

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

Lorena Emanuelle da Mata Terra

**Modificações fisiológicas e produtivas do capim-marandu proporcionadas por
bactérias promotoras do crescimento vegetal**

**Montes Claros
2020**

Lorena Emanuelle da Mata Terra

**Modificações fisiológicas e produtivas do capim-marandu proporcionadas por bactérias promotoras
 do crescimento vegetal**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Junio Cota Silva

Coorientadores: Thiago Gomes dos Santos Braz
 e Sílvia Nietsche

Montes Claros
Fevereiro de 2020

T323m Terra, Lorena Emanuelle da Mata.
2020

Modificações fisiológicas e produtivas do capim-marandu proporcionadas por bactérias promotoras do crescimento vegetal / Lorena Emanuelle da Mata Terra. Montes Claros, 2020.

51 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Área de concentração em Produção Vegetal, Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador(a): Junio Cota Silva.

Banca examinadora: Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira, Carolina Magalhães Caires Carvalho, Junio Cota Silva.

Inclui referências.

1. Fotosíntese. 2. Biomassa vegetal. 3. Gramínea. I. Silva, Junio Cota. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 633.2



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 17 dias do mês de fevereiro de 2020, às 08:00 horas, sob a Presidência do Professor Junio Cota Silva, D. Sc. (ICA-UFMG) e com a participação dos Professores, Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira, D. SC. (Unimontes) e Luiz Arnaldo Fernandes, D. Sc. (Suplente / ICA-UFMG) e; da Técnica Administrativa Carolina Magalhães Caires Carvalho, D. Sc. (ICA-UFMG), reuniu-se a Banca de defesa de dissertação de **LORENA EMANUELLE DA MATA TERRA**, aluna do Curso de Mestrado em Produção Vegetal. O resultado da defesa de dissertação intitulada: "Modificações fisiológicas e produtivas do capim-marandu proporcionadas por bactérias promotoras do crescimento vegetal"

sendo a aluna considerada (aprovada/reprovada) APROVADA. E, para constar, eu, Professor Junio Cota Silva, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

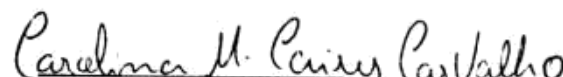
OBS.: A aluna somente receberá o título após cumprir as exigências do ARTIGO 68 do regulamento do Curso de Mestrado em Produção Vegetal, conforme apresentado a seguir:

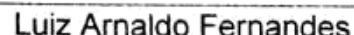
Art. 68 Para dar andamento ao processo de efetivação do grau obtido, o candidato deverá, após a aprovação de sua Dissertação ou Tese e da realização das modificações propostas pela banca examinadora, se houver, encaminhar à secretaria do Colegiado do Programa, com a anuência do orientador, no mínimo 3 (três) exemplares impressos e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação ou, 4 (quatro) exemplares impressos e 1 (um) exemplar eletrônico da tese, no prazo de 60 (sessenta) dias.

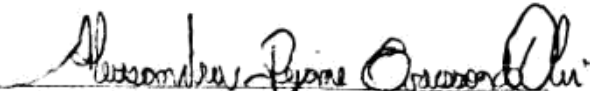
Montes Claros, 17 de fevereiro de 2020.



Junio Cota Silva
Orientador


Carolina Magalhães Caires Carvalho
Membro


Luiz Arnaldo Fernandes
Suplente


Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira
Membro

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

Aos meus pais,

Leonor da Mata e Jaqson Terra

Que batalharam para minha formação pessoal e profissional, abdicando muitas vezes dos seus sonhos, para sonharem comigo.

Aos meus irmãos,

Larissa Terra e Daniel Terra

Que estavam sempre ao meu lado, dando apoio e conforto.

Em especial a,

Kelson Noronha

Pelo companheirismo, dedicação, compreensão e por se manter sempre presente, confortando-me diante das dificuldades.

Aos meus avós,

Vitalina Terra e José Terra, Geralda da Mata e Anatólio da Mata

Por toda ajuda, orações e exemplo de vida.

Com muito carinho

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir chegar até aqui, iluminando minha vida e meu caminho, dando-me força e sabedoria.

Agradeço aos meus pais, Jaqson e Leonor, minha fonte de inspiração e coragem, por não medirem esforços para me proporcionar sempre o melhor, pelo apoio, pelo incentivo, pelo amor e principalmente por não me deixarem perder a fé, diante dos momentos mais difíceis.

Ao instituto de Ciências agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade e por toda infraestrutura concedida para realização do mestrado e a FAPEMIG pela concessão da bolsa.

À comissão orientadora, Junio Cota, Thiago Braz e Sílvia Nietzsche, por todo conhecimento, inspiração, apoio, dedicação e ensinamentos.

À equipe do laboratório de sanidade animal e laboratório de processos nutracêuticos, em especial à Anna Christina, Cintya e Carol, por toda atenção, ajuda e conhecimentos divididos.

Aos amigos do Grupo de Estudo em Forragicultura, por todo companheirismo e ajuda durante os experimentos.

Aos meus amigos de caminhada, Lara, Ana e Samuel, pelo companheirismo, amizade, apoio, palavras de conforto e por todos os bons momentos vividos.

Aos amigos que conquistei ao longo desta jornada, Érika, Amanda, Victor, Ernesto e Kamilla, por todo companheirismo, amizade e, principalmente, por estarem sempre presente, colaborando ativamente na condução do experimento.

E as minhas amigas de coração, Amanda e Manu que, apesar da distância, sempre estão presentes em minha vida.

Muito obrigada!

RESUMO

A expansão do Mercado de inoculantes contendo bactérias promotoras de crescimento em plantas tem permitido um aumento no uso de tecnologias e práticas sustentáveis nos sistemas agrícolas atuais, incluindo-se no cultivo de gramíneas. A técnica de inoculação simultânea de diferentes linhagens de microrganismos tem sido utilizada visando reduzir a aplicação de fertilizantes químicos, mitigar os efeitos de estresses abióticos e bióticos, além de promover ganhos no desempenho fotossintético. Desta forma, objetivou-se avaliar as características produtivas e fisiológicas do capim-marandu inoculado com bactérias promotoras de crescimento vegetal na ausência de suplementação de nitrogênio. O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento em blocos casualizados, constando da inoculação do capim-marandu com duas linhagens de bactérias, inoculadas de forma simultânea e em separado, sem adubação nitrogenada. Todos os parâmetros avaliados – altura de plantas, número de perfilhos (NPER), número de folhas (NF), massa seca (MS), teor de clorofila, a atividade fotossintética, fluorescência da clorofila *a*, comprimento de raízes (COMPR) e massa seca de raízes (MSR) – apresentaram incrementos significativos no tratamento onde houve a inoculação conjunta das linhagens de bactérias. Além disso, o efeito sinérgico da co-inoculação de bactérias resultou em um menor estresse nas plantas, estimado pela razão entre a fluorescência variável e fluorescência máxima da clorofila (F_v/F_m). Desta forma, a análise dos dados experimentais evidencia a atividade sinérgica das duas linhagens de bactérias avaliadas, proporcionando uma série de ganhos em características produtivas e fisiológicas do capim-marandu. Os resultados obtidos sugerem um grande potencial na aplicação das bactérias na produção de forragem, visando um aumento de produtividade, mitigando os efeitos do estresse pela deficiência de nitrogênio.

Palavras-chave: Fotossíntese. Inoculantes. Produção de biomassa. *Urochloa brizantha*.

ABSTRACT

The expansion of the market for inoculants containing plant growth-promoting bacteria has allowed an increase in the use of sustainable technologies and practices in current agricultural systems, including the cultivation of grasses. The technique of simultaneous inoculation of different strains of microorganisms has been used to reduce the application of chemical fertilizers, mitigate the effects of abiotic and biotic stresses, in addition to promoting gains in photosynthetic performance. Thus, the objective was to evaluate the productive and physiological characteristics of marandu grass inoculated with plant growth promoting bacteria in the absence of nitrogen supplementation. The experiment was carried out in a greenhouse in a randomized block design, consisting of the inoculation of marandu grass with two strains of bacteria, inoculated simultaneously and separately, without nitrogen fertilization. All parameters evaluated - plant height, number of tillers (NPER), number of leaves (NF), dry matter (MS), chlorophyll content, photosynthetic activity, chlorophyll a fluorescence, root length (COMPR) and mass dry roots (MSR) - showed significant increments in the treatment where there was the joint inoculation of the strains of bacteria. In addition, the synergistic effect of co-inoculation of bacteria resulted in less stress on plants, estimated by the ratio between variable fluorescence and maximum chlorophyll fluorescence (F_v/F_m). In this way, the analysis of the experimental data shows the synergistic activity of the two strains of bacteria evaluated, providing a series of gains in productive and physiological characteristics of marandu grass. The results obtained suggest a great potential in the application of bacteria in the production of forage, aiming at an increase in productivity, mitigating the effects of stress due to nitrogen deficiency.

Keywords: Photosynthesis. Inoculants. Biomass production. *Urochloa brizantha*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Efeito antagonista entre <i>Bacillus</i> sp. e <i>Azospirillum</i> brasilense por meio do método de disco de difusão	36
Figura 2 – Teste de inibição entre <i>Bacillus</i> sp. sobre o <i>Azospirillum</i> brasilense por ensaio cruzado.	37
Figura 3 – Clorofila das folhas de capim-marandu inoculadas com bactérias promotoras de crescimento via sementes e pulverização foliar, aos (a) 30, (b) 60 e (c) 90 dias.....	39
Figura 4 – Massa seca de raízes (g.vaso-1) de capim-marandu inoculado com bactérias promotoras do crescimento de plantas.....	41
Figura 5 – Raízes de capim- marandu inoculado com bactérias promotoras do crescimento vegetal	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização das espécies utilizadas no ensaio de bioinoculação no capim-marandu, Montes Claros, MG, 2019.....	33
Tabela 2 – Características agronômicas do capim– marandu inoculado com <i>A. brasilense</i> e <i>Bacillus</i> sp. em três cortes efetuados em intervalos de 30 dias, Montes Claros, Brasil, 2019	38
Tabela 3 – Taxa fotossintética do capim-marandu inoculado com bactérias promotoras de crescimento de plantas	40
Tabela 4 – Fluorescência da clorofila a do capim-marandu inoculado com bactérias promotoras de crescimento de plantas.....	41
Tabela 5 – Comprimento de raízes de capim – marandu inoculado com bactérias promotoras de crescimento	42
Tabela 6 – Comprimento de raízes de capim– marandu inoculado com bactérias promotoras de crescimento na semente e via pulverização foliar	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Taxa Fotossintética
ABA	Ácido Abscísico
ACC	Ácido 1-carboxílico-1-amino ciclopropano
AIA	Ácido Indolacético
ATP	Adenosina Trifosfato
BPCV	Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal
COMPR	Comprimento de Raíz
E	Taxa de Transpiração
ETR	Taxa de Transportes de Elétrons
EUA	Eficiência no Uso da Água
F ₀	Fluorescência inicial
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
F _m	Fluorescência máxima
F _v	Fluorescência variável
F _v /F _m	Razão da Fluorescência variável e Fluorescência máxima
MS	Matéria Seca
MSR	Matéria Seca de Raíz
N	Nitrogênio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADPH	Forma reduzida de Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NF	Número de Folhas
NPER	Número de Perfilhos
PSII	Fotossistema II
SFI	Solubilizadores de Fosfatos Inorgânicos
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo geral	14
2.2	Objetivos específicos	14
3	REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1	Cenário das pastagens brasileiras	15
3.2	<i>Urochloa brizantha</i> cv. Marandu	16
3.3	Nitrogênio e clorofila	16
3.4	Utilização de microrganismos promotores de crescimento em plantas	18
3.4.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	19
3.4.2	Gênero <i>Bacillus</i>	20
4	REFERÊNCIAS	22
5	ARTIGO	29
5.1	Sinergismo entre <i>Azospirillum brasilense</i> e <i>Bacillus</i> sp. no capim- marandu promove incremento na produtividade e modulações fisiológicas	29
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51

1 INTRODUÇÃO

Uma característica da pecuária brasileira é possuir a maior parte dos rebanhos criados a pasto, que se constitui na prática mais econômica dos sistemas de criação (RIBEIRO JÚNIOR, 2015). Os níveis produtivos destas pastagens, no entanto, estão abaixo de sua capacidade de suporte, uma vez que a exploração extrativista tem favorecido o aumento da degradação das pastagens. Estima-se que dos 160 milhões de hectares ocupados por pastagens, no Brasil, aproximadamente 70% encontram-se em algum grau de degradação, ocasionado principalmente pela exploração extrativista do solo (DIAS-FILHO, 2016).

A reposição de nutrientes, em especial de nitrogênio e fósforo, é de grande importância durante o estabelecimento da forrageira e manejo de ciclos de pastejo, garantindo a manutenção de seu vigor e perenidade (CARNEIRO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2013).

Contudo, tem-se buscado alternativas viáveis que minimizem os processos de degradação, tornando as pastagens mais produtivas e sustentáveis a um baixo custo; como a Integração Lavoura e Pecuária (ILP) (TORRES; ASSIS; LOSS, 2018) e a adoção de inoculantes, contendo bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) (KLOEPPER; SCHROTH, 1981).

As BPCV pertencem a um grupo de microrganismos de vida livre, que possuem a capacidade de se associarem a raízes de plantas, sendo comumente encontrados, no solo e na rizosfera, que podem ainda colonizar alguns ou uma grande parte de tecidos de plantas (GLICK, 2012).

Espécies de bactérias do gênero *Azospirillum*, tem sido amplamente estudadas, quanto a interação com espécies de gramíneas, destacando sua capacidade de promover a redução do nitrogênio atmosférico (N_2), em forma assimilável pelas plantas e sobretudo quanto a produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal, levando ao incremento de massa seca e raiz, de modo a reduzir gastos com adubações nitrogenadas e tornando o sistema sustentável (FUKAMI *et al.*, 2017).

Já espécies do gênero *Bacillus*, comumente encontradas no ambiente, possuem capacidade de solubilizar fosfato e agem no controle biológico por competição, liberação de antibióticos e sideróforos, além de liberarem no solo hormônios reguladores do crescimento de plantas como auxinas e giberelinas (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999).

O funcionamento do fotossistema II é dependente do teor de clorofila, que por sua vez, é dependente do teor de nitrogênio disponível (TAIZ; ZEIGER, 2013). Desta forma, a utilização de microrganismos como forma de inoculação pode promover ganhos produtivos aumentando a disponibilidade de nutrientes essenciais às plantas e promovendo maior taxa fotossintética.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar características produtivas e fisiológicas do capim-marandu, inoculado com bactérias promotoras do crescimento vegetal sem adubação nitrogenada.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros de produção do capim-marandu, inoculado com *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* sp de forma isolada e simultânea;
- Estimar diferenças entre os métodos de inoculação utilizando *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* sp via sementes e pulverização foliar em capim – marandu;
- Determinar incrementos no aparato fotossintético através da inoculação de capim-marandu com bactérias promotoras do crescimento.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Cenário das pastagens brasileiras

Diante da demanda por produtos de origem animal tem-se buscado cada vez mais, por alternativas tecnológicas que melhorem o sistema da produção do rebanho, de forma a possibilitar maior qualidade e produtividade (HOFFMANN *et al.*, 2014).

Tal fato tem contribuído ainda, para a busca e desenvolvimento de espécies forrageiras que sejam tolerantes ao estresse hídrico, ao ataque de pragas e doenças e que possuam elevado teor nutricional, melhorando assim, o desempenho animal, tendo em vista o aumento na quantidade e qualidade dos subprodutos (ZANUZO; MULLER; MIRANDA, 2010).

O Brasil se destaca frente à produção animal, por possuir o maior rebanho comercial do mundo e vem assumindo liderança no mercado mundial de carnes. Esta vantagem competitiva dentre os países, se dá pelas grandes extensões territoriais e condições edafoclimáticas que permitem a criação a pasto, que favorece o potencial para suprir a demanda mundial (RIBEIRO JÚNIOR, 2015).

A utilização sustentável das pastagens para alimentação de ruminantes deve ser de grande relevância, uma vez que este sistema de criação representa a principal e mais econômica forma de produção, garantindo assim, maiores lucros (DIAS-FILHO, 2016).

De acordo com este mesmo autor, aproximadamente 160 milhões de hectares de terra são ocupadas por pastagens naturais ou implantadas no Brasil, o que representa 20% de sua área agricultável. Essa vasta área de pastagem torna-se a base dos sistemas de produção de bovinos, de modo a fornecer os nutrientes necessários para o desenvolvimento do rebanho a baixo custo (SANTANA *et al.*, 2010).

Entretanto, a produtividade do rebanho brasileiro alcança patamares de baixos índices zootécnicos devido à falta de conhecimento quanto aos limites do manejo das forrageiras utilizadas nos sistemas de produção (RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2015).

A exploração extrativista da pecuária tem contribuído significativamente para a redução da qualidade e capacidade de suporte, tendo em vista o conseqüente aumento do processo de degradação das áreas de pastagens e conseqüentemente dos solos (COSTA; OLIVEIRA; FAQUIN, 2010).

O processo de degradação é favorecido pela falta de planejamento, uso excessivo das taxas de lotações, falha no estabelecimento, escolha inadequada da espécie para o local, não execução da adubação e manejo inadequado do solo (DIAS-FILHO, 2016).

Para obtenção de boa produtividade, persistência e qualidade da forragem, a escolha da espécie forrageira adequada deve ser fundamental de modo que esta, possua mecanismos capazes de se adaptar as condições edafoclimáticas relacionadas a região desejada (PEREIRA *et al.*, 2013).

Cerca de 80% das pastagens brasileiras são formadas por espécies do gênero *Urochloa* (ABRASEM, 2012), sendo a cultivar Marandu detentora de grande popularidade dentre os produtores (ZANUZO; MULLER; MIRANDA, 2010).

3.2 *Urochloa brizantha* cv. Marandu

O gênero *Brachiaria*, (Syn. *Urochloa*), pertence à tribo Paniceae; subfamília Panicoideae e família Poaceae e é constituído por aproximadamente 100 espécies (EMBRAPA, 1984). Possui seu centro de diversidade no continente Africano, e está difundida em várias regiões tropicais e sub-tropicais, tendo se adaptado às condições do Brasil e comumente utilizada no território nacional (SHIRASUNA, 2012).

Espécies deste gênero ocupam em torno de 77% das áreas de pastagens no Brasil (DIAS- FILHO, 2016). O grande interesse entre os pecuaristas por espécies deste gênero se deve a sua boa adaptabilidade, alta produção de matéria seca, facilidade no seu estabelecimento, facilidade de persistência, alto valor nutritivo, apresentam em geral, poucos problemas de doenças, além disso, possuem crescimento expressivo durante boa parte do ano (COSTA; FAQUIN; OLIVEIRA, 2006).

Devido às buscas por forrageiras cada vez mais adaptável às diversas condições de clima, solo e temperatura, bem como espécies de alto teor nutritivo e boa produtividade, o melhoramento genético de forrageiras tem ganhado força e contribuído para o lançamento de novas cultivares no mercado (EMBRAPA, 1984). Dentre eles, a cultivar Marandu foi introduzida em 1965, e desde então vem se destacando entre as mais utilizadas, por suas qualidades (EMBRAPA, 2008).

O capim-marandu, como é conhecido popularmente, é uma cultura perene, apresenta perfilhos eretos, é uma forrageira de crescimento cespitoso, atingindo entre 1,5 a 2,5 metros de altura, possui folhas pouco pilosas na face ventral e sem pilosidade na face dorsal, bainhas pilosas e inflorescências que atingem até 40 cm de comprimento, produzindo entre quatro e seis ráceros. A forrageira apresenta excelente palatabilidade, resistência ao pisoteio e elevado aporte de proteína (EMBRAPA, 1984). Apresenta sistema radicular vigoroso e profundo, por apresentar tolerância a deficiência hídrica, ao frio e ao sombreamento (BARDUCCI *et al.*, 2009), apresenta resistência ao ataque das cigarrinhas das pastagens e a redução do valor nutritivo ocorre de forma lenta, uma vez que seu florescimento é tardio (CABRAL *et al.*, 2016).

O capim-marandu adapta-se bem em solos de média a alta fertilidade (BARDUCCI *et al.*, 2009), o que requer investimento em adubação para manutenção dos nutrientes do solo e absorção pelas plantas (DIAS-FILHO, 2011). O nitrogênio é um dos nutrientes mais requeridos e que propiciam aumento expressivo na produção de gramíneas, pois é de grande importância no metabolismo celular (BÜLL, 1993).

3.3 Nitrogênio e clorofila

O nitrogênio (N) é o elemento mais abundante da atmosfera, contudo, a maior parte deste é encontrado na forma gasosa (N_2) não sendo possível sua absorção por plantas e animais, por ser estável, possui pouca tendência em reagir com outros elementos (HUNGRIA *et al.*, 2010). Além disso, é considerado o nutriente mais limitante para o crescimento das plantas, em seu ambiente comum, com exceção da água (FRANCO; DÖBEREINER, 1994).

Para que o nitrogênio seja assimilado e entrar na composição das plantas, este elemento deve estar na forma fixada, através da quebra da tripla ligação covalente existente entre os dois átomos de N, produzindo amônia (NH_3) ou nitrato (NO_3^-), a sua fixação pode ocorrer através de processos naturais, industriais ou através da ação biológica de microrganismos (TAIZ; ZIEGER, 2013).

Segundo estes mesmos autores, o nitrogênio é componente essencial nos vegetais, e responsável por várias reações químicas, além de compor biomoléculas como NADH, ATP, NADPH, clorofila, enzimas, proteínas e outros elementos secundários.

A clorofila é um pigmento associado a atividade fotossintética e ao estado nutricional das plantas (ZOTARELLI *et al.*, 2003). O parâmetro mais utilizado para determinação do nível de N na planta é o teor relativo de clorofila na folha, uma vez que tais fatores possuem correlação positiva entre si (BARBOSA FILHO *et al.*, 2009). Isso se deve ao fato de que cerca de 50 a 70% do N total das folhas, serem integrantes de enzimas associadas ao cloroplasto, que por sua vez, é uma organela rica em clorofila (CHAPMAN; BARRETO, 1997).

O suprimento e metabolismo do nitrogênio afeta ainda a capacidade fotossintética da planta, uma vez que parte deste nutriente é alocado em forma de proteínas que são ligadas à fotossíntese, nas folhas (CARELLI *et al.*, 1996). Além disso, o processo da fotossíntese é dependente de compostos nitrogenados como enzimas e pigmentos fotossintéticos, para que ocorra a produção de compostos de carbono que fazem a composição da planta (TAIZ; ZEIGER, 2013). Já nas raízes ocorre a importação dos carboidratos produzidos nas folhas, para que, após a metabolização, possam gerar energia e fornecer carbono para incorporação do nitrogênio em aminoácidos (OAKS; HIREL, 1985).

O processo de fotossíntese ocorre através da energia luminosa, que é absorvida pelas moléculas de clorofila e alteram sua configuração eletrônica. Este pigmento passa de seu estado fundamental para o estado excitado (mais alto nível energético). Em seguida esta energia absorvida é dissipada pelos pigmentos fotossintéticos de 3 maneiras: 1. Dissipação fotoquímica: utilização da energia luminosa para os processos fotoquímicos da fotossíntese, representada pelo *quenching* fotoquímico. 2. Dissipação não fotoquímica: produção de calor em radiação infravermelha, representado pela *quenching* não fotoquímico. 3. Fluorescência: é a emissão da radiação na região de luz visível (vermelho e vermelho distante), tais processos ocorrem de forma competitiva, uma vez que o aumento na eficiência de um, acarreta redução de outros dois. Desta forma, quando o rendimento quântico fotossintético é máximo, a fluorescência e a liberação de calor, são mínimas (BUSCHMANN; PREHN; LICHTENTHALER, 1994).

A mensuração dos parâmetros da fluorescência tem sido muito utilizada para análises da capacidade e qualidade fotossintética das plantas, uma vez que se destaca como método não destrutivo capaz de prever qualitativamente e quantitativamente a absorção e aproveitamento da energia luminosa (FONTES *et al.*, 2008).

De acordo com Maxwell; Johnson (2000) existe uma extensa opção de sinais utilizados para avaliação das variáveis das atividades fotossintéticas, sendo os sinais básicos da fluorescência da clorofila *a*; Eficiência no transporte de elétrons (ETR), Fluorescência inicial (F_0), Fluorescência máxima (F_m), Fluorescência variável (F_v), e a Razão entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima F_v/F_m , sendo comumente utilizados como indicadores de estresse nas plantas.

De acordo com Cassol; Falqueto; Bacarin (2007) a ETR representa o valor de elétrons transportados por m^2 em um intervalo de um segundo e é diretamente correlacionado à radiação fotossinteticamente ativa (RFA) incidente sobre a folha.

A F_0 reflete o estado da clorofila *a* do complexo antena, isto é, representa a medida da distribuição do elétron a caminho, entre a molécula da qual ele foi ejetado até a migração para o centro de reação fotossistema II (PSII) (BOLHÀR-NORDENKAMPF; ÖQUIST, 1993).

A F_m é atingida quando todos os centros de reação estão abertos, este estado é obtido aplicando-se um bloqueador do fluxo de elétrons do PSII (como o herbicida DIURON), ou através da adaptação da planta ao escuro por 30 minutos (PORTES, 1990).

A F_v é a diferença entre a F_m e F_0 , que é definida pela quantidade de pigmentos do PSII e se destaca por ser vulnerável ao fluxo de elétrons através dos centros de reações e às mudanças que ocorrem na estrutura da membrana dos tilacóides (GEORGIEVA; YORDANOV, 1993).

A razão entre a fluorescência máxima e a fluorescência variável (F_v/F_m) determina a eficiência quântica do transporte dos elétrons através do PSII (BACARIN; MOSQUIM, 2002).

Para Lu; Zhang (2000), a F_m e a F_v/F_m são influenciadas pela adubação nitrogenada em plantas de milho. Desta forma, a nutrição das plantas influencia o funcionamento do aparato fotossintético.

No entanto, o elevado custo com adubações nas pastagens, principalmente quando considerada as grandes extensões de área cultivada tem tornado a prática dispendiosa (CABRAL *et al.*, 2016).

Assim, tem-se buscado cada vez mais alternativas que minimizem os custos de produção, elevando o potencial produtivo da forragem de forma sustentável, como a utilização de bactérias promotoras do crescimento de plantas (LEITE *et al.*, 2018).

3.4 Utilização de microrganismos promotores de crescimento em plantas

Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) pertencem a um grupo de microrganismos de vida livre, que possuem a capacidade de se associarem a raízes de plantas, sendo comumente encontrados, no solo e na rizosfera, que podem ainda colonizar alguns ou uma grande parte de tecidos de plantas (GLICK, 2012).

A região próxima ao sistema radicular tem grande influência sobre a proliferação destes microrganismos, uma vez que ocorre liberação de compostos orgânicos que são disponibilizados para o meio por secreção, exsudação e deposição, podendo ser utilizados como fonte de carbono e energia para o crescimento microbiano, favorecendo e aumentando a associação planta-microrganismo (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003).

Em contrapartida, uma variedade de mecanismos realizados por estes microrganismos favorece o crescimento vegetal (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Dentre eles a disponibilização de nutrientes essenciais, através da solubilização de fosfato (ESTRADA *et al.*, 2013) a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007), a produção de sideróforos (LOACES; FERRANDO; SCAVINO, 2011) e a capacidade de produzir e liberar fitohormônios.

De acordo com Sobral (2003) estes mecanismos, regulados por microrganismos, podem fornecer benefícios de modo direto e indireto. Sendo os diretos relacionados ao aumento da concentração de nutrientes e os indiretos o favorecimento no controle biológico, através da competição entre microrganismos por nutrientes, resistência a doenças pela produção de substância que captam ferro, conhecidas como sideróforos e pela liberação de antibióticos.

Além disso, podem promover maior tolerância ao estresse hídrico pela capacidade de proporcionar aumento de raízes e formar biofilme em volta destas, aumentando a liberação de polímeros, como extracelulares, contendo oligossacarídeos e polissacarídeos que aumentam a capacidade de retenção de água (RUBIN; VAN GROENIGEN; HUNGATE, 2017).

Os principais gêneros bacterianos *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Agrobacterium* e *Azospirillum*, apresentam grande importância para interação microrganismo – planta, pois são capazes de promover o crescimento de plantas (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999).

3.4.1 *Azospirillum brasilense*

O gênero *Azospirillum*, pertence ao grupo de bactérias promotoras do crescimento vegetal e foi identificado por Joana Dobereiner na década de 70 (TARRAND; KRIEG; DÖBEREINER, 1978).

São microrganismos procariontes pertencentes à subclasse das α -Proteobactérias, que comporta uma gama de bactérias associativas. São bactérias gram-negativas, de vida livre e se apresenta amplamente distribuído sobre os solos tropicais e subtropicais (TARRAND; KRIEG; DÖBEREINER, 1978). Estas bactérias possuem formato de bastonete comumente uniflagelados de movimento vibratório (HALL; KRIEG, 1984).

Espécies do gênero *Azospirillum*, são capazes de colonizar a superfície de raízes e o interior de vegetais, através de processos variáveis quanto à espécie vegetal em questão, sendo, por isso, chamadas diazotróficas endofíticas facultativas (DÖBEREINER, 1992).

A colonização externa se dá no mucigel, formado pela liberação de exsudados, já a colonização interna, ocorre nos espaços intercelulares das raízes, mais especificamente na zona de alongação e pelos radiculares (DOBBELAERE *et al.*, 2002).

Dentre as bactérias encontradas na rizosfera de gramíneas o gênero de maior importância é o *Azospirillum*, tendo destaque para a espécie *Azospirillum brasilense*, que vêm sendo amplamente estudada, por ser facilmente encontrada e bem distribuída em solos tropicais e subtropicais (HARTMANN; BALDAM, 2006).

De acordo com Nehl, Allem e Brown (1996), para que a interação entre bactéria e hospedeiro seja positiva, as estirpes de *Azospirillum brasilense* utilizadas devem ser capazes de competir com outros microrganismos do solo. Além disso, a escolha do genótipo, para inoculação, deve ser levada em consideração, uma vez que a bactéria é atraída pelos exsudados radiculares, que têm composição variada de planta para planta.

Contudo, de acordo com Dobereiner (1977) o *A. brasilense* exibe resultados satisfatórios quando associado às plantas da família Poaceae como milho, aveia, trigo e arroz.

O *Azospirillum* ssp. atua no crescimento vegetal por diversos mecanismos, sendo capaz de produzir hormônios como auxinas (MASCIARELLI *et al.*, 2013), giberelinas (ESQUIVEL-COTE *et al.*, 2010); ácido abscísico (XU *et al.*, 2018) e citocininas (CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014) que atuam no crescimento e desenvolvimento das plantas.

No entanto, a capacidade de BPCV atuarem na regulação do crescimento de plantas foi descrita inicialmente há cerca de 40 anos, sendo atualmente descrito por técnicas modernas, que a produção de reguladores como auxinas e etileno por bactérias é uma característica comum enquanto que a produção de citocininas são menos comuns e a produção de giberelinas em altas concentrações foi descrito apenas para duas linhagens do gênero *Bacillus* sp. (SOLANO; MAICAS; MAÑERO, 2008).

De acordo com estes mesmos autores a produção e liberação de auxinas por estes microrganismos ainda não está bem evidenciada, alguns autores afirmam que esta capacidade advém do metabolismo relacionado ao triptofano e a biossíntese de auxinas funciona como alternativa de

desintoxicação. Outros autores, no entanto, propõem que auxinas possuem alguma função celular porque um claro relacionamento tem sido observado entre auxinas e os níveis de monofosfato adenosina cíclico (AMPC), o qual regula uma série de processos metabólicos.

Bactérias do gênero *Azospirillum* têm capacidade de assimilar o nitrogênio atmosférico e transformá-lo em NH₃, através do complexo da nitrogenase (REPKE *et al.*, 2013). Este processo fornece nitrogênio para plantas de forma direta, por meio das associações bactérias-raízes, ou de forma indireta, através da morte dos organismos, liberando o nutriente no ambiente (LINDERMANN; GLOVER, 2003). Assim, o N fornecido através da fixação biológica é menos inclinado a lixiviação e volatilização, uma vez que este elemento é utilizado *in situ*, tornando-se um meio alternativo, de forma limpa e sustentável para o fornecimento de N para culturas comerciais (HUERGO, 2006).

Segundo Campos *et al.* (2003), a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) em leguminosas é facilmente caracterizada pela formação de nódulos nas raízes, realizada pela penetração e colonização das bactérias fixadoras. No entanto, para estes mesmos autores, em gramíneas, não há ocorrência da formação de nódulos, sendo a caracterização e avaliação deste processo, realizada pela observação de parâmetros que indicam a capacidade da planta de crescer e acumular o nitrogênio.

Leite *et al.* (2018) avaliando produtividade do capim – marandu inoculados com *Azospirillum brasilense*, associados a diferentes doses de nitrogênio, em diferentes épocas do ano, destacaram que a inoculação favoreceu maior produção de biomassa e desenvolvimento de raízes no período da seca. Destacaram ainda que, a inoculação pode se apresentar como alternativa viável para minimizar impactos causados pela deficiência hídrica e degradação das pastagens brasileiras, sendo possível obter redução estimada de 20% na necessidade de fertilizante nitrogenado, no capim– marandu, inoculado com *Azospirillum brasilense*.

Guimarães *et al.* (2011) observaram incrementos de 9% e 12% para número de folhas e número de perfilhos respectivamente, em plantas de capim-marandu inoculados com *Azospirillum brasilense*.

Esquivel-Cote *et al.* (2010) destacaram ainda a capacidade desses microrganismos de estimular a atividade da enzima ACC - deaminase, para degradar o ácido 1-carboxílico-1-amino ciclopropano (ACC), e utilizar este ácido em seu metabolismo, promovendo a redução dos níveis de etileno na planta em que se encontra associado. A redução do etileno por sua vez, acarreta na redução da senescência dos tecidos vegetais, provocando longevidade celular (IQBAL *et al.*, 2017).

Azospirillum brasilense pode ainda, influenciar de forma indireta no desenvolvimento dos vegetais, através da supressão de patógenos, provocada pela produção de sideróforos e antibióticos (ASGHAR *et al.*, 2002).

3.4.2 Gênero *Bacillus*

O gênero é formado por bactérias gram positivas, presentes em todo o ambiente de forma isolada ou em cadeia, podendo ser anaeróbias facultativas ou aeróbias móveis (QUINN *et al.*, 2005). O gênero é composto por um vasto número de espécies com capacidade de produzir esporos, com até 10 mm de comprimento, o que lhes confere característica de adaptação e resistência, sendo tolerantes às condições adversas (VON STETTEN; MAYR; SCHERER, 1999).

A maioria das espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* spp. são microrganismos ambientais e não patogênicos (QUINN *et al.*, 2005), sendo utilizados amplamente no controle biológico (SCHNEPF *et*

al., 1998), como BPCV (ARAÚJO, 2008), como probióticos (ELSHAGHABEE *et al.*, 2017), como solubilizadores de fosfato (ZUCARELI, *et al.*, 2018) e como fermentadores alimentícios (TAMANG; WATANABE; HOLZAPFEL, 2016).

Estes microrganismos têm a capacidade de solubilizar e mineralizar o fósforo de fontes orgânicas e inorgânicas e serem usados como inoculantes visando o aumento da disponibilidade do fósforo para as plantas (RICHARDSON, 2001). Os microrganismos solubilizadores de fosfatos desempenham papel importante na liberação de formas inorgânicas de fósforo (Ca-P, Al-P e Fe-P), aumentando o teor deste nutriente na solução do solo, o que propicia melhor crescimento e maior rendimento das plantas (GOMES *et al.*, 2017).

Araujo, Guaberto e Silva (2012) observaram que a produção de auxinas e fosfatases pela inoculação de *Bacillus* sp. nas sementes de *U. brizantha*, foi relevante para promover o crescimento das plantas. Enquanto que Szilagyi-Zecchin *et al.* (2015), avaliando cepas distintas de *Bacillus* isoladas de milho observaram aumento de raiz e taxa de germinação em 39% e 56% respectivamente, além de promoverem alta produção de ácido indolacético (AIA).

As bactérias deste gênero não são tidas como diazotróficas, (MANRIQUE *et al.*, 2019) no entanto, autores têm destacado incremento significativo no teor de nitrogênio, quando se utiliza a inoculação com *Bacillus* sp. (AMIR *et al.*, 2003; ARAÚJO, 2008; ANDRADE *et al.*, 2014).

Desta forma, a inoculação de pastagens utilizando bactérias promotoras do crescimento vegetal, além proporcionar incrementos na produtividade a um menor custo, garante a sustentabilidade do ambiente (LEITE *et al.*, 2018).

4 REFERÊNCIAS

- AMIR, H. G.; SHAMSUDDIN, Z. H.; HALIMI, M. S.; RAMLAN, M. F.; MARZIAH, M. N₂ fixation, nutrient accumulation and plant growth promotion by rhizobacteria in association with oil palm seedlings. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 6, p. 1269-1272, 2003. Doi: <https://doi.org/10.3923/PJBS.2003.1269.1272>
- ANDRADE, L. F.; SOUZA, GLOD; NIETSCH, S.; XAVIER, AA; COSTA, MR; CARDOSO, AM; PEREIRA, MC; PEREIRA, DF Análise das habilidades das bactérias endofíticas associadas às raízes das bananeiras para promover o crescimento das plantas. **Journal of Microbiology**, Heidelberg, v.52, n.1, p.27-34, 2014.
- ARAÚJO, F.F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis* formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 456-462, 2008. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542008000200017>.
- ARAUJO, F. F.; GUABERTO, L. M.; SILVA, I. F. Bioprospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em *Brachiaria brizantha*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 3, p. 521-527, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000300007>
- ASGHAR, H. N.; ZAHIR, Z. A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, n.4, p. 231-237, 2002. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-002-0462-8>
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS – Abrasen. Produção anual de sementes de *Brachiaria* sp no Brasil, 2012. Disponível em: <http://www.abrasem.com.br>. Acesso em: 11 abr. 2018.
- BACARIN, M. A.; MOSQUIM, P. R. Cinética de emissão da fluorescência das clorofilas de dois genótipos de feijoeiro. **Ciência Agrotécnica**, v. 26, n. 4, p. 705-710, 2002. Disponível em: file:///C:/Users/usuario/Downloads/26-4-2002_05.pdf. Acesso em: 19 nov. 2019.
- BARBOSA FILHO, M. P.; COBUCCI, T.; FAGERIA, N. K.; MENDES, P. N. Época de aplicação de nitrogênio no feijoeiro irrigado monitorada com auxílio de sensor portátil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 2, p. 425-431, 2009. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542009000200010>
- BARDUCCI, R. S.; COSTA, C.; CRUSCIOL, C. A. C.; BORGHI, É.; PUTAROV, T. C.; SARTI, L. M. N. Produção de *Brachiaria brizantha* e *Panicum maximum* com milho e adubação nitrogenada. **Archivos de zootecnia**, v. 58, n. 222, p. 211-222, 2009. Disponível em: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-05922009000200006. Acesso em: 7 jan. 2020.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Azospirillum: plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 103-121, 1997. Doi: <https://doi.org/10.1139/m97-015>
- BASSO, K. C.; CECATO, U.; LUGÃO, S. M. B.; GOMES, J. A. N.; BARBERO, L. M.; MOURÃO, G. B. Morfogenese e dinâmica do perfilhamento em pastos de *Panicum maximum* Jacq. cv. IPR-86 Milênio submetido a doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.11, n.4, p. 976-989, 2010. Disponível em: <http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/1787/1024>. Acesso em: 26 nov. 2020.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; ÖQUIST, G. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL, D. O., SCURLOCK, J. M. O.; BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; LEEGOND, R. C.; LONG, S. P. (org.). **Photosynthesis an Production in a Changing Environment**: a field and laboratory manual. London: Chapman & Hall, 1993. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-1566-7_12. Acesso em: 7 jan. 2020
- BÜLL, L.T. **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p.148-196.

BUSCHMANN, C.; PREHN, H.; LICHTENTHALER, H. Photoacoustic spectroscopy (PAS) and its application in photosynthesis research. **Photosynthesis Research**, v. 5, p. 29-46, 1994. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF00018373>

CABRAL, C. E. A.; SILVA CABRAL, L. da; BONFIM-SILVA, E. M.; CARVALHO, K. dos S.; KROTH, B. E.; CABRAL, C. H. A. Resposta da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu a fertilizantes nitrogenados associados ao fosfato natural reativo. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 7, n. 1, p. 66, 2016. Doi: <https://doi.org/10.14295/CS.v7i1.964>

CAMPOS, D. V. B.; RESENDE, A. S.; ALVEZ, B. J.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura de arroz sob inundação. **Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 41-46, 2003. Disponível em: http://www.ia.ufrj.br/ra/artigos/38_57.pdf. Acesso em: 7 jan. 2020.

CARELLI, M. L. C.; UNGARO, M. R. G.; FAHL, J. I. E.; NOVO, M. C. S.S. Níveis de nitrogênio, metabolismo, crescimento e produção de girasol. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, n. 2, p. 123-130, 1996.

CARNEIRO, J. S. S.; SILVA, P. S. S.; SANTOS, A. C. M.; FREITAS, G. A.; SILVA, R. R. Resposta do capim mombaça sob efeito de fontes e doses de fósforo na adubação de formação. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 4, n. 1, p. 12-25, 2017. Doi: <https://doi.org/10.18067/jbfs.v4i1.117>

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal Plant Growth Regul**, v. 33, p. 440-459, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9362-4>

CASSOL, D.; FALQUETO, A. R.; BACARIN, M. A. Influência da adubação nitrogenada nas características da fluorescência da clorofila em arroz. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 573-575, 2007. Disponível em: <file:///C:/Users/usuario/Downloads/501-2354-2-PB.pdf>. Acesso em: 7 jan. 2020.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M. P. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. phaseoli. **Plant and Soil**, v. 184, p. 311-321, 1996. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00010460>. Acesso em: 7 jan. 2020.

CHAPMAN, S. C.; BARRETO, H. J. Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth. **Agronomy Journal**, v. 89, n. 4, p. 557-562, 1997.

COSTA, K. A. P.; OLIVEIRA, I. P.; FAQUIN, V. **Adubação nitrogenada para pastagens do gênero *Brachiaria* em solos do Cerrado**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006, p. 22. Disponível em: < <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/215338/1/doc192.pdf> > Acesso em 09 de janeiro de 2020.

COSTA, K. A. P.; FAQUIN, V.; OLIVEIRA, I. P. Doses e fontes de nitrogênio na recuperação de pastagens do capim-marandu. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 1, p. 192-199, 2010. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352010000100026>

DIAS-FILHO, M. B. Os desafios da produção animal em pastagens na fronteira agrícola brasileira. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 243-252, 2011.

DIAS-FILHO, M. B. **Uso de pastagens para a Produção de Bovinos de Corte no Brasil: passado, presente e futuro**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2016. p. 418. (Documentos/Embrapa Amazônia Oriental). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1042092/1/DOCUMENTOS418.pdf>. Acesso em: 2 jan. 2020.

DIAS-FILHO, M. B. **Manejo profissional da pastagem: fundamento para uma pecuária empresarial**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2017. p. 32. (Documentos / Embrapa Amazônia Oriental, 431). Disponível em: <file:///C:/Users/usuario/Downloads/DOCUMENTOS-431-OnLine.pdf>. Acesso em: 3 jan. 2020.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; TRYS, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36, p. 284-297, 2002. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00374-002-0534-9>. Acesso em: 9 jan. 2020.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003. Doi: <https://doi.org/10.1080/713610853>

DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 6, p. 771-774, 1997. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00226-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00226-X)

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interaction: endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, v. 44, p. 310-313, 1992. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19930766844>. Acesso em: 9 jan. 2020.

ELSHAGHABEE, F. M. F.; ROKANA, N.; GULHANE, R. D.; SHARMA, C.; PANWAR, H. *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future Perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1490, 2017. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490>

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Brachiaria brizantha cv. Marandu**. Campo Grande, MS: Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, 1984. 31p. (EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 21). Disponível em: <https://www.embrapa.br/gado-de-corte/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/863/brachiaria-brizanthacv-marandu>. Acesso em: 2 jan. 2020.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Marandu**. Campo Grande, MS: Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, 2008. Disponível em: <http://www.cnpqg.embrapa.br/produtoseservicos/pdf/marandu.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2019.

ESQUIVEL-COTE, R.; RAMÍREZ-GAMA, R. M.; TSUZUKI-REYES, G.; OROZCO-SEGOVIA, A.; HUANTE, P. *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency. **Plant and Soil**, v. 337, n. 1-2, p. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-010-0499-7>. Acesso em: 9 jan. 2020.

ESTRADA, G. A.; BALDANI, V. L. D.; OLIVEIRA, D. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 369, p. 115-129, 2013. Disponível em: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/599391>. Acesso em: 9 jan. 2020.

FONTES, R. V.; SANTOS, M. P.; FALQUETO, A. R.; SILVA, D. M. Atividade da redutase do nitrato e fluorescência da clorofila a em mamoeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 251-254, 2008. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452008000100046>

FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathológica**, Jaguariuna, SP, v. 20, n. 1, p. 68-74, 1994.

FUKAMI, J.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. 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**, v.7, p.153-163, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0453-7>

GEORGIEVA, K.; YORDANOV, I. Temperature dependence of chlorophyll fluorescence in pea thylacoid membranes. **Journal Plant Physiology**, 142, p. 151-155, 1993. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80955-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80955-7)

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1-15, 2012. Doi: <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>

GOMES, I. P.; MATOS, A. D. M.; NIETSCHKE, S.; XAVIER, A. A.; COSTA, M. R.; GOMES, W. S.; PEREIRA, M. C. T. Auxin Production by Endophytic Bacteria Isolated from Banana Trees. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2017160484>

GUIMARÃES, S. L.; BONFIM-SILVA, E. M.; KROTH, B. E.; MOREIRA, J. C. F.; REZENDE, D. Crescimento e desenvolvimento inicial de *Brachiaria decumbens* inoculada com *Azospirillum* spp. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 13, pp. 286-296, 2011. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2011b/ciencias%20agrarias/crescimento%20e%20desenvolvimento.pdf>. Acesso em: 9 jan. 2020.

HALL, P.G.; KRIEG N.R. Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasiliense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 433-435, 1984. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239690/>. Acesso em: 9 jan. 2020.

HARTMANN, A.; BALDAM, J. I. The genus *Azospirillum*. In: DWORKIN, M. et al. (org.). **The Prokaryotes**. New York: Springer, 2006. p.115-140. Disponível em: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F0-387-30745-1_6. Acesso em: 9 jan. 2020.

HOFFMANN, A.; MORAES, E. H. B. K.; MOUSQUER, C. J.; SIMIONI, T. A.; JUNIOR GOMES, F.; FERREIRA, V. B.; SILVA, H. M. Produção de bovinos de corte no sistema pasto-suplemento no período seco. **Pesquisas Agrárias e Ambientais**, v. 2, n. 2, p. 119-130, 2014. Doi: <http://dx.doi.org/10.14583/2318-7670.v02n02a10>

HUERGO, L. F. **Regulação do metabolismo do nitrogênio em *Azospirillum brasiliense***. 2006. 170 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/4643>. Acesso em: 9 jan. 2020.

HUNGRIA, M., CAMPO, R. J., SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasiliense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1, p. 413-425, 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-009-0262-0>. Acesso em: 9 jan. 2020.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos; 283). Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/564908/a-importancia-do-processo-de-fixacao-biologica-do-nitrogenio-para-a-cultura-da-soja-componente-essencial-para-a-competitividade-do-produto-brasileiro>. Acesso em: 2 jan. 2020.

IQBAL, N.; KHAN, N. A.; FERRANTE, A.; TRIVELLINI, A.; FRANCINI, A.; KHAN, M. I. R. Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. **Frontiers in plant science**, v. 8, n. April, p. 475, 2017. Doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00475>.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Plant growth- promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions [Potatos, radishes]. **Phytopathology**, 1981.

LEITE, R. D. C., SANTOS, J. G., SILVA, E. L., ALVES, C. R., HUNGRIA, M., LEITE, R. D. C., SANTOS, A. C. Productivity increase, reduction of nitrogen fertiliser use and drought-stress mitigation by inoculation of Marandu grass (*Urochloa brizantha*) with *Azospirillum brasiliense*. **Crop and Pasture Science**, v. 70, n. 1, p. 61-67, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1071/CP18105>

LINDERMANN, W. C.; GLOVER, C. R. **Nitrogen fixation by legumes**. Cooperative Extension Service – College of Agriculture and Home Economics. Guide A-129, 2003, 4 p. Disponível em: <https://www.yumpu.com/en/document/view/29290614/nitrogen-fixation-by-legumes-college-of-agricultural-consumer->. Acesso em: 9 jan. 2020.

LOACES, I.; FERRANDO, L.; SCAVINO, A. F. Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice. **Microbial Ecology**, v. 61, p. 606-618, 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-010-9780-9>. Acesso em: 7 jan. 2020.

LU, C.; ZHANG, J. Photosynthetic CO₂ assimilation, chlorophyll fluorescence and photoinhibition as affected by nitrogen deficiency in maize plants. **Plant science**, v. 151, p. 135-143, 2000. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-9452\(99\)00207-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-9452(99)00207-1)

MANRIQUE, A. E. R., MAZZUCHELLI, R. D. C. L., ARAUJO, A. S. F.; ARAUJO, F. F. D. Condicionamento e revestimento de sementes de *Urochloa brizanta* associados à inoculação com *Bacillus subtilis*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, 2019. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632019v49i5a536>

MASCIARELLI, O.; URBANI L.; REINOSO, H.; LUNA, V. Alternative Mechanism for the Evaluation of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Production by *Azospirillum brasilense* Strains and Its Effects on the Germination and Growth of Maize Seedlings. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 590-597, 2013. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-013-3136-3>

MAXWELL, K. JOHNSON, G. M. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659–668, 2000. Doi: <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>.

NEHL, D. B.; ALLEM, S. J.; BROWN, J. F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, v. 5, p. 1-20, 1996. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(96\)00124-2](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(96)00124-2)

OAKS, A; HIREL, B. Nitrogen metabolism in roots. **Annual Review of Plants Physiology**, v. 36, p. 345-365, 1985. Doi: <https://doi.org/10.1146.annurev.pp.36.060185.002021>.

PEREIRA, D. N.; OLEIVEIRA, T. C.; BRITO, T. E.; AGOSTINI, J. A. F.; LIMA, P. F.; SILVA, A. V.; SANTOS, C. S.; BREGAGNOLI, M. Diagnóstico e recuperação de áreas de pastagens degradadas. **Revista Agrogeoambiental**, n. 1, p. 49-53, 2013. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/d28f/9cecca59e8e84ce33ca5dd97f5748bde502a.pdf>. Acesso em: 9 jan. 2020.

PORTES, T. A. **A emissão de fluorescência pela clorofila a e o balanço de O₂ como parâmetros de determinação da variabilidade genética condicionante da produtividade em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1990. 89f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/314863/1/Portes_TomasdeAquino_D.pdf. Acesso em: 18 nov. 2019.

QUINN P. J.; MARKEY B. K.; CARTER, M. E., DONNELLY, W. J. C., LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

REPKE, R. A.; CRUZ, S. J. S.; SILVA, C. J.; FIGUEIREDO, P. G.; BICUDO, S. J. Eficiência da *Azospirillum brasilense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 12, n. 3, p. 214-226, 2013. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/104518/1/Eficiencia-Azospirillum.pdf>. Acesso em: 9 jan. 2020.

RIBEIRO JÚNIOR, M. R.; CANAVER, A. B.; RODRIGUES, A. B.; DOMINGUES NETO, F. J.; SPERS, R. C. Desenvolvimento de *brachiaria brizantha* cv. Marandú submetidas a diferentes tipos de adubação (química e orgânica). **UNIMAR CIÊNCIAS**, v. 24, n. 1, p. 49-53, 2015. Disponível em: <http://ojs.unimar.br/index.php/ciencias/article/view/463/197>. Acesso em: 9 jan. 2020.

RICHARDSON, A.E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 897-906, 2001. Doi: <https://doi.org/10.1071/PP01093>

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319-339, 1999. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)

RUBIN, R. L.; VAN GROENIGEN, K. J.; HUNGATE, B. A. Plant growth promoting rhizobacteria are more effective under drought: a meta-analysis. **Plant and Soil**, v. 416, p. 309–323, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-017-3199-8>. Acesso em: 9 jan. 2020.

- SANTANA, G. S.; BIANCHI, P. P. M.; MORITA, I. M.; ISEPON, J. O.; FERNANDES, F. M. Produção e composição bromatológica da forragem do capim-mombaça (*Panicum maximum* Jacq.), submetidos a diferentes fontes e doses de corretivo de acidez. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 241-246, 2010. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/3e7b/4791df44fb0e55fcfa3cf13a714618af270.pdf>. Acesso em: 9 de jan. 2020.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VANRIE, J.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 62, p. 775–806, 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98934/>. Acesso em: 7 jan. 2020.
- SHIRASUNA, R. T. *Homolepis*. In: FORZZA, R. C.; STEHMANN, J. R.; NADRUZ (org.), M. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB013262>. Acesso em: 6 jul. 2018.
- SILVA, D. R. G.; COSTA, K. A. P.; FAQUIN, V.; OLIVEIRA, I. P.; BERNARDES, T. F. Doses e fontes de nitrogênio na recuperação das características estruturais e produtivas do capim- marandu. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 44, n. 1, p. 184-191, 2013.
- SOBRAL, J. K. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta**. Piracicaba: ESALQ, 2003. 174 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura — Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-24052004-154815/publico/julia.pdf>. Acesso em: 9 jan. 2020.
- SOLANO, B. R.; MAICAS, J. B.; MAÑERO, F. J. G. Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). In: AHMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. (eds.). **Plant-bacteria interactions: strategies and techniques to promote plant growth**. Weinheim, Germany: Wiley, 2008. p. 41-52.
- SZILAGYI-ZECCHIN, V. J.; MÓGOR, Á. F.; RUARO, L.; RÖDER, C. Crescimento de mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) estimulado pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 em cultura orgânica. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 1, p. 26-33, 2015. Disponível em: http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?pid=S0871-018X2015000100005&script=sci_arttext&tling=es. Acesso em: 7 jan. 2020.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre, Artmed, 2013. 719 p.
- TAMANG, J. P.; WATANABE, K.; HOLZAPFEL, W. H. Review: diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p. 377, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4805592/>. Acesso em: 9 jan. 2020.
- TARRANT, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. 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**, v. 24, p. 967-980, 1978. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/600745/1/AtaxonomicstudyoftheSpirillumlipoferumgroup.pdf>. Acesso em: 9 jan. 2020.
- TORRES, J. L. R.; ASSIS, R. L.; LOSS, A. Evolução entre os sistemas de produção agropecuária no Cerrado: convencional, Barreirão, Santan Fé e Integração Lavoura- Pecuária. **Informe Agropecuário**, v. 39, n. 302, p. 7-17, 2018. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/329451274>. Acesso em: 14 mar. 2020.
- VON STETTEN, F.; MAYR, R.; SCHERER, S. Climatic influence on mesophilic *Bacillus cereus* and psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* populations in tropical, temperate and alpine soil. **Environmental Microbiology**, v. 1, p. 503–515, 1999. Doi: 10.1046/j.1462-2920.1999.00070.x

XU, Q.; PAN, W.; ZHANG, R.; XUE, Q. L. W.; WU, C.; SONG, B.; DU, S. Inoculation with *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* produces abscisic acid that reduces IRT1-mediated cadmium uptake of roots. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 20, p. 5229-5236, 2018. Doi: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00598>

ZANUZO, M. R.; MULLER, D.; MIRANDA, D. M. Análise de sementes de capim braquiária (*Brachiaria brizantha* cv. marandú) em diferentes épocas de florescimento. **Uniciências**, v. 14, n. 2, 2010. Doi: <https://doi.org/10.17921/1415-5141.2010v14n2p%25p>

ZOTARELLI, L.; CARDOSO, E. G.; PICCININ, J. L.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; TORRES, E.; ALVES, B.J.R. Calibration of a Minolta SPAD-502 chlorophyll meter for evaluation of the nitrogen nutrition of maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 1117–1122, 2003. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2003000900014>

ZUCARELI, C.; BARZAN, R. R.; SILVA, J. B. D.; CHAVES, D. P. Associação de fosfatos e inoculação com *Bacillus subtilis* e seu efeito no crescimento e desempenho produtivo do feijoeiro. **Revista Ceres**, v. 65, n. 2, p. 189-195, 2018. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201865020011>

5 ARTIGO

5.1 Sinergismo entre *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* sp. no capim- marandu promove incremento na produtividade e modulações fisiológicas

O presente artigo encontra-se de acordo com as diretrizes da revista Journal of Plant Growth Regulation

RESUMO

O sinergismo entre bactérias promotoras do crescimento vegetal podem contribuir para promover aumento na produtividade das pastagens e beneficiar o aparato fotossintético de forma sustentável. Objetivou-se com este trabalho avaliar as características produtivas e fisiológicas do capim-marandu, inoculado com *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* sp. nas sementes e via pulverização foliar. O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento em blocos casualizados em fatorial $3 \times 2 + 1$. Foram avaliadas a inoculação isolada de *A. brasilense*, *Bacillus* sp. e o Mix de *A. brasilense* e *Bacillus* sp. e duas formas de inoculação (via sementes e via pulverização) mais uma testemunha adicional. Foram avaliadas altura de plantas, número de perfilhos (NPER), número de folhas (NF), massa seca (MS), teor de clorofila, taxa fotossintética, fluorescência da clorofila *a*, comprimento de raiz (COMPR) e massa seca de raiz (MSR). Foram observados incrementos quanto a altura de plantas, NPER, NF, MS e taxa fotossintética quando as plantas foram inoculadas com o mix, independente da forma de inoculação. O mix promoveu aumento no aproveitamento de elétrons no fotossistema II (PSII) e menor estresse observado pela razão entre a fluorescência variável e fluorescência máxima da clorofila (F_v/F_m). Já o teor de clorofila, o comprimento de raiz (COMPR) e massa seca de raiz (MSR), foram maiores para os tratamentos inoculados com o mix nas sementes. A utilização do mix inoculado no capim-marandu, apresenta-se como alternativa sustentável para o aumento da biomassa de forragem e provoca modulações no aparato fotossintético, mitigando estresse pela deficiência de nitrogênio.

Palavras-chave: Bactérias promotoras de crescimento vegetal. *Urochloa brizantha*. Fluorescência da clorofila. Fotossíntese. Produção.

ABSTRACT

The synergism between bacteria that promote plant growth can contribute to promote increased productivity of pastures and benefit the photosynthetic apparatus in a sustainable way. The objective of this work was to evaluate the productive and physiological characteristics of marandu grass, inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Bacillus* sp. in the seeds and via foliar spray. The experiment was conducted in a greenhouse in a randomized block design in a 3 x 2 + 1 factorial. Isolated inoculation of *A. brasilense*, *Bacillus* sp. and the Mix of *A. brasilense* and *Bacillus* sp. and two forms of inoculation (via seeds and via spray) plus an additional control. Plant height, number of tillers (NPER), number of leaves (NF), dry matter (DM), chlorophyll content, photosynthetic rate, chlorophyll a fluorescence, root length (COMPR) and root dry weight were evaluated (MSR). Increments were observed for plant height, NPER, NF, MS and photosynthetic rate when the plants were inoculated with the mix, regardless of the form of inoculation. The mix promoted an increase in the use of electrons in photosystem II (PSII) and less stress observed by the ratio between variable fluorescence and maximum chlorophyll fluorescence (Fv / Fm). The chlorophyll content, root length (COMPR) and root dry mass (MSR), were higher for treatments inoculated with the mix in the seeds. The use of the inoculated mix in marandu grass is a sustainable alternative for increasing the forage biomass and causes modulations in the photosynthetic apparatus, mitigating stress due to nitrogen deficiency.

Keywords: Plant growth promoting bacteria. *Urochloa brizantha*. Chlorophyll fluorescence. Photosynthesis. Production.

INTRODUÇÃO

O solo é constituído dentre outros componentes, por uma diversidade de microrganismos que formam uma complexa teia de interações. A biodiversidade de microrganismos existente é possível pelas interações benéficas e ou prejudiciais sobre as populações. Nas quais, as benéficas promovem efeito estimulante ao crescimento de outros microrganismos e as prejudiciais, acarretam na inibição do crescimento ou morte (Grobkopf e Soyer, 2014).

De acordo com este mesmo autor, dentro da comunidade bacteriana as interações são competitivas, quando duas ou mais espécies consomem os mesmos recursos, e cooperativas, quando os metabólitos produzidos por uma espécie são consumidos por outra. A protocooperação, por sua vez, é um termo utilizado para determinar interação positiva, intra ou interespecífica, na qual uma espécie se beneficia da presença de outra, no entanto, a ausência de um deles, não atrapalha o crescimento de outra. Sendo, portanto, facultativa.

Além das interações existentes dentro das comunidades bacterianas, estes microrganismos podem interagir com as plantas de forma negativa, causando patogenicidade, de forma neutra, sem causar nenhum efeito aos vegetais no ambiente, ou ainda, de forma positiva, liberando extracelulares que contribui para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Philippot *et al.* 2013).

Espécies do gênero *Azospirillum* e *Bacillus*, são conhecidas por proporcionarem maior desenvolvimento de plantas devido a fixação do nitrogênio atmosférico (Andrade *et al.* 2014; Hungria *et al.* 2010) produção e liberação de hormônios vegetais (Fukami *et al.* 2017; Matos *et al.* 2017), solubilização de fosfatos inorgânicos (Gomes *et al.* 2017; Rodriguez *et al.* 2004), contribuindo para o aumento da produtividade.

Tem sido observado ganhos produtivos em pastagens brasileiras, especialmente em braquiárias, inoculadas com bactérias promotoras do crescimento, e mitigação do estresse causado pelo longo período de estiagem, além de contruir de forma sustentável para redução da necessidade de fertilizantes nitrogenados e redução da degradação das pastagens (Fukami *et al.* 2017; Leite *et al.* 2018).

A inoculação conjunta de espécies de BPCV pode promover aumentos produtivos através do sinergismo existente entre bactérias, aumentando a disponibilidade de nutrientes essenciais às plantas e promovendo maior taxa fotossintética.

Wani *et al.* (2007) destacaram que a aplicação conjunta de bactérias fixadoras de nitrogênio e bactérias solubilizadoras de fosfato, em grão de bico, pode se apresentar como recurso biológico eficaz para o desenvolvimento de bioinoculantes econômicos, por proporcionarem maior rendimento de sementes e aumento no teor de proteína dos grãos.

A utilização destas bactérias em sementes representa grande interesse econômico, havendo a necessidade de avaliação quanto aos efeitos da aplicação via pulverização foliar, que poderia impulsionar efeitos produtivos, devido a sua inoculação *in loco*, uma vez que tais bactérias têm a capacidade de colonizar a rizosfera e promover resultados inclusive na parte aérea (Tortora *et al.* 2012).

Desta forma, teve-se como objetivo avaliar plantas de capim-marandu inoculadas com *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* sp. nas sementes e através da pulverização foliar, quanto à produção e a fotossíntese.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização do Experimento

O trabalho foi conduzido no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA-UFMG), localizado no município de Montes Claros. O município está situado no Norte do Estado de Minas Gerais a 650 m de altitude, e nas coordenadas geográficas de 16°43'S e 43°53'W. O clima da região é do tipo Aw,

megatérmico, com inverno seco e verão chuvoso (Alvares *et al.* 2013). A precipitação média anual é de 1.060 mm e a temperatura média é de 24,2°C.

Microrganismos Utilizados

As células bacterianas do gênero *Bacillus* sp., utilizadas no estudo pertencem à coleção do laboratório de Fitopatologia da Unimontes. Foi isolada e identificada por Souza *et al.* (2013) e a avaliação do seu potencial biotecnológico *in vitro* foi realizada por Andrade *et al.* (2014), Matos *et al.* (2017) e Gomes *et al.* (2017), sendo selecionado o isolado EB 40 (*Bacillus* sp.). Já as células de *Azospirillum brasilense*, foram isoladas do produto comercial Masterfix gramíneas que contém as estirpes Ab-V5 e Ab-V6, com potencial biotecnológico evidenciado por Fukami *et al.* (2017) e Hungria (2011).

Tabela 1 – Caracterização das espécies utilizadas no ensaio de bioinoculação no capim-marandu, Montes Claros, MG, 2019

ESPÉCIE	HABILIDADES
<i>Bacillus</i> sp. (EB-40/GQ340516.1)	FBN, AIA, SFI
<i>Azospirillum brasilense</i>	FBN, AIA

Nota: Potencial biotecnológico das espécies quanto a FBN – Fixação biológica de nitrogênio –, AIA – Produção e liberação de ácido indolacético – e SFI – Solubilização de fosfatos inorgânicos –.

Efeito antagonista de *Bacillus* sp. sobre *Azospirillum brasilense* em disco de difusão

O efeito antagonístico do crescimento dessas bactérias benéficas foi verificado pelo método descrito por Tagg e Mc Given (1971). A cultura pura do *Azospirillum brasilense*, em fase exponencial, foi inoculada em toda a superfície de uma placa 90 x 150 mm contendo meio dygs sólido (Rodrigues Neto et al. 1986).

Após 24 e 48 horas de crescimento em placa a 30°C, discos de papel de filtro com 6 mm de diâmetro, impregnados com 0,01 mL do inóculo contendo *Bacillus* sp., foram aplicados sobre a superfície da placa.

O mesmo foi realizado utilizando placas contendo meio dygs sólido, e inoculadas com a cultura pura do *Bacillus* sp.. No mesmo dia da inoculação em placa, discos de papel de filtro com 6 mm de diâmetro, impregnados com o caldo dygs contendo isolados de *Azospirillum brasilense* cultivadas durante 48 horas a 30°C, foram aplicados sobre a superfície da placa contendo o meio sólido.

Para os dois testes de avaliação do efeito antagonista, após o período de incubação de 24 horas e 30°C, foi verificada a presença ou ausência de halos de inibição, bem como a mensuração dos diâmetros dos halos produzidos de acordo com Santos (1984). Esse autor classifica como muito forte as zonas de inibição de 20 a 25 mm de diâmetro; inibição forte entre 15 a 19 mm, moderada entre 11 a 14 mm; fraca entre 9 a 10 mm; e nenhuma inibição, menor que 9 mm.

Os testes foram realizados em triplicata.

Efeito antagonista de isolados de *Bacillus* sp. contra *Azospirillum brasilense* por efeito cruzado

O teste de inibição foi realizado de acordo com Mohammadou et al. (2014), inoculando-se uma única estria da cepa em uma placa de meio dygs sólido contendo púrpura de bromocresol (0,02 g.L⁻¹) usando uma alça de 0,01 mL. (Inóculo preparado e vertido em solução de NaCl 0,85%, de acordo com a escala 1 de MacFarland).

As placas contendo *Bacillus* sp. foram incubadas por 24 horas e 48 horas para as placas contendo *A. brasilense* ambas a 30°C. Após o período de incubação, com uma pipeta de Pasteur, foi aplicada uma camada de

clorofórmio, cobrindo toda a faixa de bactérias, em seguida, as placas foram mantidas fechadas durante 10 minutos, para inativar todas as células vivas.

As placas permaneceram abertas por mais 10 minutos, para evaporação de todo o clorofórmio tóxico. Em seguida, uma suspensão preparada de *A. brasilense* e *Bacillus* sp. em solução NaCl 0,85%, escala 1 de MacFarland, foram plicadas perpendicularmente à cepa inativada pelo clorofórmio usando alça de 0,01 mL. Em seguida as placas foram incubadas a 30 °C por 24 e 48 horas para as placas contendo a suspensão de *Bacillus* sp. e *A. brasilense* respectivamente.

O teste de inibição foi realizado em triplicata em capela de fluxo laminar, após o período de incubação foi observado a formação da zona de inibição de crescimento.

Preparo do inóculo

Após a validação dos testes de antagonismo entre *Bacillus* sp. e *Azospirillum brasilense*, foram realizados o preparo dos inoculantes líquidos contendo os respectivos microrganismos.

De acordo com a padronização da curva de crescimento, o *Bacillus* sp. foi cultivado em meio dygs sob agitação de 120 rpm a 30°C durante 7 horas, para obtenção de 2×10^8 células mL⁻¹, enquanto que o *Azospirillum brasilense*, foi multiplicado em meio dygs, sob agitação de 120 rpm a 30°C durante 23 horas, para obtenção do mesmo número de unidades formadoras de colônias (UFC) (Relare, 2007).

O mix de bactérias foi obtido através da junção entre o meio líquido contendo *Bacillus* sp. ao meio contendo *Azospirillum brasilense* nas respectivas concentrações de 2×10^8 células mL⁻¹, tomando as proporções de 1×10^8 células mL⁻¹ para ambas espécies. A contagem de células foi confirmada pela DO a 600 nm em espectrofotômetro.

Delineamento do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação durante os meses de junho a outubro de 2019, em delineamento em blocos casualizados em um esquema fatorial $3 \times 2 + 1$. O primeiro fator constituiu-se da utilização de três inoculantes (*Bacillus* sp., *Azospirillum brasilense* e um mix de *Bacillus* sp. + *Azospirillum brasilense*), o segundo fator de duas formas de aplicação (sementes e pulverização), e a testemunha adicional, (sem aplicação de bactérias promotoras de crescimento). Todos os tratamentos não receberam adubação nitrogenada durante o experimento. Foram utilizadas quatro repetições totalizando 28 parcelas experimentais.

Descrição do solo e adubação

Foi utilizado o solo Latossolo Vermelho, coletados a profundidade de 0 a 20 cm. O solo foi previamente, peneirado e esterelizado, em autoclave, sob temperatura de 120°C e pressão a 1,5 atm durante uma hora.

Em seguida foi acondicionado em vasos, com capacidade de 7 dm³ e foi realizada a adubação de plantio, utilizando super simples como fonte de fósforo na dose equivalente a 36 g. dm⁻³, com base na análise de solo que apresentou as seguintes características: pH 7,3; fósforo, 10,25 mg.dm³; potássio, 142 mg.dm³; Ca, 7,60 mg.dm³; Mg, 1,30 cmol_c.dm³; Al, 0 cmol_c.dm³; saturação por base, 91%; areia fina, 8,30 dag.kg⁻¹; areia grossa, 15,70 dag.kg⁻¹; silte, 52 dag.kg⁻¹; argila, 24 dag.kg⁻¹ e matéria orgânica, 2,34 dag.kg⁻¹.

Foram plantadas 10 sementes por vaso, deixando apenas cinco plantas de *Urochloa brizantha* cv. Marandu após o desbaste 15 dias após o plantio (DAP).

Inoculação

As sementes utilizadas foram previamente desinfetadas, utilizando álcool 70% e hipoclorido de sódio a 1% durante 5 minutos, em seguida foram lavadas em água destilada estéril por 2 minutos.

Após a desinfestação das sementes cada tratamento recebeu o inoculante pré-determinado. As sementes foram totalmente mergulhadas em um erlenmeyer contendo os inoculantes (*A. brasilense*, *Bacillus* sp. e *A. brasilense* + *Bacillus* sp.). As sementes permaneceram inoculadas sob agitação por 10 minutos, para melhor distribuição dos inoculantes sobre as sementes, na proporção equivalente a 300 mL. ha⁻¹. Em seguida, foram colocadas para secar.

Os tratamentos cujo inoculante foi adicionado via pulverização, foi realizada 30 DAP, quando foi realizado o corte de padronização e uniformização de todas as parcelas. Para tanto, foi utilizada a proporção equivalente a 300 mL. ha⁻¹ com auxílio de um spray pulverizador.

As parcelas foram irrigadas, mantendo o solo a 60% da capacidade de campo. As variáveis agrônomicas foram avaliadas a cada 30 dias após o corte de uniformização.

Variáveis analisadas

As variáveis agrônomicas foram analisadas aos 30, 60 e 90 dias após o corte de padronização e uniformização das parcelas. Foram analisadas altura de plantas, utilizando régua graduada, da base do solo ao topo da planta mais alta. Foi obtido número de folhas (NF) e perfilhos (NPER), através da contagem total de órgãos vegetativos vivos. A massa seca por vaso (MS), obtida pelo corte da forragem, com altura residual de 10 cm, a forragem colhida foi previamente pesada e seca em estufa de ventilação forçada, sob temperatura de 55 °C durante 72 horas (Silva e Queiroz, 2002).

O teor de clorofila foi obtido utilizando clorofilômetro portátil At – Leaf, no qual foram efetuadas 10 leituras em cada parcela, no terço médio de cada folha, sendo escolhidas as mais novas e completamente expandidas. Considerou-se como valor representativo de cada parcela, a média das 10 leituras.

As variáveis fisiológicas foram avaliadas apenas no 1º corte, ou seja, aos 30 dias após o corte de uniformização.

A taxa fotossintética (A) ($\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), a condutância estomática dos vapores de água ($\text{mol}.\text{m}^{-1}.\text{s}^{-1}$), a taxa de transpiração (E) ($\text{molH}_2\text{O}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), a concentração de CO₂ na câmara substomatal ($\mu\text{mol. mol}^{-1}$), e a eficiência no uso da água (EUA) ($\text{mol CO}_2. \text{mol H}_2\text{O}^{-1}$), estimada com base na relação da fotossíntese pela quantidade de água transpirada, foram avaliados, utilizando um analisador de gás infravermelho (IRGA), marca ADC, modelo Lcpro-SD (Analytical Development Co. Ltd, Hoddesdon, Reino Unido), sob condições naturais de circulação de ar. As avaliações foram realizadas no terço superior das plantas, em uma folha completamente expandida, utilizando luz natural. Para condições ambientais mais homogêneas e leitura correta dos dados, as análises foram realizadas entre 8 e 11 horas (Barros *et al.* 2017).

A eficiência fotoquímica do fotossistema II (PS II) foi analisada utilizando o Fluorômetro Opti-Sciences para o claro e o escuro. Para adaptação ao escuro, foram colocadas pinças no terço médio da primeira folha totalmente expandida do leme basal mais desenvolvido durante 30 minutos, sendo obtidas a fluorescência mínima (F₀) e a fluorescência máxima (F_m). Foi obtida a Fluorescência variável (F_v), através da diferença entre F₀ e F_m. Com isso, também foi determinada a eficiência fotoquímica, que é a razão entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima (F_v/F_m) e a taxa de transporte de elétrons (ETR $\mu\text{mols de elétrons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (Silveira *et al.* 2017). Foi realizada uma avaliação em cada parcela experimental.

Ao fim do experimento, aos 90 dias após o corte de uniformização, as raízes foram separadas, e lavadas em água corrente. Foi realizada a mensuração do comprimento de raízes (COMPR), com auxílio de uma régua graduada e em seguida, as raízes foram colocadas em estufa com circulação forçada de ar a 55° durante 72 horas, ou até obtenção do peso constante, para determinação da massa seca de raízes (MSR).

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância e comparados a testemunha, pelo teste Dunnet a 5% como nível crítico de probabilidade, sendo realizado o desdobramento de dados quando houve interação significativa, utilizando o pacote Expdes.pt (Ferreira *et al.* 2014). As médias dos fatores, quando significativas, foram comparadas entre si, pelo teste Tukey a 5% do nível de significância, utilizando o programa estatístico *Rstudio*.

RESULTADOS

Ao analisar o efeito antagonista pelo método de disco difusão, não foi observado halo de inibição entre as bactérias, o que demonstra ausência de efeito deletério sobre o crescimento entre *Bacillus* sp. e *Azospirillum brasilense* (Figura 1).

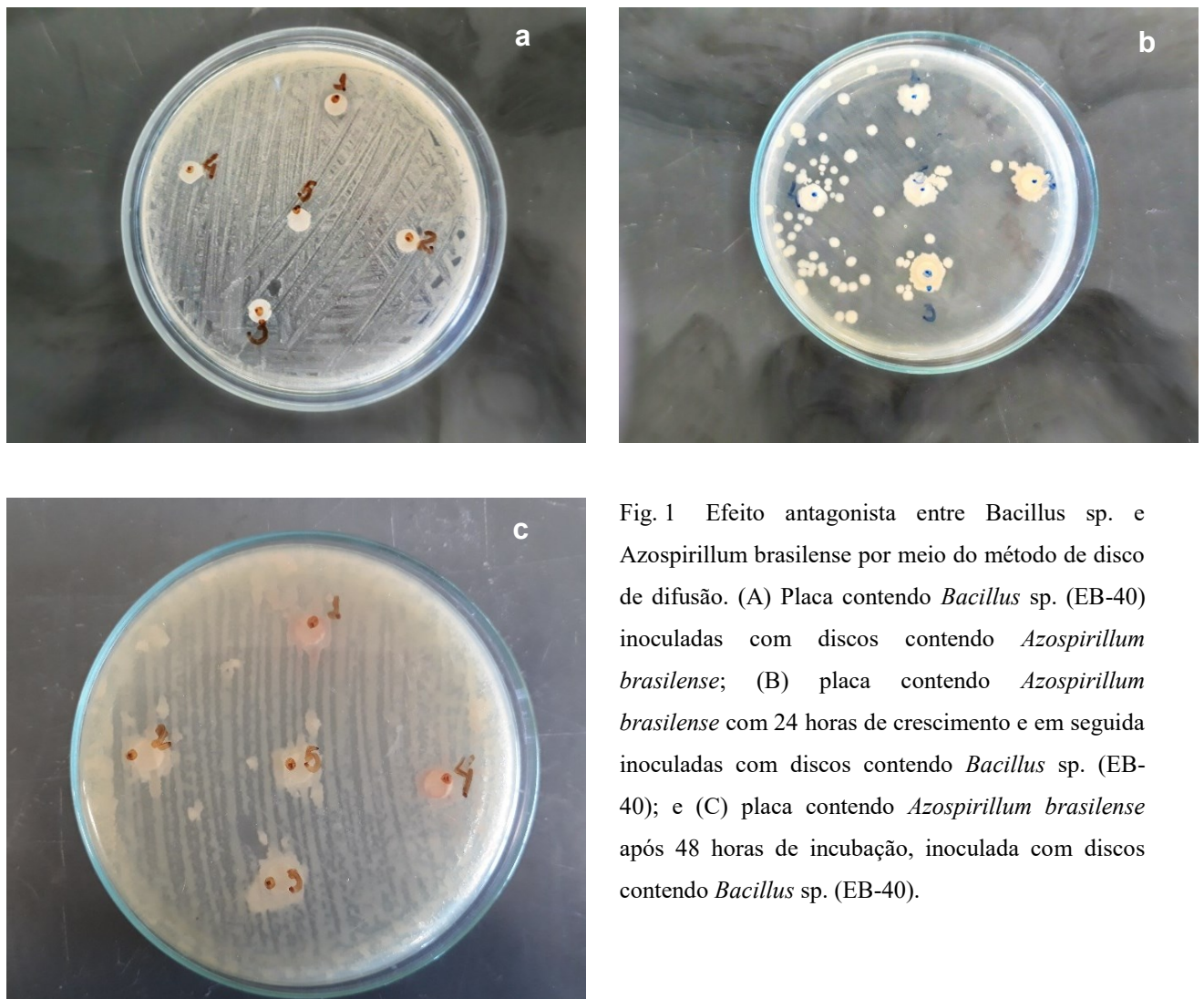


Fig.1 Efeito antagonista entre *Bacillus* sp. e *Azospirillum brasilense* por meio do método de disco de difusão. (A) Placa contendo *Bacillus* sp. (EB-40) inoculadas com discos contendo *Azospirillum brasilense*; (B) placa contendo *Azospirillum brasilense* com 24 horas de crescimento e em seguida inoculadas com discos contendo *Bacillus* sp. (EB-40); e (C) placa contendo *Azospirillum brasilense* após 48 horas de incubação, inoculada com discos contendo *Bacillus* sp. (EB-40).

Não foi observado inibição de crescimento entre as bactérias testadas, pelo método do ensaio cruzado (Figura 2).

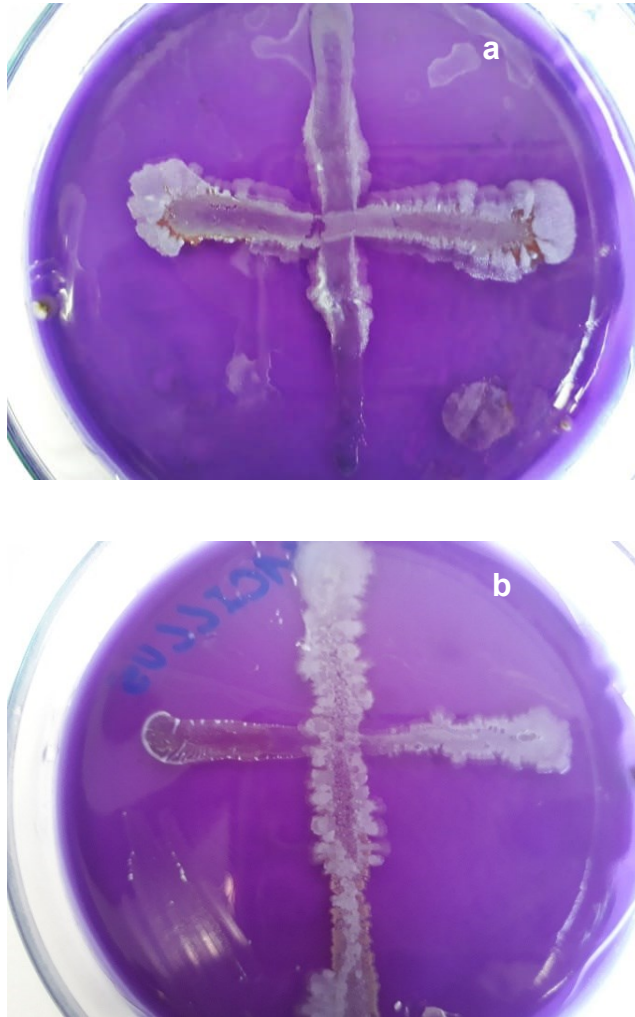


Fig. 2 Teste de inibição entre *Bacillus* sp. sobre o *Azospirillum brasilense* por ensaio cruzado. (a) Ausência de inibição cruzada *in vitro* entre *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* sp. (EB-40) e (B) ausência de inibição *in vitro* entre *Bacillus* sp. (EB-40) e *Azospirillum brasilense* (b)

Algumas espécies de *Bacillus* sp. tem a capacidade de liberar exsudados, com capacidade antibiótica e antifúngica (Araújo *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2016), no entanto, as substâncias extracelulares de *Bacillus* sp. e *A. brasilense* não afetaram o crescimento em placas de petri de ambas as espécies, pelos métodos utilizados (Fig. 1 e Fig. 2), o que indica possibilidade na utilização destas, de forma simultânea em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

De acordo com a análise de variância as características agrônômicas avaliadas como a Altura, NPER, NF e MS não apresentaram interação quanto ao fator inoculante e forma de inoculação ($P > 0,05$). A forma de inoculação (semente ou pulverização) não apresentou efeito significativo ($P > 0,05$) para as variáveis testadas durante os três cortes (Tabela 2).

Tabela 2 – Características agrônômicas do capim– marandu inoculado com *A. brasilense* e *Bacillus* sp. em três cortes efetuados em intervalos de 30 dias, Montes Claros, Brasil, 2019

1° Corte (30 dias)				
Inoculantes	Altura (cm)	NPER (n°perfilhos.vaso ⁻¹)	NF (n°folhas.vaso ⁻¹)	MS (g.vaso ⁻¹)
<i>A. brasilense</i>	53,99 b	25,25	67,50 b	15,80
<i>Bacillus</i> sp. (EB-40)	53,64 b	22,13	57,50 c	15,46
MIX	63,91 a	28,38	76,25 a	16,45
Testemunha	27,5	15	43,75	8,09
CV (%)	6,47	5,42	2,83	7,64
2° Corte (60 dias)				
Inoculantes	Altura (cm)	NPER (n°perfilhos.vaso ⁻¹)	NF (n°folhas.vaso ⁻¹)	MS (g.vaso ⁻¹)
<i>A. brasilense</i>	52,13 b	26,75 b	75,37 b	16,30 b
<i>Bacillus</i> sp. (EB-40)	41,63 c +	20,50 c	62,00 c	13,69 c
MIX	61,88 a	30,25 a	92,63 a	18,10 a
Testemunha	38,5	14	36,25	7,30
CV(%)	4,95	7,71	4,15	4,60
3° Corte (90 dias)				
Inoculantes	Altura (cm)	NPER (n°perfilhos.vaso ⁻¹)	NF (n°folhas.vaso ⁻¹)	MS (g.vaso ⁻¹)
<i>A. brasilense</i>	35,88 b	27,75 b	67,88 b	15,88 a
<i>Bacillus</i> sp. (EB-40)	31,00 c +	21,38 b	60,25 c	14,10 b
MIX	42,25 a	30,38 a	77,00 a	16,60 a
Testemunha	26,5	14	33,75	7,09
CV(%)	9,70	8,92	7,00	5,88

Nota: Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas de + não diferem da testemunha pelo teste Dunnet a 5% de probabilidade. CV(%): coeficiente de variação.

A altura de plantas foi maior nos três cortes quando utilizou-se o Mix como inoculante. Foi observado incremento de aproximadamente 15%, 16% e 15% em relação ao *A. brasilense*, 16%, 33% e 27% em relação ao *Bacillus* sp. e 57%, 38% e 37% em relação ao tratamento testemunha respectivamente.

No primeiro corte não foi observado efeito das formas de inoculação sobre o NPER, nos cortes seguintes (60 e 90 dias) o mix incrementou o número de perfilhos em 12% e 9% em relação ao *A. brasilense*, 32 % e 30% em relação ao *Bacillus* sp. Quanto à testemunha os incrementos foram da ordem de 47%, 46% e 46%, nos três cortes respectivamente.

O Mix promoveu maior NF durante os 3 cortes, observando-se aumento significativo de 12%, 19% e 12% em relação ao *A. brasilense*, 25%, 33% e 22% em relação ao *Bacillus* sp. e 43%, 61% e 56% em relação ao tratamento testemunha.

Guimarães *et al.* (2011) observaram aumento de 10% no número de folhas para a *B. decumbens*, proporcionado pela estirpe AZ18 de *A. brasilense*, em relação ao tratamento controle, sem inoculação e sem adubação nitrogenada.

Observou-se diferença de MS entre os inoculantes apenas no segundo e terceiro corte, ou seja, aos 60 e 90 dias, com incremento de aproximadamente 60% e 57% para os tratamentos inoculados com o Mix em relação a testemunha respectivamente

E Houve interação significativa entre os inoculantes utilizados e a maneira de inoculação ($P < 0,05$) para o teor de clorofila aos 30, 60 e 90 dias, sendo a maior teor de clorofila encontrada nos tratamentos inoculados com Mix nas sementes (Figura 3).

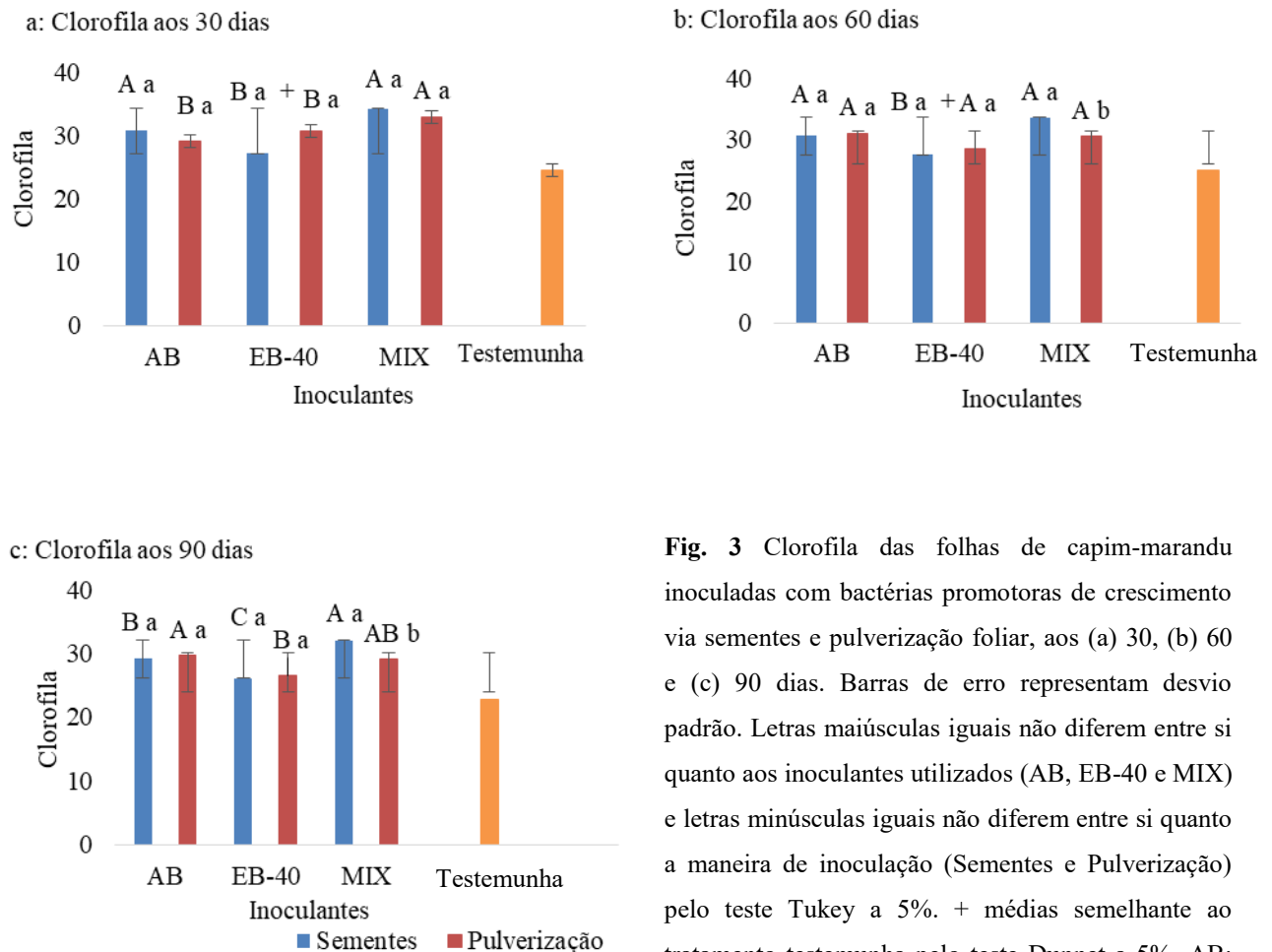


Fig. 3 Clorofila das folhas de capim-marandu inoculadas com bactérias promotoras de crescimento via sementes e pulverização foliar, aos (a) 30, (b) 60 e (c) 90 dias. Barras de erro representam desvio padrão. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si quanto aos inoculantes utilizados (AB, EB-40 e MIX) e letras minúsculas iguais não diferem entre si quanto a maneira de inoculação (Sementes e Pulverização) pelo teste Tukey a 5%. + médias semelhante ao tratamento testemunha pelo teste Dunnet a 5%. AB: *Azospirillum brasilense*; EB-40: *Bacillus* sp. (EB-40); MIX: *Azospirillum brasilense* + *Bacillus* sp. (EB-40).

A inoculação com BPCV proporcionou maior incremento da clorofila das folhas do capim-marandu, sendo o *A. brasilense* e o Mix mais indicado para aplicação nas sementes enquanto que, a inoculação com *Bacillus* sp. apresentou maiores teores de clorofila quando aplicados via pulverização foliar durante os três cortes.

De acordo com a análise de variância, não houve interação entre os fatores para as taxas fotossintéticas testadas e não houve efeito significativo do fator tipo de inoculação (na semente ou via pulverização foliar) ($P < 0,05$). Já os diferentes tipos de inoculação influenciaram significativamente ($P < 0,05$), as respostas fisiológicas do capim-marandu (Tabela 3), exceto para concentração de CO_2 na câmara substomatal e condutância estomática dos vapores de água que apresentaram valores médios de $207,23 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ e $0,055 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ respectivamente.

Tabela 3 – Taxa fotossintética do capim-marandu inoculado com bactérias promotoras de crescimento de plantas

Inoculantes	A ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	E ($\text{molH}_2\text{O} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	EUA ($\text{molCO}_2 \cdot \text{molH}_2\text{O}^{-1}$)
<i>A. brasilense</i>	5,52 b	1,66 ab	3,27 b
<i>Bacillus</i> sp. (EB-40)	4,62 b +	1,39 b +	3,24 b +
MIX	8,09 a	1,84 a	4,43 a
Testemunha	2,75	1,08	2,55
CV(%)	30,29	19,96	18,76

Nota: Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas de + não diferem da testemunha pelo teste Dunnet a 5% de probabilidade. A: Taxa de fotossíntese; E: Taxa de transpiração; EUA: Eficiência do Uso da Água; CV(%): coeficiente de variação.

A taxa fotossintética (A) foi maior para as plantas inoculadas com o Mix, obtendo-se incremento de 66% em relação à testemunha, 31% e 43% em relação aos tratamentos inoculados com *A. brasilense* e *Bacillus* sp. de forma isolada, respectivamente.

A taxa de transpiração (E) foi maior para os tratamentos inoculados com o *Bacillus* sp. e o Mix. A eficiência no uso da água (EUA) é uma medida da razão entre a taxa fotossintética e a taxa transpiratória que foi maior para os tratamentos inoculados com o Mix. Apenas os tratamentos inoculados com o *Bacillus* sp. apresentaram resposta semelhante à testemunha, uma vez que os demais tratamentos apresentaram maior eficiência no uso da água.

De acordo com a análise de variância, não houve interação entre os fatores para a fluorescência da clorofila *a* e não houve efeito do fator tipo de inoculação (na semente ou via pulverização foliar). Já os diferentes tipos de inoculação influenciaram significativamente ($P < 0,05$) as respostas fisiológicas do capim-marandu (Tabela 4) exceto para a Fluorescência inicial (F_0).

Tabela 4 – Fluorescência da clorofila *a* do capim-marandu inoculado com bactérias promotoras de crescimento de plantas

Inoculantes	ETR ($\mu\text{mols de elétrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	F _m	F _v
<i>A. brasilense</i>	55,89 a	2400,88 b +	1853,63 b
<i>Bacillus sp.</i> (EB-40)	37,29 b +	2443,50 ab +	1990,63 b
MIX	63,40 a	2622,88 a	2089,25 a
Testemunha	28,9	2363,75	1633,25
CV(%)	12,46	6,37	6,71

Nota: Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas de + não diferem da testemunha pelo teste Dunnet a 5% de probabilidade. ETR: Taxa de transporte de elétrons; F_m: Fluorescência máxima; F_v: Fluorescência variável; CV(%): coeficiente de variação.

A ETR alcançou valores máximos de 63,40 $\mu\text{mols de elétrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nos tratamentos que receberam como inoculação o Mix e que também proporcionaram maiores taxas fotossintéticas.

Não foi observado efeito dos fatores para a fluorescência mínima (F₀), desta forma, os tratamentos apresentaram médias semelhantes ao tratamento controle.

A relação entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima (F_v/F_m) pode variar entre 0,75 e 0,85 em condições ideais de crescimento, a redução desse valor é indicativo de que a planta esteja submetida a algum estresse fisiológico (Ribeiro *et al.* 2004). Foi observado que apenas as plantas do tratamento testemunha apresentaram valores abaixo das condições ideais, visto que as bactérias promotoras do crescimento de plantas de uma forma geral, mitigaram fatores que poderiam promover estresse à planta, como a ausência de fontes de nitrogênio.

Os valores da F_m dos tratamentos inoculados com *A. brasilense* e *Bacillus sp.* foram semelhantes ao da testemunha, enquanto que, apenas os tratamentos inoculados com o Mix apresentaram valor estatisticamente superior em 11%.

A F_v também foi superior apenas nos tratamentos inoculados com o Mix, que proporcionou incremento de aproximadamente 22% em relação à testemunha e cerca de 9 e 11% em relação aos tratamentos inoculados com *Azospirillum brasilense* e *Bacillus sp.* respectivamente.

De acordo com a análise de variância, houve interação significativa (P<0,05), entre as formas de aplicação e os diferentes inoculantes testados para a MSR (Figura 4).

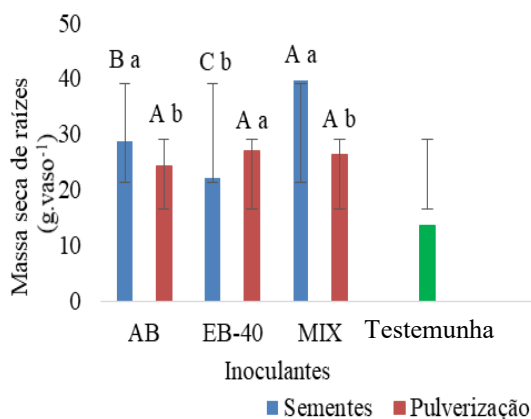


Fig. 4 Massa seca de raízes (g.vaso⁻¹) de capim-marandu inoculado com bactérias promotoras do crescimento de plantas. Barras de erro representam desvio padrão. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si quanto aos inoculantes utilizados (AB, EB-40 e MIX) e letras minúsculas iguais não diferem entre si quanto a maneira de inoculação (Sementes e Pulverização) pelo teste Tukey a 5%. AB: *Azospirillum brasilense*; EB-40: *Bacillus sp.* (EB-40); MIX: *Azospirillum brasilense* + *Bacillus sp.* (EB-40)

Foi possível destacar que o *A. brasilense* utilizado isoladamente e de forma simultânea, ao *Bacillus* sp. promoveram maior rendimento de raiz quando inoculados nas sementes, apresentando incremento de 15% e 33% em relação à inoculação via pulverização, respectivamente.

Já o *Bacillus* promoveu maior massa de raízes quando inoculado via pulverização, promovendo incremento de 17% em relação a inoculação via sementes.

Não houve interação entre os diferentes inoculantes e as formas de aplicação, quanto ao comprimento de raízes ($P < 0,05$). No entanto, os fatores apresentaram efeito significativo de acordo com a análise de variância ($P < 0,05$).

O Mix proporcionou maior comprimento de raízes em relação aos demais inoculantes testados, com incremento de 16% em relação ao *A. brasilense* e 17% em relação ao *Bacillus* sp. Em relação ao tratamento testemunha foi obtido aumento de 58%, devido ao incremento de nutrientes de hormônios vegetais que proporcionam o crescimento radicular (Tabela 5).

Tabela 5 – Comprimento de raízes de capim – marandu inoculado com bactérias promotoras de crescimento

Inoculantes	Comprimento de raízes (cm)
<i>A. brasilense</i>	51,13 b
<i>Bacillus</i> sp. (EB-40)	50,75 b
MIX	61,25 a
Testemunha	26
CV(%)	3,55

Nota: Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas de + não diferem da testemunha pelo teste Dunnet a 5% de probabilidade. CV(%): coeficiente de variação.

Ao avaliar as formas de inoculação, o comprimento das raízes foi maior quando inoculado via sementes, obtendo-se um incremento de aproximadamente 13% em relação à inoculação via pulverização, independente do inoculante utilizado (Tabela 6).

Tabela 6 – Comprimento de raízes de capim– marandu inoculado com bactérias promotoras de crescimento na semente e via pulverização foliar

Forma de inoculação	Comprimento de raízes (cm)
Sementes	58,25 a
Pulverização	50,5 b
Testemunha	26
CV(%)	3,55

Nota: Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas de + não diferem da testemunha pelo teste Dunnet a 5% de probabilidade. CV(%): coeficiente de variação.

A inoculação dos microrganismos tanto de forma isolada quanto em conjunto, foram melhores quando aplicados nas sementes, promovendo comprimento de raízes 13% maiores do que quando inoculados via foliar.

DISCUSSÃO

Neste artigo, abordamos a existência de sinergismo entre *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* sp. EB-40, na promoção do crescimento e desenvolvimento do capim-marandu. Considerando a crescente demanda por insumos agrícolas, estudos de utilização de microrganismos promotores do crescimento vegetal são essenciais, por promoverem maior produtividade de forma sustentável e a um baixo custo (Malinich e Bauer, 2018).

A maior altura observada para os tratamentos inoculados com o Mix (Tabela 2), deve-se provavelmente ao fato da capacidade de produção de hormônios de crescimento vegetal, como auxinas e giberelinas, já relatada em ambas espécies (Andrade *et al.*, 2014, Hungria *et al.*, 2010), uma vez que, a atividade destes hormônios pode modificar a expansão celular e alterar a forma como a parede é expandida, provocando o alongamento do colmo, folhas e a duração da vida dos órgãos vegetativos (Taiz e Zeiger, 2013).

Essa expansão celular ocorre uma vez que as auxinas promovem estímulos de liberação de prótons, acidificando a parede celular. A redução do pH provoca ativação de enzimas que causam afrouxamento da parede e ocorre a absorção de água pelo protoplasma (Kerbaui, 2012).

A utilização de fontes nitrogenadas em pastagens estabelecidas, permite a redução no tempo de aparecimento foliar, promovendo recuperação rápida da forragem de forma que o tempo de descanso pós pastejo, possa ser reduzido (Silva *et al.*, 2013).

O contínuo perfilhamento observado e o maior número de folhas (Tabela 2) pode estar associado aos efeitos diretos e indiretos das espécies utilizadas, cujas habilidades estão descritas em diversos estudos e apontam grande potencial para FBN, solubilização de fosfatos orgânicos e inorgânicos e produção de hormônios, como as auxinas (Andrade *et al.*, 2014; Döbereiner *et al.*, 1976; Gomes *et al.*, 2017; Hungria *et al.*, 2016; Matos *et al.*, 2017).

Para Alexandrino *et al.* (2005) a adição de fontes de nitrogênio tem a capacidade de promover estímulos nos pontos de crescimento da forrageira, uma vez que, gramíneas forrageiras sob crescimento vegetativo, apresentam alta taxa de aparecimento foliar, resultando em alta taxa de perfilhamento, pois em cada inserção de folha existe uma gema que, em função das condições disponíveis, pode se transformar em um perfilho.

Apesar de Pedreira *et al.* (2017) não notarem aumento quanto a taxa de perfilhamento com a inoculação de *A. brasilense* no capim-marandu, no presente estudo, o perfilhamento foi favorecido especialmente nos tratamentos inoculados com o Mix. O que denota aumento nos benefícios para as plantas quando *A. brasilense* e *Bacillus* sp. são usados de forma simultânea. Desta forma, o melhor aproveitamento dos nutrientes, como nitrogênio e fósforo, pelas plantas, proporciona melhor estabelecimento e perenidade de plantas forrageiras, uma vez que promove o contínuo perfilhamento (Cecato *et al.*, 2000).

Além disso, o aumento do número de folhas e de perfilhos, possibilita menor exposição do solo, o que favorece a menor incidência de erosão (Araújo, 2015).

A MS foi favorecida pela inoculação com as bactérias que promoveram maior produção de biomassa em relação a testemunha. Em um recente estudo, Leite *et al.* (2018) já haviam relatado acúmulo anual de forragem de 17 kg.ha⁻¹ de capim marandu inoculado com *Azospirillum brasilense*, independente da dose de nitrogênio utilizada.

De acordo com estes mesmos autores, a inoculação resultou em um aumento de 33% no acúmulo diário de forragem durante as estações de seca em Araguaína – TO, promovendo ainda uma redução de 20% na necessidade de fertilizante nitrogenado.

A maior proporção de biomassa, no entanto, foi observada nos tratamentos inoculados com o Mix, que apresentou sinergismo entre as bactérias utilizadas, promovendo melhores resultados. Provavelmente uma espécie,

das bactérias utilizadas, são capazes de liberar extracelulares essenciais para o crescimento de outras, evoluindo para uma interação de protocooperação. Desta forma, a utilização conjunta é capaz de maximizar os benefícios à planta.

A utilização simultânea dessas BPCV (*Azospirillum brasilense* e *Bacillus* sp.), pode promover maior absorção de nutrientes do solo, especialmente nitrogênio e fósforo, favorecendo a maior produção de biomassa e o estabelecimento pela maior altura, massa seca e taxa de perfilhamento (Basso *et al.*, 2010; Leite *et al.*, 2018).

Não se sabe ao certo qual a tendência de penetração das bactérias quando aplicadas via pulverização foliar (Bulegon *et al.*, 2014), no entanto, a falta de efeito quanto a maneira de inoculação deve-se ao fato de que na presença de água e umidade os microrganismos são carregados mais facilmente para a rizosfera, onde são encontradas em maior número (Quadros *et al.*, 2014).

Além disso, o corte de uniformização realizado antes da pulverização, promove rebaixamento da forragem e redução de área foliar, o que contribui para aumento da superfície de contato entre microrganismo e solo.

Em virtude dos resultados obtidos, as bactérias favoreceram o incremento no teor de clorofila nas folhas (Fig. 3) provavelmente, pela deposição de N, oriundo da fixação biológica. A maior produtividade encontrada nos tratamentos inoculados com Mix (Tabela 2), também possui relação indireta com o maior teor de clorofila encontrado, uma vez que a clorofila é uma molécula essencial para o processo da fotossíntese, e por conseguinte, fundamental para uma boa produtividade.

Embora bactérias do gênero *Bacillus* não são tidas como diazotróficas, (Manrique *et al.*, 2019), destes microrganismos de forma conjunta ou não proporcionou incrementos no teor de clorofila foliar, quando comparadas ao tratamento testemunha.

Lima *et al.* (2011) ao avaliarem a produtividade de milho inoculado com *Bacillus subtilis* com e sem adubação nitrogenada, observaram que os tratamentos inoculados, apresentaram valores de clorofila superiores aos sem inoculação.

Azospirillum sp. pode atuar como estimulante à produção de pigmentos fotossintéticos (Bulegon *et al.*, 2014) promovendo maior eficiência no funcionamento do aparato fotossintético do capim-marandu.

Os maiores valores de clorofila proporcionados pelo Mix inoculado nas sementes foram de 34,4, 33,5 e 32. Já Guimarães *et al.* (2016), obtiveram valores de 42,5 e 40,16 ao inocularem sementes de capim-marandu com estirpes de *A. amazonense* e *Bacillus* sp. respectivamente. Destacaram ainda que o tratamento controle, que recebeu 100 mg. dm⁻³ de nitrogênio na forma de ureia, apresentou valor de 44,08 para o índice de clorofila, que correspondeu a produção máxima obtida.

A redução no teor de N e conseqüentemente de clorofila, como observado no tratamento testemunha (Fig. 3), acarreta redução na taxa fotossintética (Tabela 3), ocasionando redução na captação de fotoassimilados e no potencial produtivo.

Plantas de metabolismo C₄, como o capim-marandu, apresentam taxa fotossintética entre 20 e 40 μmol.m².s⁻¹ (Taiz e Zeiger, 2013), o que não foi observado neste trabalho (Tabela 3), devido às condições em que as plantas foram cultivadas, uma vez que o experimento foi conduzido em casa de vegetação com sombreamento em torno de 50%.

Segundo Taiz e Zeiger (2013) o sombreamento é fator limitante para a fotossíntese das plantas. Mesmo obtendo-se incrementos na produção, este fator pode ter sido favorável para redução do potencial produtivo desta forrageira neste estudo.

Este mesmos autores afirmam que a transpiração favorece a manutenção da temperatura pela troca de calor e o transporte de nutrientes na planta, desempenhando papel fundamental no movimento de água no sistema solo-

planta- atmosfera. Desta forma, quanto maior for a retirada de água pelo processo de transpiração, maior a pressão negativa gerada na parte superior do xilema, que é transmitido para o xilema das raízes favorecendo maior absorção de água do solo, desta forma, proporciona menor eficiência no uso da água. As plantas C_4 possuem mecanismos fisiológicos que promovem a concentração de CO_2 , favorecendo a realização normal da fotossíntese com uma menor condutância estomática e conseqüentemente menor perda de água.

Além disso, a regulação estomática pode ser determinada dentre outros fatores, pela atuação hormonal do ácido abscísico (ABA). Não se tem conhecimento ao certo sobre a regulação estomática e a atuação de BPCV, no entanto, tratamentos inoculados com estas bactérias proporcionam, indiretamente, maior quantidade de cloroplastos, onde ocorre a síntese deste hormônio, favorecendo a maior concentração de ABA nos tecidos da planta, além de atuarem na produção e liberação de outros hormônios vegetais, que estão ativamente relacionados ao sistema de regulação fisiológica da planta (Hueso *et al.*, 2012).

No entanto a concentração de CO_2 na câmara substomatal e condutância estomática dos vapores de água que poderiam explicar a E e EUA (Tabela 3), não apresentaram diferença entre os inoculantes testados. Acredita-se que a irrigação constante das parcelas experimentais, possa ter atenuado estes fatores.

A radiação incidente sobre as folhas na casa de vegetação pode ter amenizado o máximo valor fotossintético e produtivo das plantas. No entanto, a utilização das BPCV, atuam como potencial fertilizantes biológicos possibilitando bom funcionamento e estruturação do aparato fotossintético, através da deposição de nutrientes.

A ausência de efeito significativos entre os fatores testados para a Fluorescência inicial (F_0) corrobora com resultados encontrados por Lu e Zhang (2000), que observaram que o nitrogênio não exerce influência na F_0 em milho.

Mathis e Paillotin (1981) destacam que a F_0 possui emissão no estágio rápido da fluorescência e representa a energia liberada pelas moléculas de clorofila *a* do fotossistema II, antes dos elétrons migrarem para o centro de reação PSII, resultando em componente mínimo da fluorescência. Sendo assim, se torna pouco inclinado a alterações pela presença ou ausência do nitrogênio.

A F_v/F_m , como indicador de estresse da planta, indicou neste estudo, que plantas que não receberam adubação com fontes nitrogenadas (tratamento testemunha) apresentaram algum estresse fisiológico. Considerando a FBN como fornecimento direto de nitrogênio para as plantas, estes resultados corroboram com Lu e Zhang (2000) ao avaliarem a assimilação fotossintética de CO_2 , fluorescência da clorofila e fotoinibição afetada pela deficiência de nitrogênio em plantas de milho, observaram que a deficiência de N causou leve redução na eficiência máxima fotoquímica do PSII (F_v/F_m), mas induziu uma diminuição significativa no rendimento quântico real do PSII.

Além disso Nunkeaw *et al.* (2014) destacaram que diversos fatores, como número de cloroplastos e teor de clorofila, podem modular a eficiência no rendimento quântico do fotossistema II, quanto a excitação da clorofila e transporte de elétrons em arroz inoculado com espécies de bactérias promotoras de crescimento.

Já a F_m (Tabela 4) é diretamente proporcional a quantidade de clorofila *a* existente nos tecidos (Miranda *et al.* 1981), desta forma, a inoculação com Mix, promoveu aumento no teor de clorofila nos tecidos e conseqüentemente provocou aumento na fluorescência máxima da clorofila.

Para Murchie e Lawson (2013), o aumento na fluorescência variável efetiva, como observado nos tratamentos inoculados com o Mix, possibilita que o PSII transporte mais elétrons no mesmo intervalo de tempo. Isto faz com que, a eficiência no aproveitamento dos picos de radiação seja maior, e possibilita que o centro de

reação (PSII) se auto proteja dos danos pelo excesso de luz e aumente as taxas fotossintéticas, reduzindo a formação de oxigênio reativo (Müh *et al.*, 2012).

Uma vez que a eficiência do PSII é dependente de fatores como número de cloroplastos e teor de clorofila foliar, alterações impostas nestes componentes, podem modular a eficiência do centro de reação, a excitação da clorofila, o transporte eletrônico e conseqüentemente o funcionamento do aparato fotossintético (Bhattacharyya e Jha, 2012).

Desta forma, bactérias promotoras de crescimento utilizadas de forma simultânea, podem promover maiores ganhos produtivos e melhorias na atividade da fotossíntese, por promover maior teor de pigmentos e por permitir maior aproveitamento eletrônico por unidade de tempo independente da maneira de inoculação.

De maneira geral, as bactérias promotoras de crescimento aumentaram a MSR quando comparados à testemunha (Figura 5).



Fig. 5 Raízes de capim-marandu inoculado com bactérias promotoras do crescimento vegetal. Da esquerda para a direita, raízes referente ao tratamento controle, tratamentos inoculados nas sementes com *A. brasilense*, *Bacillus* sp. (EB-40) e MX (a). Da esquerda para a direita, raízes referente ao tratamento controle, tratamentos inoculados via pulverização com *A. brasilense*, *Bacillus* sp. (EB-40) e MX (b)

O aumento em 56% da massa radicular, entre os tratamentos inoculados com o Mix e os tratamentos testemunhas, indica a alta eficiência dos microrganismos, utilizados de forma simultânea, em promover o crescimento radicular e a maior produção de forragem na ausência de adubação nitrogenada. Isso se deve, provavelmente, a habilidades dessas espécies em produzir ácidos indólicos, que atuam na diferenciação de tecidos meristemáticas, sendo translocados do caule para as raízes, promovendo maior formação de raízes laterais e adventícias (Andrade *et al.* 2014; Fukami *et al.* 2017; Souza *et al.* 2013).

O maior desenvolvimento das raízes permite melhor absorção de água e nutrientes, proporcionando aumento na produção de biomassa, concentração de clorofila e tolerância a estresses ambientais como a seca (Souza, 2014; Souza *et al.* 2017; Fukami *et al.* 2018).

Os inoculantes promoveram maior comprimento de raízes quando inoculados na sementes (Tabela 6), pela maior superfície de contato e redução de perdas no número de células utilizadas. Além disso Bulegon *et al.* (2014) destacaram que a maior atividade das auxinas na formação inicial do vegetal incrementa a taxa de formação de vasos condutores, possibilitando aumento do número dos vasos do xilema e floema radicular pela utilização de *A. brasilense* via semente em milho e que estes hormônios também se envolvem no aumento do diâmetro e elevação da área da seção total dos vasos do xilema

O Mix de *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* sp. promove aumento de biomassa e modulações no aparato fotossintético, por proporcionar maior teor de clorofila e maior taxa de elétrons e possibilita a mitigação de estresse da planta pelo aumento da F_v/F_m no capim-marandu, independente da forma de inoculação, na semente ou via pulverização foliar. A inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* sp. EB-40 nas sementes possibilitou maior comprimento radicular.

Nesse sentido, o presente estudo abre novos horizontes para o desenvolvimento industrial de produtos biológicos inovadores para produção de pastagens, a partir da co-inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* sp., trazendo maior produtividade.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES). À Dra. Silvia Nietsche pela gentil doação das cepas de microrganismos. E a Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de bolsa de estudos de LEMT.

REFERÊNCIAS

- Alexandrino E, Nascimento JRD, Mosquim PR, Regazzi AJ, Rocha FC (2005) Características morfogênicas e estruturais da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu submetida a diferentes doses de nitrogênio e frequências de cortes. Acta Scientiarum. Agronomy. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982004000600003>
- Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM, Sparovek G (2013) Koppen's climate classification map for 379 Brazil. Meteorologische Zeitschrift. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>
- Araújo AR (2015) Conservação do solo e da água em pastagens tropicais – uma abordagem sistêmica. Publicado por Embrapa. <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/8625191/artigo-conservacao-do-solo-e-da-agua-para-pastagens-tropicais---uma-abordagem-sistemica>. Acessado em: 9 abr. 2020.
- Andrade LF, Souza GLOD, Nietsche S, Xavier AA, Costa MR, Cardoso AM, Pereira MC, Pereira DF (2014) Análise das habilidades das bactérias endofíticas associadas às raízes das bananeiras para promover o crescimento das plantas. Journal of Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-014-3019-2>
- Araújo FF, Henning A, Hungria M, Lima J (1995) Caracterização do potencial antifúngico de *Bacillus* spp. isolados de solos do Paraná. In: Hungria M, Balota EL, Colozzifilho A, Andrade DS (ed). Microbiologia do solo: desafios para o século XXI. Londrina, Iapar/ Embrapa-CNPSO, p.450-455.
- Barros RE, Faria RM, Tuffi Santos LD, Azevedo AM, Governici JL (2017) Physiological Response of Maize and Weeds in Coexistence. Planta Daninha. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-83582017350100027>
- Basso KC, Cecato U, Lugão SMB, Gomes JAN, Barbero LM, Mourão GB (2010) Morfogênese e dinâmica do perfilhamento em pastos de *Panicum maximum* Jacq. cv. IPR-86 Milênio submetido a doses de nitrogênio. Publicado por Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal. <http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/1787/1024>. Acessado em: 26 nov. 2020.
- Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>.

- Bulegon LG, Battistus AG, Guimarães VF, Inagaki AM, Offemann LC, Souza AKP, Oliveira PSR (2017) Physiological responses of *Urochloa ruziziensis* inoculated with *Azospirillum brasilense* to severe drought and rehydration conditions. Publicado por Australian Journal of Crop Science. <https://search.informit.com.au/documentSummary;dn=404756792677341;res=IELHSS>. Acessado em: 7 jan. 2020.
- Cecato U, Yanaka FY, Brito Filho MRT, Santos GT, Canto MW, Onorato WM, Peternelli, M (2000) Influência da adubação nitrogenada e fosfatada na produção, na rebrota e no perfilhamento do capim-marandu (*Brachiaria brizantha*) cv. Marandu. Acta Scientiarum: animal sciences <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v22i0.3225>
- Döbereiner J, Marriel IE, Nery M (1976) Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Can J Microbiol. <https://doi.org/10.1139/m76-217>
- Ferreira E, Cavalcanti P, Nogueira D (2014) ExpDes: um pacote R para ANOVA e projetos experimentais. Applied Mathematics. <https://doi.org/10.4236/am.2014.519280>.
- Fukami J, Abrantes JLF, Cerro P, Nogueira MA, Ollero FJ, Megías M, Hungria M (2018) Revealing strategies of quorum sensing in *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6. Archives of microbiology. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>
- Fukami J, Ollero FJ, 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. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0453-7>
- Gomes IP, Matos ADM, Nietsche S, Xavier AA, Costa MR, Gomes WS, Pereira MCT (2017) Auxin Production by Endophytic Bacteria Isolated from Banana Trees. Brazilian Archives of Biology and Technology. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2017160484>
- Guimarães SL, Bonfim-Silva EM, Kroth BE, Moreira JCF, Rezende D (2011) Crescimento e desenvolvimento inicial de *Brachiaria decumbens* inoculada com *Azospirillum* spp. Publicado por Enciclopédia Biosfera, <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2011b/ciencias%20agrarias/crescimento%20e%20desenvolvimento.pdf>. Acessado em: 9 jan. 2020.
- Guimarães S L, Santos CSA, Bonfim-Silva EM, Polizel AC, Batista ER (2016) Nutritional characteristics of marandu grass (*Brachiaria brizantha* cv. marandu) subjected to inoculation with associative diazotrophic bacteria. Academic Journals. <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR2016.7951>.
- Grobkopf T, Soyer OS (2014) Synthetic microbial communities. Current Opinion in Microbiolog. <https://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.002>.
- Hueso S, García C, Hernández T (2012) Severe drought conditions modify the microbial community structure, size and activity in amended and unamended soils. Soil Biology and Biochemistry. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.03.026>
- Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. Publicado por Plant and Soil. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-009-0262-0>. Acessado em 09 de janeiro de 2020.
- Hungria M (2011) Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina, Embrapa Soja
- Hungria M, Nogueira MA, Araújo RS (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 Agr Ecosyst Environ. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.01.024>
- Kerbaui GB (2012) Fisiologia vegetal. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Leite RDC, Santos JG, Silva EL, Alves CR, Hungria M, Leite RDC, Santos AC (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. <https://doi.org/10.1071/CP18105>

- Lima FF, Nunes LAPL, Figueiredo MVB, Araújo FF, Lima LM, Araújo ASF (2011) *Bacillus subtilis* e adubação nitrogenada na produtividade do milho. Revista Brasileira de Ciências Agrárias. <https://doi.org/10.5039/agraria.v6i4a1429>
- Liu L, Wang G, Song L, Biana LV, Liang, W (2016) Acetylome analysis reveals the involvement of lysine acetylation in biosynthesis of antibiotics in *Bacillus amyloliquefaciens*. Scientific reports. <http://dx.doi.org/10.1038/srep20108>
- Lu C, Zhang J (2000) Photosynthetic CO₂ assimilation, chlorophyll fluorescence and photoinhibition as affected by nitrogen deficiency in maize plants. Plant science. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-9452\(99\)00207-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-9452(99)00207-1)
- Malinich EA, Bauer CE (2018) The plant growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense* is vertically transmitted in *Phaseolus vulgaris* (common bean). Symbiosis. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0539-2>
- Mathis P, Paillotin G (1981) Primaru process of photosynthesis. In: Hatch MD, Boardman NK (ed) The biochemistry of plants. New York, Academic Press, p. 97-161
- Matos ADM, Gomes ICP, Nietsche S, Xavier AA, Gomes WS, Santos Netos JA, Pereira MCT (2017) Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. Anais da Academia Brasileira de Ciências. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720160111>
- Miranda V, Baker NR, Long SP (1981) Limitations os photosynthesis in different regions of the Zea mays leaf. New Phytologist. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1981.tb07481.x>
- Mohammadou BA, Blay GL, Mbofung CM, Barbier G (2014) Antimicrobial activities, toxinogenic potential and sensitivity to antibiotics of *Bacillus* strains isolated from Mbuja, an Hibiscus sabdariffa fermented seeds from Cameroon. African Journal of Biotechnology. <https://doi.org/10.5897 / AJB2014.13907>
- Müh F, Glöckner C, Hellmich J, Zouni A (2012) Light-induced quinone reduction in photosystem II. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.05.021>
- Murchie EH, Lawson T (2013) Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. Journal of Experimental Botany. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert208>
- Nunkaew T, Kantachote D, Kanzaki H, Nitoda T, Ritchie RJ (2014) Effects of 5-aminolevulinic acid (ALA)-containing supernatants from selected Rhodospseudomonas palustris strains on rice growth under NaCl stress, with mediating effects on chlorophyll, photosynthetic electron transport and antioxidative enzymes. Electronic Journal of Biotechnology. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2013.12.004>.
- Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, Van Der Putten WH (2013) Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. Nature Reviews Microbiology. <https://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3109>.
- Quadros PDD, Roesch LFW, Silva PRFD, Vieira VM, Roehrs DD, Camargo FADO (2014) Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. Revista Ceres. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2014000200008>
- R Core Team (2013). R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria. Publicado por R Foundation for Statistical Computing. <https://repo.bppt.go.id/cran/web/packages/dplR/vignettes/intro-dplR.pdf>. Acessado em: 5 abr. 2020.
- Reunião da rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbianos de interesse agrícola (2007) Publicado por Embrapa Soja. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/104754/1/Anais-da-XVI-Reuniao-da-rede-de-laboratorios-para-recomendacao-padronizacao-e-difusao-de-tecnologia-de-inoculantes-microbianos-de-interesse-agricola.pdf>. Acessado em: 9 jan. 2020.
- Ribeiro RV, Dos Santos MG, Souza GM, Machado EC, Oliveira RF, Angelocci LR, Pimentel C (2004) Environmental effects on photosynthetic capacity of bean genotypes. Pesquisa Agropecuária Brasileira. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2004000700001>

- Rodrigues Neto J, Malavolta Júnior VA, Victor O (1986) Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. Publicado por Summa Phytopathologica. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10030655191/#cit>. Acessado em: 5 abr. 2020.
- Santos NS (1984) Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando a sua utilização como adjuvante dietético. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa
- Silva DJ, Queiroz AC (2002) Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. UFV, Viçosa.
- Silva MF, Porto EMV, Alves DD, Vitor CMT, Aspiazú I (2013) Morphogenetic characteristics of three *Brachiaria brizantha* cultivars submitted to nitrogen fertilization. Anais da Academia Brasileira de Ciências. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652013005000004>
- Silveira RR, Santos MV, Ferreira EA, Santos JB, Silva LD (2017) Chlorophyll fluorescence in *Brachiaria decumbens* and *Brachiaria ruziziensis* submitted to herbicides. Planta Daninha. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-83582017350100042>
- Souza MST, Baura VA, Santos AS, Fernandes-Junior PI, Reis Junior FB, Marques MR, Paggi GM, Brasil MS (2017) *Azospirillum* spp. from native forage grasses in Brazilian Pantanal floodplain: biodiversity and plant growth promotion potential. World Journal of Microbiology and Biotechnology. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-017-2251-4>.
- Souza PT (2014) Inoculação com *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada em *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. Dissertação, Universidade Federal de Goiás
- Souza SA, Xavier AA, Costa MR, Acleide MS, Cardoso AMS, Pereira MCT, Nietsche S (2013) Diversidade bacteriana endofítica em raízes de bananeira 'Prata Anã' (*Musa* spp.). Genética e Biologia Molecular. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013000200016>
- Tagg JR, Mc Given AR (1971) Assay system for bacteriocins. Publicado por Applied Microbiology. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC377313/>>. Acessado em: 9 jan. 2020.
- Taiz L, Zeiger E (2013) Fisiologia vegetal. Artmed, Porto alegre.
- Tortora ML, Díaz-Ricci JC, Pedraza RO (2012) Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. Plant and Soil. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-011-0916-6>
- Wani PA, Shan MS, Zaidi A (2007) Co-inoculation of nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria to promote growth, yield and nutrient uptake in chickpea. Acta Agronomica Hungarica. <https://dx.doi.org/10.1556/AAgr.55.2007.3.7>

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de *A. brasilense* e *Bacillus* sp. de forma conjunta promove maiores resultados quanto ao teor de clorofila, massa seca de raiz e comprimento de raiz quando inoculados nas sementes.

As características produtivas e fotossintéticas não são influenciadas quanto a forma de inoculação das bactérias, podendo ser utilizadas tanto via sementes, quanto via pulverização foliar.

As BPCV utilizadas de forma conjunta, proporcionaram maior produção de biomassa pelo sinergismo entre as bactérias, proporcionando maior absorção de nutrientes pelas plantas.

A inoculação simultânea com *Azospirillum* e *Bacillus*, no capim-marandu, proporciona benefícios quanto ao funcionamento do aparato fotossintético e produtivos, quando não se dispõe de adubação com fontes de nitrogênio, permitindo redução do estresse pela deficiência nitrogenada.

Proporciona ainda maiores taxas fotossintéticas e aproveitamento de elétrons por unidade de tempo no fotossistema II.

Os resultados desta pesquisa reforçam o papel das BPCV, na indução de respostas positivas quanto a melhoria no funcionamento da fotossíntese em plantas não adubadas, apresentando-se como alternativa sustentável para obtenção de ganhos por área e redução da degradação de pastagens. Ressalta-se a necessidade de avaliação em campo para validação dos resultados perante condições práticas naturais.