ha⁻¹ day) was obtained by dividing the accumulated forage mass by the number of days referring to the harvests interval. The yearly forage mass accumulation rate (yFMA, kg of DM ha⁻¹ year) was calculated through the sum of all partial harvests of the experimental period (Barbosa et al., 2007).

Root dry mass (RM, kg ha⁻¹) was determined at the end of each season of the year (autumn, winter, spring and summer), based on the collection of two soil samples with roots in the depth of 0 to 20 cm in each experimental plot, with a steel probe (10 cm of diameter and 50 cm of length), with an opening in the middle to make sample stratification easier. The samples were conditioned in plastic bags previously identified,

washed in running water for total soil removal (Soares Filho et al., 2013), weighed and dried in a stove with forced air circulation at 55 °C for 72 hours.

For roots geometry, we withdrew 1 g of roots from the samples after drying for determining root diameter (RD_i, mm), root area (RA, mm².dm³), root length (RL, mm) and root density (RDe, mm.cm³) by digitalizing the roots with an HP 3400 Scanner, and the images scanning was done by using the software DELTA T SCAN[®].

2.3 Statistical Analysis

We used the PROC GLIMMIX from SAS University (Sas Institute Inc. Cary, CA) in all statistical analyses. The variables were initially tested regarding normality (Shapiro–Wilk test). The data were analyzed in a factorial scheme of four treatments, namely control (non-inoculated), *Azospirillum brasilense* Ab-V5, *Pseudomonas fluorescens* CCTB03 and *Pantoea ananatis* AMG 521) x three doses of N-fertilizer, zero, 50 and 100 kg N/ha. We also considered the data from each season as measures repeated in time, and the random effects of the block and year of analysis. The choice of covariance matrix was made by using the Information Criteria by Akaike (Wolfinger, 1993). The means were estimated by using the “LSMEANS”, and the comparison was made through the difference probability (PDIFF), using the Tukey test at 5% of significance.

3 RESULTS

There was no effect of interaction between the PGPB and the doses of N-fertilizer for the leaf blade (LB, kg de MS ha⁻¹), stem+sheath (SS, kg of DM ha⁻¹), production of forage mass (FM, kg of DM ha⁻¹), daily accumulation of forage mass (dAFM, kg of DM ha⁻¹ day⁻¹) and yearly accumulation of forage mass (yAFM, kg of DM ha⁻¹ year⁻¹) (Figure 2).

We did not observe any effects of the inoculation of PGPB strains on these parameters, presenting on average 2367,04 kg of DM ha⁻¹ of LB, 2048,15 kg of DM ha⁻¹ of SS, 4930,84 kg of DM ha⁻¹ of FM, 116,98 kg of DM ha⁻¹ day⁻¹ of dAFM, 35778,00 kg of DM ha⁻¹ year⁻¹ of yAFM (Figures 2A and 2C).

Regarding the use of doses of N-fertilizer, there were no effects either, presenting on average 2360,57 kg of DM ha⁻¹ of LB, 2070,47 kg of DM ha⁻¹ of SS, 4964,61 kg of

DM ha⁻¹ of FM, 116,98 kg of DM ha⁻¹ day⁻¹ of dAFM, 35778,00 kg of DM ha⁻¹ year⁻¹ of yAFM (Figures 2B and 2D).

The interaction between PGPB and the doses of N-fertilizer had no effects on tiller population density (TPD; tillers.m²) of Ruziziensis grass (Table 1). The inoculation of the PGPB strains had no effects on the TPD results, with an average of 1009 tillers.m². Yet, the doses of N-fertilizer presented effects on TPD, with a greater number of tillers ($p = 0,0427$) at the doses of 50 and 100 kg of N ha⁻¹.

The interaction between the PGPB and the doses of N-fertilizer for tiller weight (TW, $p = 0,0004$) is presented in Table 2. The results showed that, for the treatment group that received only doses of N-fertilizer without the inoculation of PGPB, the tillers were heavier when receiving N-fertilizer. The TW values were similar between the Ab-V5 and CCTB03 strains and the doses of N-fertilizer, with an average weight of 1,54 g. For AMG521 strain, the association with the doses of N-fertilizer led to a greater tiller weight, 1,52 on average, in relation to 1,18 provided by the inoculation in the zero dose of N-fertilizer.

Crude protein contractions (CP; g kg⁻¹), neutral detergent fiber (NDF; g kg⁻¹), acid detergent fiber (ADF; g kg⁻¹) and *in vitro* digestibility of the dry matter (IVDDM; g kg⁻¹) are shown in Table 3. There were no interaction effects between the PGPB and the doses of N-fertilizer regarding these parameters.

The inoculation of the PGPB strains had no effects on the results of CP, NDF, ADF and IVDDM, with an average of 127,82, 549,92, 270,10 and 742,78 g kg⁻¹, respectively. However, the doses of N-fertilizer had effects on the aforementioned parameters (Table 3), with a greater concentration of CP and smaller concentration of NDF ($p = 0,0001$ and $0,0085$, respectively) in the dose of 100 kg of N ha⁻¹. ADF and IVDDM were not influenced by N-fertilizer.

Root mass (RM; kg ha⁻¹) and root diameter (RD_i; mm) are presented in Table 4. There was no effect of the interaction between the PGPB and the doses of N-fertilizer for these parameters.

The inoculation of the PGPB strains had no effect on the RM results, with an average of 11.41 ton ha⁻¹. Yet, regarding RD_i, the AMG 521 strain was the one that presented the best result with the smallest root diameter (0,17 mm) of Ruziziensis grass.

With regard to the use of N-fertilizer, there was no effect on RM and RDi (Table 4), with an average of 11.41 ton ha⁻¹ and 0,18 mm, respectively.

The interaction between PGPB and doses of N-fertilizer for root area (RA, $p = 0,0230$), root length (RL, $p = 0,0420$) and root density (RDe, $p = 0,0117$) are presented in Table 5.

For RA, RL and RDe, the results showed that the control treatment that received only doses of N-fertilizer without the inoculation of PGPB, and the treatment with the inoculation of the Ab-V5 strain, had similar results, with an average of 75,31 and 73,42 mm².dm³, 330,41 and 330,08 mm, 0,42 and 0,42 mm.cm³, respectively. The CCTB03 and AMG 521 strains demonstrated smaller RA, RL and RDe when associated with the dose of 50 kg of N ha⁻¹.

4 DISCUSSION

Even though the influence of the inoculation of PGPB and doses of N-fertilizer on the production and accumulation of forage mass (Figure 2) was not verified in this study, the literature shows positive results based on the isolated action of PGPB or N-fertilizer, or the association between them.

Results demonstrating an increase in biomass as the use of N-fertilizer in tropical grasses is reduced have been reported in studies conducted by Hungria et al. (2016) in *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *Brachiaria ruziziensis*, Aguirre et al. (2018) in *Cynodon dactylon* (L.) Pers. cv. Coastcross-1 and Leite et al. (2018) in *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. However, these results are still inconclusive, since further research is necessary for provide a more solid and replicable database in a way that this technology can be transformed, in fact, into a commercial product to be used in tropical pastures.

The use of PGPB, for instance, demonstrates the capacity to contribute to the growth and development of forage, allowing increments of up to 60 % in forage mass, as reported by Megías et al. (2017) and Leite et al. (2018). Some studies have attributed the increments in terms of forage mass to hormones, such as cytokinins, gibberellins and auxins, synthesized by PGPB (Fukami et al., 2017 and Gouda et al., 2018).

Regarding research on the use of fertilizers in pasture, it is known that all nutrients are necessary and important for the growth and development of pasture. That way, a lack of any nutrient can, at some stages of forage maturity, hinder the expression of its productive potential.

Among the nutrients, nitrogen (N) is considered one of the most required by plants (Dobbelaere e Okon, 2007). Therefore, it is one of the most efficient nutrients when it comes to enabling grasses to have a greater accumulation of mass production and a better nutritious value (Palmer et al, 2014).

Although the use of N-fertilizer increases mass production, it also leads to more costs in pasture management (Guimarães et al., 2011). That is why the use of PGPB is so interesting for the modernization of animal production on pasture, thus, minimizing the external dependency on the use of N due to the compensation by the increment of N in the system through the biological fixation of it. Besides, PGPB improve the availability of other nutrients, such as phosphorus.

In this study, the use of greater doses of N-fertilizer (100 kg of N ha⁻¹) in *U. ruziziensis* contributed to a larger amount of tillers in the forage canopy (Table 1), as verified by Lima et al. (2016). We also found out that the inoculation of PGPB associated with doses of N-fertilizer contributed to the emergence of heavier tillers. The production of heavier tillers (Table 2), and in greater amount, allows increments in the production of forage mass and an increase in pasture support capacity, with a positive impact on animal production (Cecato et al., 2011).

The greater concentration of CP and the smaller concentration of NDF, associated with the greater dose of N-fertilizer (kg de N ha⁻¹) was possibly due to the increase in nitrogen compounds in the plant and, as a consequence, a decrease in fibrous compounds, as mentioned by Van Soest (1975), since they are inversely proportional. N composes part of the structure of nucleic acids and proteins and, for that reason, its supply is directly related to the raise in CP (Malavolta, 2006).

The smaller RD_i verified with the inoculation of the AMG 521 strain (Table 4) is considered as the best result, due to the fact that thinner root hairs are more efficient, enabling greater exploration of the soil and better absorption of water and nutrients, as demonstrated in studies by Do Vale et al., (2013), and Verbon and Liberman (2016). In their turn, roots of greater diameter are related to the plant's energetic supply (Ribeiro et

al., 2011; Sanches et al., 2017). Greater root volume, besides improving absorptivity and exploring a greater area of the soil, also prevents soil compactation since the most superficial layers to the deepest ones (Cecato et al., 2006).

This change in morphology and more expressive root volume can affect the plant's efficiency in the use of nutrients available in the soil (Sureshbabu et al., 2016; Verbon and Liberman, 2016). This alteration is possibly related to bacterial action, which possibly potentializes the activity of hormones commonly synthesized by the plant, as described by Spaepen (2015) and Mamédio et al. (2020).

PGPB play two roles that have a direct effect in terms of enhancing efficiency in the use of N. One of them is the production of hormones, and the other one is the capacity of biologically fixing nitrogen (Rodolem et al., 2017).

The literature clearly proves that bacteria depend on the availability of a certain amount of N in the system, so that their metabolic activities occur. The absence of N in the soil may inhibit microbial activity, leaving the bacteria dormant (Marschner et al., 2006). Likewise, the excess of N has the same effects on these microorganisms (Zhu et al., 2016).

The use of N-fertilizer has had its efficiency proven in tissues renovation, thus, considerably increasing the production of forage mass. Nevertheless, its indiscriminate use can not only compromise the microbiota, but also be a serious pollution agent against the ecosystem. For that reason, the use of PGPB has been considered a sustainable alternative for reducing the amount of N-fertilizer required by forage, so that it can achieve its productive potential.

For their action, these bacteria have been described as plants growth promoters from the synthesis of substances that contribute to a higher interaction of roots with nutrients cycling (Moreira et. al., 2010).

The absence of effects verified in the association between PGPB and tropical grasses can be attributed to an inadequate combination of them, since not all bacteria are responsive to all grass species (Mamédio et al., 2020).

5 CONCLUSION

Although plant growth promoting bacteria were not efficient in the production and accumulation of forage mass, of both the aerial part and the root area of *Urochloa ruziziensis*, they still represent a sustainable alternative, which is viable when it comes to livestock on pasture. It is due to the fact that their use potentializes the action of N-fertilizer in pasture, reducing the amount used and, thus, leading to a decrease in the production costs.

ACKNOWLEDGEMENTS

The research group is supported by INCT—Microorganisms Promoting Plant Growth Aiming at Agricultural Sustainability and Environmental Responsibility (MPCPAgro), CNPq (465133/2014-4, Araucaria Foundation-STI, CAPES). M. Hungria is also a CNPq research fellowship recipient. This study was supported by the study group in forage (Agrisus Foundation PA1732/16, CNPq 405389/2016-7, CAPES). U. Cecato is also a CNPq research fellowship recipient (CNPq-307838/2014-5).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

ORCID

Artur Roque Domingues Barreiros <https://orcid.org/0000-0002-3477-8203>

REFERENCES

- Aguirre, P. F., Olivo, C. J., Rodrigues, P. F., Falk, D. R., Adams, C. B., & Schiafino, H. P. (2018). Forage yield of Coastcross-1 pastures inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, *40*, e36392. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v40i1.36392>
- AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis Association of Official Analytical Chemists*. Arlington, Virginia: AOAC International.
- Cassán, F., & Diaz-Zorita, M. (2016). *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biology and Biochemistry*, *103*, 117-130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020>

- Cecato, U., Galbeiro, S., Paris, W., Soares Filho, C. V., Teixeira, S. (2011). Uso de nitrogênio em pastagens. In U. Cecato, M. A. A. F. Barbosa, S. Galbeiro, W. Paris, F. C. A. R. Grecco, C. S. Viegas, S. Teixeira (Eds.), *Simpósio de Produção Animal a Pasto*, (pp. 117-162). Maringá: Sthampa.
- Dobbelaere, S., & Okon, Y. (2007). The plant growth-promoting effect and plant responses. In C. Elmerich, W. E. Newton (Eds.), *Associative and Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*, (pp. 145-170). Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Döbereiner, J., & Ruschel, A. P. (1958). Uma nova espécie de Beijerinckia. *Revista de Biologia*, 1, 260-272.
- Duarte, C. F. D., Cecato, U., Hungria, M., Fernandes, H. J., Biserra, T. T., Mamédio, D., Galbeiro, S., & Nogueira, M. A. (2020). Inoculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal em *Urochloa Ruziziensis*. *Research, Society and Development*, 9, eXX. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i8.XX>
- Freitas, I. C. V., & Rodrigues, M. B. (2010). Fixação biológica do nitrogênio na cultura do milho. *Agropecuária Técnica*, 31, 143-154. <https://periodicos.ufpb.br/index.php/at/article/download/4515/4636/>
- Fukami, J., Cerezini, P., & Hungria, M. (2018). Azospirillum: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*, 8, 73. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>
- Fukami, J., Ollero, F. J., Megías, M., Hungria, M. (2017). Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express*, 7, 153. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0453-7>
- Goering, H. K., & Van Soest, P. J. (1970). *Forage fiber analyses: apparatus, reagents, procedures, and some applications* (No. 379). Disponível em https://books.google.com.br/books?id=yn8wAAAAYAAJ&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H. S., & Patra, J. K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological research*, 206, 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>

- Guimarães, S. L., Silva, E. M. B., Polizel, A. C., & Campos, D. T. S. (2011). Produção de capim marandu inoculado com *Azospirillum* spp. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*, 7, 816-825.
- Holden, L. A. (1999). Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *Journal of dairy science*, 82, 1791-1794. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75409-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75409-3)
- Hungria, M., Nogueira, M. A., & Araujo, R. S. (2016). 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*, 221, 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.01.024>
- Kavamura, V. N., Santos, S. N., da Silva, J. L., Parma, M. M., Ávila, L. A., Visconti, A., Zucchi, T. D., Taketani, R. G., Andreote, F. D., & Melo, I. S. (2013). Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological research*, 168, 183-191. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002>
- Kochar, M., & Srivastava, S. (2012). Surface colonization by *Azospirillum brasilense* SM in the indole-3-acetic acid dependent growth improvement of sorghum. *Journal of basic microbiology*, 52, 123-131. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100038>
- Leite, R. D. C., dos Santos, J. G., Silva, E. L., Alves, C. R., Hungria, M., Leite, R. D. C., dos Santos, A. C. (2018). Productivity increase, reduction of nitrogen fertiliser use and drought-stress mitigation by inoculation of Marandu grass (*Urochloa brizantha*) with *Azospirillum brasilense*. *Crop and Pasture Science*, 70, 61-67. <https://doi.org/10.1071/CP18105>
- Lopes, M. J. S., Dias Filho, M. B., dos Reis Castro, T. H., de Filippi, M. C. C., da Silva, & G. B. (2018). Effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Burkholderia pyrrocinia* on the Growth Improvement and Physiological Responses in *Brachiaria brizantha*. *American Journal of Plant Sciences*, 9, 250-265. doi: 10.4236/ajps.2018.92021
- Malavolta, E. (2006). *Manual de nutrição mineral de plantas*. Agronômica Ceres.
- Mamédio, D., Cecato, U., Sanches, R., Silva, S. M. S., Silva, D. R., Rodrigues, V. O., Galbeiro, S., Barreiros, A. R. D., & Vicente, J. V. R. (2020). Do plant-growth promoting bacteria contribute to greater persistence of tropical pastures in water

- deficit? - A Review. *Research, Society and Development* 9, eXX. doi: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i8.XX>
- Marschner, P., Solaiman, Z., & Rengel, Z. (2006). Rhizosphere properties of Poaceae genotypes under P-limiting conditions. *Plant and Soil* 283, 11-24. doi: 10.1007/s11104-005-8295-5
- Megías, E., Megías, M., Ollero, F. J., & Hungria, M. (2016). Draft genome sequence of *Pantoea ananatis* strain AMG521, a rice plant growth-promoting bacterial endophyte isolated from the Guadalquivir marshes in southern Spain. *Genome Announcements* 4, e01681-15. doi: 10.1128/genomeA.01681-15
- Megías, E., Junior, F. B. R., Ribeiro, R. A., Ollero, F. J., Megías, M., & Hungria, M. (2017). Genome Sequence of *Pantoea ananatis* Strain AMG 501, a Plant Growth-Promoting Bacterium Isolated from Rice Leaves Grown in Paddies of Southern Spain. *Genome Announcements*, 5, e00848-17. doi: 10.1128/genomeA.00848-17
- Moreira, F. M. D. S., Da Silva, K., Nóbrega, R. S. A., & De Carvalho, F. (2010). Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, 1, 74-99.
- Palmer, M. A., Filoso, S., & Fanelli, R. M. (2014). From ecosystems to ecosystem services: Stream restoration as ecological engineering. *Ecological Engineering*, 65, 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.07.059>
- Ribeiro, O. L., Cecato, U., Rodrigues, A. M., Faveri, J. C., Jobim, C. C., & Lugão, S. M. B. (2011). Biomassa radicular e reservas orgânicas em Coastcross consorciada ou não com "*Arachis pintoii*", com e sem nitrogênio, sob pastejo. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 12, 318-328.
- Rosolem, C. A., Ritz, K., Cantarella, H., Galdos, M. V., Hawkesford, M. J., Whalley, W. R., & Mooney, S. J. (2017). Enhanced plant rooting and crop system management for improved N use efficiency. *Advances in agronomy*, 146, 205-239. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2017.07.002>
- Sanches, R. (2017). *Intensidade de pastejo e desempenho radicular do capim convert HD364 na relação com a resistência do solo à penetração*. Dissertação de Mestrado. UEM: Universidade Estadual de Maringá.

- Santos, H. G., Jacomine, P. K. T., Dos Anjos, L. H. C., De Oliveira, V. A., Lumbrreras, J. F., Coelho, M. R., & Cunha, T. J. F. (2018). *Sistema brasileiro de classificação de solos*. Brasília, DF: Embrapa.
- Sarathambal, C., Ilamurugu, K., Balachandar, D., Chinnadurai, C., & Gharde, Y. (2015). Characterization and crop production efficiency of diazotrophic isolates from the rhizosphere of semi-arid tropical grasses of India. *Applied Soil Ecology*, *87*, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.11.004>
- Sbrissia, A. F., & Silva, S. C. D. (2008). Compensação tamanho/densidade populacional de perfilhos em pastos de capim-marandu. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *37*, 35-47. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008000100005>
- Soares Filho, C. V., Cecato, U., Ribeiro, O. L., Cruz Roma, C. F. D., Jobim, C. C., Beloni, T., & Venturoli Perri, S. H. (2013). Root system and root and stem base organic reserves of pasture Tanzania grass fertilizer with nitrogen under grazing. *Semina: Ciências Agrárias*, *34*, 2415-2426. doi: 10.5433/1679-0359.2013v34n5p2415
- Spaepen, S. (2015). Plant hormones produced by microbes. In: Lugtenberg B. (eds) *Principles of Plant-Microbe Interactions* (pp. 247-256). Springer, Cham.
- Sureshbabu, K., Amaresan, N., & Kumar, K. (2016). Amazing multiple function properties of plant growth promoting rhizobacteria in the rhizosphere soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *5*, 661-683. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.502.074>
- Tilley, J. M. A., & Terry, R. A. (1963). A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass and forage science*, *18*, 104-111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>
- Van Groenigen, J. W., Huygens, D., Boeckx P., Kuyper, T. W., Lubbers, I. M., Rütting, T., & Groffman, P. M. (2015). The soil N cycle: new insights and key challenges. *Soil*, *1*, 235–256. <https://biblio.ugent.be/publication/6994395/file/6994403>
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* *74*, 3583-3597. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2
- Verbon, E. H., & Liberman, L. M. (2016). Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends in plant science*, *21*, 218-229. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.013>

- Wolfinger, R. (1993). Covariance structure selection in general mixed models. *Communications in statistics-Simulation and computation*, 22, 1079-1106. <https://doi.org/10.1080/03610919308813143>
- Zhu, S., Vivanco, J. M., & Manter, D. K. (2016). Nitrogen fertilizer rate affects root exudation, the rhizosphere microbiome and nitrogen-use-efficiency of maize. *Applied Soil Ecology*, 107, 324-333. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.07.009>

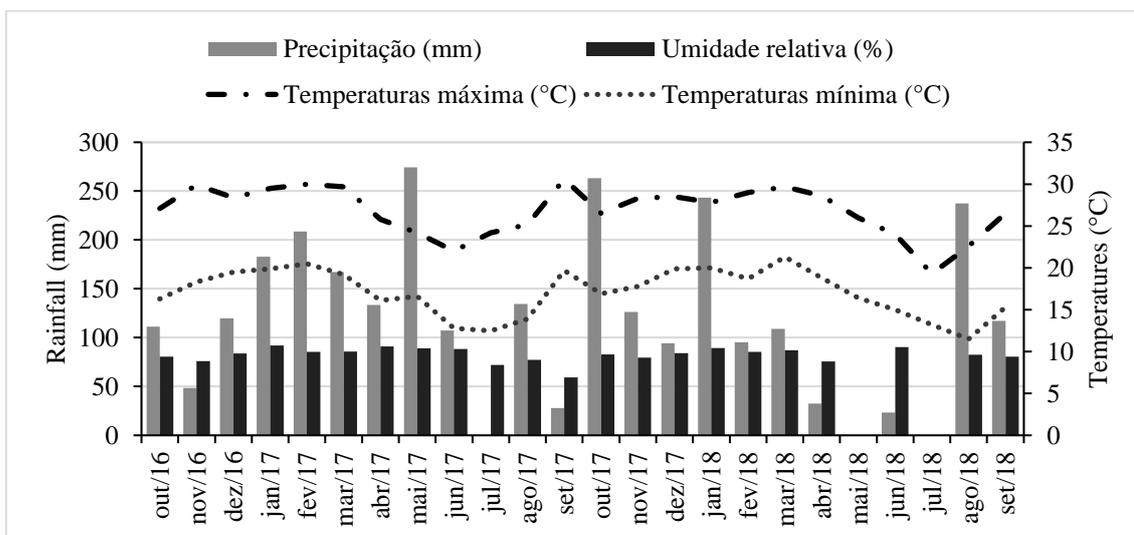


FIGURE 1 Climatic conditions (rainfall, relative humidity, maximum and minimum temperatures) registered at the Automatic Meteorological Station (FEI-UEM) over the experimental period (October to December 2017 and January to September 2018).

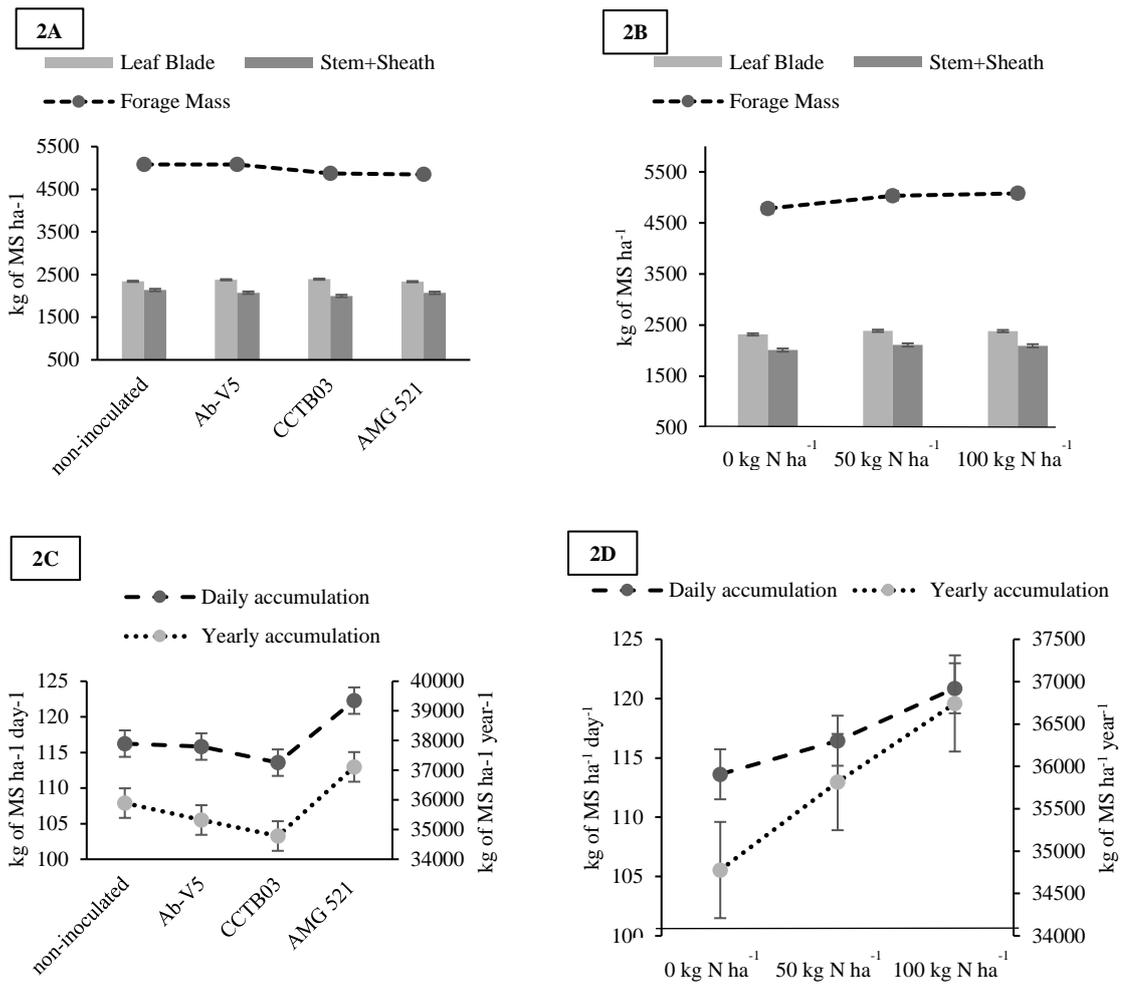


FIGURE 2 leaf blade, stem+sheath, forage mass (2A and 2B), daily forage mass accumulation and yearly forage mass accumulation (2C e 2D) of *Urochloa ruziziensis* inoculated with plant growth-promoting bacteria and N-fertilizer doses.

TABLE 1 Tillers population density (TPD, tillers.m²) of *Urochloa ruziziensis* inoculated with plant growth-promoting bacteria and N-fertilizer doses

Parameter	Plant Growth-Promoting Bacteria				SEM
	non-inoculated	Ab-V5	CCTB03	AMG 521	
TPD (tillers.m ²)	1005	1027	989	1015	79
Parameter	N-fertilizer Doses (kg of N ha ⁻¹)			SEM	
	0	50	100		
TPD (tillers.m ²)	973 b	1005 ab	1050 a	78,13	

Azospirillum brasilense Ab-V5; *Pseudomonas fluorescens* CCTB03; *Pantoea ananatis* AMG 521. SEM = standard error of mean. Means followed by different lowercase letters in each line are significantly different ($P < 0.05$ Tukey test).

TABLE 2 Effect of interaction between plant-growth promoting bacteria (PGPB) and x N-fertilizer doses in tiller weight (TW; g) of *Urochloa ruziziensis*

Parameter	non-inoculated	Ab-V5	CCTB03	AMG 521	SEM
0 kg of N ha ⁻¹	1,158 B	1,643 A	1,704 A	1,183 B	0,143
50 kg of N ha ⁻¹	1,489 A	1,656 A	1,276 A	1,510 A	0,143
100 kg of N ha ⁻¹	1,510 A	1,399 A	1,570 A	1,526 A	0,143

Azospirillum brasilense Ab-V5; *Pseudomonas fluorescens* CCTB03; *Pantoea ananatis* AMG 521. SEM = standard error of mean. Means followed by different uppercase letters in each line are significantly different ($P < 0.05$ Tukey test).

TABLE 3 Crude protein (CP; g kg⁻¹), neutral detergent fiber (NDF; g kg⁻¹), acid detergent fiber (ADF; g kg⁻¹) and *in vitro* digestibility of dry matter (IVDDM; g kg⁻¹) of *Urochloa ruziziensis* inoculated with plant growth-promoting bacteria and N-fertilizer doses

Parameter	Plant Growth-Promoting Bacteria				SEM
	non-inoculated	Ab-V5	CCTB03	AMG 521	
CP (g kg ⁻¹)	126,44	128,62	128,9	127,33	3,1
NDF (g kg ⁻¹)	548,76	548,83	552,27	549,82	16,3
ADF (g kg ⁻¹)	268,4	271,2	270,2	270,6	2,9
IVDDM (g kg ⁻¹)	742,3	743,8	742,5	742,5	15,3
Parameter	N-fertilizer Doses (kg of N ha ⁻¹)			SEM	
	0	50	100		
CP (g kg ⁻¹)	122,39 b	127,22 b	133,85 a	2,60	
NDF (g kg ⁻¹)	554,05 a	548,93 ab	546,79 b	16,30	
ADF (g kg ⁻¹)	271,00	269,60	269,70	2,80	
IVDDM (g kg ⁻¹)	740,70	743,80	743,90	15,30	

Azospirillum brasilense Ab-V5; *Pseudomonas fluorescens* CCTB03; *Pantoea ananatis* AMG 521. SEM = standard error of mean. Means followed by different lowercase letters in each line are significantly different ($P < 0.05$ Tukey test).

TABLE 4 Root mass (RM; kg ha⁻¹) and root diameter (RDi; mm) of *Urochloa ruziziensis* inoculated with plant growth-promoting bacteria and N-fertilizer doses

Parameter	Plant Growth-Promoting Bacteria				SEM
	non-inoculated	Ab-V5	CCTB03	AMG 521	
RM (ton ha ⁻¹)	11,147	11,77	11,398	11,305	0,476
RDi (mm)	0,20 a	0,19 ab	0,18 ab	0,17 b	0,010
Parameter	N-fertilizer Doses (kg of N ha ⁻¹)			SEM	
	0	50	100		
RM (ton ha ⁻¹)	10,971	11,144	12,1	0,412	
RDi (mm)	0,18	0,18	0,19	0,010	

Azospirillum brasilense Ab-V5; *Pseudomonas fluorescens* CCTB03; *Pantoea ananatis* AMG 521. SEM = standard error of mean. Means followed by different lowercase letters in each line are significantly different ($P < 0.05$ Tukey test).

TABLE 5 Effect of interaction between plant-growth promoting bacteria (PGPB) and x N-fertilizer doses in root area (RA, mm².dm³), root length (RL, mm) and root density (RDe, mm.cm³) of *Urochloa ruziziensis*

Parameter	non-inoculated	Ab-V5	CCTB03	AMG 521	SEM
----- Root Area (mm ² .dm ³)-----					
0 kg of N ha ⁻¹	67,34 A	84,18 A	70,27 A	66,83 A	7,280
50 kg of N ha ⁻¹	83,52 A	66,07 AB	50,12 B	39,09 B	7,280
100 kg of N ha ⁻¹	75,08 A	70,01 A	44,67 A	62,60 A	7,280
----- Root Length (mm)-----					
0 kg of N ha ⁻¹	343,20 A	362,62 A	361,47 A	365,62 A	24,820
50 kg of N ha ⁻¹	358,33 A	352,51 AB	254,63 B	239,10 B	24,820
100 kg of N ha ⁻¹	289,69 A	275,12 A	257,91 A	243,02 A	24,820
----- Root Density (mm.cm ³)-----					
0 kg of N ha ⁻¹	0,42 A	0,46 A	0,46 A	0,47 A	0,030
50 kg of N ha ⁻¹	0,47 A	0,45 AB	0,32 B	0,30 B	0,030
100 kg of N ha ⁻¹	0,36 A	0,34 A	0,33 A	0,31 A	0,030

Azospirillum brasilense Ab-V5; *Pseudomonas fluorescens* CCTB03; *Pantoea ananatis* AMG 521. SEM = standard error of mean. Means followed by different uppercase letters in each line are significantly different ($P < 0.05$ Tukey test).