

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

Tiago João Tonin

**VALOR NUTRITIVO E PRODUÇÃO DE SILAGEM DE MILHO E  
SORGO INOCULADOS COM *Azospirillum brasilense***

Santa Maria, RS  
2020

**Tiago João Tonin**

**VALOR NUTRITIVO E PRODUÇÃO DE SILAGEM DE MILHO E SORGO  
INOCULADOS COM *Azospirillum brasilense***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Zootecnia**.

Orientador: Profº. Dr. Julio Viégas

Santa Maria, RS  
2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Finance Code 001

Tonin, Tiago João

Valor nutritivo e produção de silagem de milho e sorgo inoculados com *Azospirillum brasilense* / Tiago João Tonin.- 2020.

72 p.; 30 cm

Orientador: Julio Viégas

Coorientadores: Leila Picolli da Silva, Gilberto Vilmar Kosloski

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Zootecnia, RS, 2020

1. Bactérias promotoras de crescimento das plantas 2. Fitohormônios 3. Silagem 4. Carboidratos 5. Nitrogênio  
I. Viégas, Julio II. Picolli da Silva, Leila III. Kosloski, Gilberto Vilmar IV. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos a Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt attá CRB 10/1728.

Declaro, TIAGO JOÃO TONIN, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade entre outras consequências legais.

**Tiago João Tonin**

**VALOR NUTRITIVO E PRODUÇÃO DE SILAGEM DE MILHO E SORGO  
INOCULADOS COM *Azospirillum brasilense***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Zootecnia**.

**Aprovado em 20 de março de 2020**

---

**Julio Viégas**, Dr. (UFSM) (Presidente/Orientador) – Videoconferência

---

**Clair Jorge Olivo**, Dr. (UFSM)

---

**Fernando Reimann Skonieski**, Dr. (UTFPR) – Videoconferência

---

**Gilmar Roberto Meinerz**, Dr. (UFFS)

---

**Rogério Fôlha Bermudes**, Dr. (UFPEl) – Videoconferência

Santa Maria, RS  
2020

## **AGRADECIMENTOS**

- À CAPES
- À Universidade Federal de Santa Maria;
- Ao departamento de Zootecnia e PPGZ – UFSM;
- Ao meu orientador, professor Dr. Julio Viégas;
- Aos colegas do GEAPA, especialmente às colegas de pós graduação, Stela e Larissa.
- À Total Biotecnologia pelo fornecimento do inoculante AzTotal.

## RESUMO

### VALOR NUTRITIVO E PRODUÇÃO DE SILAGEM DE MILHO E SORGO INOCULADOS COM *Azospirillum brasilense*

AUTOR: Tiago João Tonin  
ORIENTADOR: Julio Viégas

As bactérias promotoras de crescimento das plantas (BPCP), especialmente *Azospirillum brasilense*, apresentam potencial de uso para o aumento da produtividade de grãos e biomassa em plantas de milho e sorgo. Este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a inoculação com *A. brasilense* em sementes de híbridos de milho e sorgo para produção de silagem, no que tange a produtividade e morfologia das plantas na colheita; qualidade bromatológica e digestibilidade das silagens; estimativas de produção de energia, eficiência alimentar e produção de leite. Os híbridos de milho AG 8690 e AG 8780 e os híbridos de sorgo AG 2005 e ADV 2499 foram inoculados com estirpes AbV5 e AbV6 da bactéria *A. brasilense* utilizando inoculante líquido AzTotal®. O estudo foi conduzido nas safras 2016/2017 (milho e sorgo) e 2017/2018 (milho) utilizando um delineamento em blocos ao acaso, com tratamentos compostos pelos híbridos inoculados *versus* não inoculados que foram avaliados para produção de silagem. Para a ensilagem foi avaliada a produção e o teor de matéria seca (MS), a participação dos componentes botânicos e a morfologia das plantas no momento da colheita. Nas silagens foi realizada a análise química com partição de carboidratos e proteína, digestibilidade *in vitro* da MS, pH, nitrogênio (N) amoniacal e recuperação da MS (RMS). Com o modelo MILK 2006 estimou-se o teor energético e o potencial de produtividade de leite das silagens. Foi avaliada também a eficiência de utilização do N para a produção de silagem e estimativa de leite. Para a silagem, não foi observado aumento na produção de MS com a inoculação em ambas as culturas testadas, com médias de 16.760 kg MS ha<sup>-1</sup> para a cultura do milho e 13.398 kg MS ha<sup>-1</sup> para a cultura do sorgo. A inoculação aumentou a altura final das plantas, diâmetro e comprimento nas espigas das plantas de milho, o diâmetro de colmo e o tamanho de panícula nas plantas de sorgo. As silagens tiveram influência da inoculação no fracionamento dos carboidratos, com o aumento dos teores de fibra em detergente ácido e neutro nas silagens de milho e sorgo, respectivamente. O teor de amido nas silagens de milho oriundas de plantas inoculadas foi maior, o que ocasionou melhoria do teor de energia, eficiência alimentar e produtividade estimada de leite por área. Foi observado aumento no teor de proteína bruta na silagem do híbrido de sorgo AG 2005 inoculado. Na silagem de sorgo, não foram observadas melhorias na digestibilidade da MS, teor de energia e estimativas no potencial de produção de leite com o uso da inoculação com *A. brasilense*. A inoculação não aumentou a produção de silagem nos híbridos de milho e sorgo, mas induziu às alterações morfológicas das plantas. Maior teor de amido e energia nas silagens de milho e aumento da PB na silagem do híbrido de sorgo AG 2005 foram resultantes da inoculação com *A. brasilense* nas sementes dos híbridos ensilados.

**Palavras-chave:** BPCP, Carboidratos. Fitohormônios. Nitrogênio.

## ABSTRACT

### NUTRITIVE VALUE AND SILAGE PRODUCTION IN CORN AND SORGHUM INOCULATED WITH *Azospirillum brasilense*

AUTHOR: Tiago João Tonin

ADVISOR: Julio Viégas

Use of plant growth promoting bacteria (BPCP), especially *Azospirillum brasilense*, have potential in increase grain and biomass productivity in corn and sorghum plants. This study was conducted with the objective of evaluating the inoculation with *A. brasilense* in seeds of corn and sorghum hybrids for silage production, regarding the productivity and morphology of the plants at harvest; bromatological quality and digestibility of silages; estimates of energy production, food efficiency and milk production. Corn hybrids AG 8690 and AG 8780 and sorghum hybrids AG 2005 and ADV 2499 were inoculated with strains AbV5 and AbV6 of the *A. brasilense* bacteria using liquid inoculant AzTotal®. The study was conducted in the 2016/2017 (maize and sorghum) and 2017/2018 (maize) seasons using random block design with treatments composed by inoculated *versus* non-inoculated hybrids that were evaluated for silage production. For silage, production and dry matter (DM) content, botanical component participation and plant morphology at harvest time were evaluated. In silages, chemical analysis with carbohydrate and protein partition, *in vitro* digestibility of DM, pH, ammoniacal nitrogen (N) and recovery of MS (DMR) were performed. With the MILK 2006 model, the energy content and milk yield potential of silages were estimated. The efficiency of using N for silage production and milk estimation was also accessed. For silage, no increase in DM production was observed with inoculation in both tested crops, with averages of 16,760 kg DM ha<sup>-1</sup> for maize and 13,398 kg DM ha<sup>-1</sup> for sorghum. Inoculation increased final plant height, diameter and length in the ears of maize plants, stem diameter and panicle size in sorghum plants. Silages were influenced by inoculation on carbohydrate fractionation, with increased fiber content in acid and neutral detergent in maize and sorghum silages respectively. The starch content in corn silages from inoculated plants was higher, resulting in improved energy content, feed efficiency and estimated milk yield per area. An increase in crude protein (CP) content was observed in the silage of the inoculated AG 2005 sorghum hybrid. In sorghum silage, no improvement in DM digestibility, energy content and estimates of milk production potential was observed with the use of inoculation with *A. Brasilense*. Inoculation did not increase silage production in corn and sorghum hybrids, but induced morphological changes in the plants. Increased starch and energy content in corn silages and increased CP in sorghum hybrid AG 2005 were the result of inoculation with *A. brasilense* in the seeds of ensiled hybrids.

**Keywords:** Carbohydrates. Fitohormones. Nitrogen. PGPB.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	10
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES</b> .....	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>12</b>
4.1	MICROORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS ENDOFÍTICOS ASSOCIATIVOS... 12	
4.2	AZOSPIRILLUM: EFEITOS NA REGULAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS PLANTAS .....	13
4.2.1	<b>Auxinas</b> .....	14
4.2.2	<b>Giberelinas</b> .....	16
4.2.3	<b>Outros compostos reguladores de crescimento relacionados as BPCP</b> 17	
4.3	AZOSPIRILLUM: FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	19
4.4	AZOSPIRILLUM: EFEITOS SOMATÓRIOS E NA NUTRIÇÃO DAS PLANTAS DE MILHO E SORGO.....	20
4.5	SILAGENS DE MILHO E SORGO: ASPECTOS PRODUTIVOS E NUTRICIONAIS PARA VACAS LEITEIRAS .....	23
<b>5</b>	<b>ARTIGO 1 - INOCULAÇÃO COM AZOSPIRILLUM BRASILENSE EM HÍBRIDOS DE MILHO PARA PRODUÇÃO DE SILAGEM DE PLANTA INTEIRA</b> .....	<b>26</b>
<b>6</b>	<b>ARTIGO 2. INOCULAÇÃO COM AZOSPIRILLUM BRASILENSE EM HÍBRIDOS DE SORGO PARA PRODUÇÃO DE SILAGEM DE PLANTA INTEIRA</b> .....	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de silagens na pecuária leiteira, prática importante no processo de intensificação da atividade, principalmente em sistemas de produção em confinamento ou ainda em sistemas semi-intensivos como forma de complementação volumosa. Dentre os cereais para ensilagem destacam-se o milho e o sorgo, ambos com sistemas de produção mecanizado e padronizado, com manejo prático de cultivo e com genótipos de elevada qualidade, resultando em silagens de excelente valor nutricional e potencial de resposta produtiva em leite (BERNARDES e DO RÊGO, 2014).

No campo, práticas agrícolas que auxiliem no aumento da produtividade das culturas com maior aproveitamento dos recursos e diminuindo as perdas ao ambiente devem ser estimuladas, pois resultam em maior eficiência produtiva, auxiliando na sustentabilidade dos sistemas de produção (HAYAT et al., 2010). Neste sentido, a inoculação em cereais com bactérias diazotróficas endofíticas tem sido considerada uma alternativa interessante no crescimento e produtividade final de culturas agrícolas (BASHAN e BASHAN, 2010; CASSÁN e DIAZ-ZORITA, 2016). Este tipo de inoculação tem destaque principalmente em culturas como trigo, milho, arroz e cana de açúcar, como auxiliar no incremento da produção e melhor aproveitamento de nutrientes. Embora as culturas acima citadas são as que se destacam em pesquisas, outras culturas podem beneficiar-se da inoculação, como por exemplo o sorgo e outras forrageiras (BALDANI e BALDANI, 2005; HUNGRIA et al., 2010).

Dentre as espécies de bactérias, as do gênero *Azospirillum* spp. tem tido notado destaque pelo incremento da produtividade das culturas (CASSÁN e GARCÍA DE SALAMONE, 2008). O surgimento de inoculantes comerciais com estirpes de *Azospirillum brasilense* constituiu um importante passo na difusão desta tecnologia para os produtores (HUNGRIA et al., 2010; CASSÁN e DIAZ-ZORITA, 2016). Os mecanismos de ação para o incremento da produção de grãos do *A. brasilense* incluem a fixação de nitrogênio, produção de fitohormônios e outras substâncias químicas reguladoras de crescimento das plantas. Isto tem levado ao aumento da superfície radicular, aumento de área foliar fotossinteticamente ativa, resistência a patógenos, deficiência hídrica e salinidade, entre outros, efeitos que beneficiam a resposta fisiológica das plantas (BALDANI e BALDANI, 2005;

DOBBELAERE e OKON, 2007; CASSÁN e GARCÍA DE SALAMONE, 2008; BASHAN e BASHAN, 2010).

Estes mecanismos descritos com a inoculação geralmente resultam em aumento da produtividade relacionada a grãos e biomassa nas principais culturas. Os efeitos em aumentar a produtividade de MS da parte aérea das plantas podem também ser observados quando as plantas são destinadas para silagem (SKONIESKI et al., 2017; NAKAO et al., 2018). Acredita-se que a inoculação possa beneficiar no aumento da produção de biomassa de milho e sorgo para silagem, com alteração nos componentes morfológicos das plantas no ensilamento. Isto pode alterar a qualidade nutricional das silagens e levar a alterações importantes na digestibilidade e estimativas de produção dos animais.

Os avanços na nutrição animal de ruminantes tem proporcionado fracionar os alimentos com o intuito de desenvolver modelos que possam prever com boa precisão o aproveitamento dos nutrientes e a cinética de degradação no trato digestivo. Os carboidratos e proteína são os principais nutrientes e o fracionamento destas frações de acordo com suas características de degradação são essenciais para aumentar a eficiência alimentar, maximizar a produção e minimizar as perdas ao meio ambiente (NRC, 2001; FOX et al., 2004). Através do fracionamento e utilização de modelos matemáticos é possível mensurar os possíveis efeitos da inoculação no valor nutricional das silagens e estimar os impactos na produtividade de leite e eficiência de utilização de recursos (SCHWAB et al., 2003).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos da inoculação de estirpes de *Azospirillum brasilense* em híbridos de milho e sorgo cultivados com propósito para confecção de silagens, com foco na avaliação estrutural das plantas, produtividade, qualidade nutricional das silagens e simulação de estimativas de produção de energia, leite e uso de nitrogênio.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Mensurar a produção de silagens de híbridos de sorgo e milho inoculados com *Azospirillum brasilense*;

Verificar alterações nos padrões estrutural e botânico das plantas no momento do corte para silagens;

Avaliar os atributos bromatológicos, qualidade fermentativa e a digestibilidade na matéria seca das silagens confeccionadas a partir dos cereais inoculados;

Realizar a partição de carboidratos e nitrogênio solúvel e frações insolúveis;

Estimar, via modelagem, o valor energético das silagens, o potencial de conversão de MS em leite, a produtividade de leite por hectare;

Estimar a eficiência de utilização do nitrogênio disponível para de silagem e estimada de leite.

### 3 HIPÓTESES

As sementes de milho e sorgo quando submetidas à inoculação com *Azospirillum brasilense* geram plantas com maior vigor aumentando a produção de forragem;

A inoculação com *A. brasilense* modifica a composição estrutural das plantas para ensilagem;

A forragem oriunda de plantas inoculadas com *A. brasilense* altera os padrões químicos e de produção de silagem;

As silagens oriundas das plantas de milho e sorgo inoculadas com *A. brasilense* possuem distintos potenciais para produção de leite e fornecimento de energia aos animais.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 MICRORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS ENDOFÍTICOS ASSOCIATIVOS

Microrganismos diazotróficos são de vida livre, associativa ou simbiótica e sua importância em parte se dá pela promoção da ciclagem de nutrientes no solo (BALDANI e BALDANI, 2005; CASSÁN e GARCÍA DE SALAMONE, 2008; BASHAN e BASHAN, 2010). Muitos gêneros de microrganismos têm sido descritos como associativos com plantas superiores. Incluem-se nesta lista os gêneros *Azospirillum*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Beijerinckia*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Klebsiella*, *Agrobacterium*, *Enterococcus* e *Enterobacter* (CASTILHO et al., 2015).

Embora microrganismos associativos já tivessem sido identificados anteriormente em solos de outras partes do mundo, a pesquisadora Johanna Döbereiner foi pioneira em estudar a associação de microrganismos com gramíneas no Brasil. O mais importante ponto desta associação, segundo suas pesquisas iniciais, bactérias do gênero *Azotobacter* sp. se associavam à gramínea *Paspalum notatum*, havendo a possibilidade de fixar nitrogênio atmosférico na forma assimilável nas raízes dessas plantas, ao passo que essas proviam substratos energéticos para desenvolvimento dos microrganismos no sistema radicular (DÖBEREINER, 1966; DÖBEREINER et al., 1975).

Microrganismos do gênero *Azospirillum* são descritos como diazotróficos associativos endofíticos, ou seja, se associam as plantas, promovem a fixação biológica do N<sub>2</sub> transformando-o na forma disponível NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e podem colonizar no interior dos tecidos das plantas. Sua importância agrônômica acontece por dois mecanismos: fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) e produção de substâncias promotoras de crescimento das plantas. Posteriormente à FBN, as bactérias do gênero *Azospirillum* foram designadas como promotoras de crescimento das plantas (BPCP) (CASTILLO et al., 2015) (CASSÁN e DIAZ-ZORITA, 2016).

Quatorze espécies dentro do gênero *Azospirillum* foram identificadas e descritas: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense*, *A. largomobile*, *A. doebereineriae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. canadense*, *A. zaeae*, *A. rugosum*, *A. picis*, *A. thiophilum* e *A. largomobile*. A descoberta dessas

espécies e suas características na maioria das ocasiões ocorreu concomitante com as espécies de plantas com as quais essas bactérias possuíam alguma associação, dentre elas: *Zea Mays*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor* L. Moench, *Triticum aestivum* L., *Saccharum officinarum* L., *Hordeum vulgare* L., *Miscanthus sinensis*, *Panicum maximum*, *Brachiaria mutica*, *Pennisetum purpureum*, *Brachiaria brizantha*, *Digitaria* sp., entre outras espécies.

#### 4.2 AZOSPIRILLUM: EFEITOS NA REGULAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS PLANTAS

As bactérias do gênero *Azospirillum* são gram negativas, possuem forma espiral, com flagelos e ocasionalmente cílios. São encontradas em vários locais no globo terrestre habitando a microbiota de diferentes tipos de solos (HUERGO et al., 2008). Inicialmente, a identificação desses microrganismos associados às plantas permitiram associar estes a fixação biológica de nitrogênio atmosférico, tornando disponível para assimilação no sistema radicular destas (BALDANI e BALDANI, 2005). Posteriormente, foi verificado que os microrganismos tinham relação com a concentração de outras substâncias em tecidos e fluidos das plantas. Dentre estas substâncias estavam fitohormônios, os quais estão relacionados com mecanismos de regulação no crescimento e diferenciação nas células vegetais (CASSÁN et al., 2014). A produção de fitohormônios, principalmente auxinas e giberelinas, derivada da relação entre as plantas e bactérias do gênero *Azospirillum* é descrita como importante na modulação do crescimento vegetal (BASHAN e BASHAN, 2010).

A regulação do desenvolvimento das plantas é considerado um multifator fisiológico decorrente de condições de meio específicas que envolvem nutrição, genética e transformação de energia. A maior parte desses fatores é regulada por mecanismos intrínsecos das plantas, geralmente fitohormônios e complexos enzimáticos, os quais fazem a transformação, partição, condução e alocação de nutrientes em locais específicos de acordo com o estágio de crescimento das plantas (TAIZ e ZIEGER, 2013). Fitohormônios são compostos orgânicos sintetizados que quando transportados a outros tecidos e ou órgãos causam resposta fisiológica específica no sistema (SALISBURY e ROSS, 1991). Entre os fitohormônios e outras substâncias químicas que o gênero *Azospirillum* é capaz de induzir à produção estão as auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico, etileno,

ácido jasmônico, ácido salicílico, brassinosteróides, óxido nítrico, estrigalactonas (BASHAN e BASHAN, 2010; CASTILHO et al., 2015).

#### 4.2.1 Auxinas

O termo auxina é originário da palavra grega “auxein”, que remete a aumentar, incrementar ou desenvolver. Por este motivo, as auxinas são compostos que induzem ao alongamento de tecidos guiados principalmente pelo fototropismo (SALISBURY e ROSS, 1991). As auxinas agem através da divisão, extensão e diferenciação de células e tecidos vegetais (CASTILHO et al., 2015). A maior parte das vias de síntese tem o triptofano como precursor, a qual ocorre principalmente através da remoção do grupo aminoácido e carboxílico terminal da cadeia do mesmo. O triptofano é encontrado como um exsudato radicular das plantas, então pode ser utilizado como fonte de aminoácido pelos microrganismos na microbiota do solo (BASHAN e BASHAN, 2010).

A principal auxina relacionada à inoculação com BPCP é o ácido indolacético (AIA) e a principal via de obtenção de AIA pelas plantas é na sua rizosfera (CASSÁN et al., 2014). A movimentação do AIA entre tecidos é feita principalmente através das células do parênquima que estão em contato com os feixes vasculares, e destes para outros tecidos. A concentração de AIA no sistema radicular normalmente é parecida com a encontrada em outros órgãos e tecidos das plantas. O transporte deste composto de outros tecidos para as raízes ou aplicação exógena deste fitohormônio foi descrito como importante no maior desenvolvimento radicular não apical, principalmente de raízes adventícias a partir dos colmos (SALISBURY e ROSS, 1991).

Além dos efeitos no sistema radicular, este fitohormônio está ligado também à aceleração da taxa de formação do xilema, o que favorece o transporte de água e solutos das raízes para os demais órgãos e tecidos. O AIA promove alongamento de seções de coleótilos guiadas pela luz em plantas de milho e trigo e também em colmos de outras espécies (SALISBURY e ROSS, 1991). De maneira mais geral as auxinas controlam o processo de crescimento vegetativo (BASHAN e BASHAN, 2010). O termo “*wall loosening*” foi descrito como o efeito plástico do crescimento expansivo de células tratadas com auxinas, devido ao afrouxamento da parede celular. Outra hipótese é um mecanismo chamado de *acid-growth hypotesis* no qual

relata que a redução do pH permite que enzimas que degradam a parede celular sejam ativadas o que facilita o processo de extensão do tecido dependente do potencial de água (SALISBURY e ROSS, 1991).

Aumento da concentração de AIA foi observado em meio de cultivo de microalgas com *A. brasilense*, o que levou ao aumento de atividade enzimática aumentando a pigmentação fotossintética e levando ao aumento do metabolismo, medido pela maior produção de oxigênio pelas plantas (HUERGO et al, 2008). Bashan e Bashan (2010) descreveram pontos relevantes sobre a relação entre bactérias do gênero *Azospirillum* sp. e a produção de AIA em plantas, a partir principalmente de estudos *in vitro*. Muitas estirpes do gênero produzem AIA e a aplicação de AIA exógena produz os mesmos sinais morfológicos derivados da inoculação com *Azospirillum* (TIEN et al., 1979; CASSÁN et al., 2014). Entretanto alguns estudos não encontraram efeitos da inoculação no aumento da concentração de AIA e ainda relatam a dificuldade de demonstrar se a concentração de AIA em plantas é derivada da inoculação ou por outro fator fisiológico (BASHAN e BASHAN, 2010)

Em um dos principais estudos com o gênero *Azospirillum brasilense* estirpes Sp 245 e Sp7 foi constatado que altas concentrações do inóculo ( $10^6$  a  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>) restringiram o crescimento do sistema radicular apical. Do mesmo modo a aplicação de AIA exógena restringiu o crescimento radicular similarmente à inoculação. Entretanto, em ambos, inoculação e AIA foram responsáveis isoladamente pela expansão fascicular e em diâmetro da raiz pivotante. A concentração de AIA em  $10^9$  e  $10^8$  bactérias por ml de inóculo produziram os mesmos sintomas na raízes (DOBBELAERE et al., 1999). Os efeitos do AIA quando é produzido pelas bactérias é decorrente quando os níveis de AIA na rizosfera estão muito abaixo dos níveis desejados, uma vez que níveis muito elevados podem produzir efeitos deletérios no crescimento das plantas (CASSÁN et al., 2014).

Fatores bióticos e abióticos influenciam na capacidade de produção de auxinas na rizosfera das plantas, guiados por fatores ambientais de estresse e interação planta bactéria. Estes fatores incluem acidificação, disponibilidade de fontes de carbono, moléculas produzidas pelas plantas em situação de estresse, baixo conteúdo de carbono, pH ácido, diminuição na taxa de crescimento das plantas e multiplicação bacteriana. Todos esses fatores podem induzir a produção de AIA por *A. brasilense* (CASSÁN et al., 2014).

#### 4.2.2 Giberelinas

Giberelinas (GAs) foram descobertas em plantas de arroz que possuíam crescimento acelerado. A indução do crescimento acelerado era causado pela infecção do fungo *Giberella fujikuroi* o qual a partir da extração do composto promotor da desordem de crescimento originou o nome Giberelina. Este fitohormônio também foi encontrado em tecidos de plantas sem infecção, principalmente em sementes em estágios iniciais de desenvolvimento, embora outras células das plantas tenham a capacidade de sintetizá-los. Por isso a quebra de dormência das sementes também é efeito relacionado às GAs (SALISBURY e ROSS, 1991).

Folhas jovens quando cortadas e tratadas com GAs experimentam crescimento mais rápido de colmos quando comparadas as que não recebem a indução hormonal. O fato é que existe um mecanismo de transporte hormonal das folhas para o colmo. Nas raízes também pode haver síntese de GAs, mas nesses órgãos os efeitos não são positivos, podendo levar a inibição do crescimento de raízes adventícias (SALISBURY e ROSS, 1991). Portanto, os efeitos da GAs induzidos pela inoculação com *A. brasilense* é mais relacionado às características endofíticas em tecidos e órgão aéreos das plantas.

Algumas plantas que possuem entrenós mais curtos experimentaram além de maior crescimento, entrada precoce em estágio de florescimento, demonstrando a aceleração do processo vegetativo das plantas pela ação de GAs. Os mecanismos de ação das GAs em estimular o crescimento são: estímulo a divisão celular no ápice devido à rápida troca de fases de desenvolvimento; incremento no metabolismo de transformação de substâncias compostas em compostos nutritivos mais simples tornando facilmente assimiláveis como fonte energética; incremento da plasticidade das células da parede celular das plantas. Assim como nas auxinas, alguns desses fatores ajustam o potencial de água para a forma negativa, o que leva ao incremento da necessidade de transporte de água para dentro das células, causando a expansão acelerada (SALISBURY e ROSS, 1991).

Estudos comprovaram a biossíntese de GAs como resposta da inoculação com espécies de *Azospirillum* na promoção de crescimento de plantas (CASTILHO et al., 2015). Alguns trabalhos tem ligado a melhoria da germinação em algumas

culturas quando as sementes são inoculadas com *Azospirillum* sp., haja vista evidências que ligam essa bactéria à maior concentração de GAs. A melhoria da germinação seria a indução deste fitohormônio na produção da enzima  $\alpha$ -amilase, levando à quebra de moléculas de amido a glicose, fonte primária de energia para germinação das plântulas (BASHAN e BASHAN, 2010)(CASSÁN et al., 2014).

A inoculação com *A. brasilense*, bem como com outras BPCP, já teve demonstrada a capacidade de produção de GAs em estudos *in vitro*, suportando a ideia de alteração do crescimento das plantas devido a essa interação. Entretanto enzimas envolvidas na glicólise parecem ser necessárias para que haja ação das GAs. Mudanças na composição do solo que levam a depleção da areação, como saturação por água, com conseqüente redução nos níveis de O<sub>2</sub> diminuem drasticamente a capacidade de produção de GAs pelas bactérias. Devido a isso, a inoculação tem sido relatada diretamente com maior resistência a períodos de estiagem pelas plantas. Mecanismos de crescimento radicular ou crescimento diferenciado oriundo da presença de GAs podem estar associados GAs para ocasionar tal efeito (CASSÁN e GARCÍA DE SALAMONE, 2008; BASHAN e BASHAN, 2010).

#### **4.2.3 Outros compostos reguladores de crescimento relacionados as BPCP**

Outros compostos que podem ser classificados como fitohormônios ou compostos químicos os quais alteram o desenvolvimento das plantas podem ser induzidos pela inoculação com *A. brasilense*. Dentre eles estão as citocininas, ácido abscísico, etileno, poliaminas entre outros.

As citocininas são fitohormônios da classe das purinas e foram relacionadas com a inoculação com bactérias diazotróficas pela similaridade de efeitos decorrentes da indução exógena do fitohormônio ou da produção *in vitro* por *Azospirillum* sp. (TIEN et al., 1979). O nome citocininas provém do termo citocinese, que é a divisão de células eucariotas. Além da divisão celular essas substâncias estão envolvidas na formação radicular principal, principalmente quando a relação citocininas/AIA é elevada. Estes compostos também favorecem o retardo na senescência das plantas por mecanismos que mantêm a integridade da membrana do vacúolo (SALISBURY e ROSS, 1991).

A grande maioria das bactérias presentes na rizosfera das plantas possuem a capacidade de produção de compostos como as citocininas, pois possuem em sua estrutura moléculas com adenina (CASTILHO et al., 2015). A inoculação e aplicação exógena de citocininas produzem efeitos similares no sistema radicular de plantas (Pearl Millet), com modificações na estrutura e no padrão de desenvolvimento (TIEN et al., 1979).

O ácido abscísico se origina basicamente pela mesma via de produção das GAs (SALISBURY e ROSS, 1991). Sua biossíntese ocorre nos cloroplastos e outros plastídios, e tem sido encontrado como subproduto oriundo de algumas estirpes de *A. brasilense*. Esse fato tem evidenciado aumento da resistência de plantas as condições estressantes de meio, como salinidade, déficit hídrico e aquecimento. Isso porque o transporte das raízes para outros órgãos causa mudanças na pressão osmótica e fechamento de estômatos (BASHAN e BASHAN, 2010).

Poliaminas, especialmente cadaverina, espermidina, espermina e putrescina, são derivadas do aminoácido lisina e foram encontradas em meio inoculados com *A. brasilense*. A falta desse composto pode levar a interrupção no crescimento celular (BASHAN e BASHAN, 2010).

A quebra de dormência das sementes e o retardo no crescimento são fenômenos ligados ao etileno. Também, a maturação dos frutos é acelerada pela presença deste fitohormônio volátil (SALISBURY e ROSS, 1991). Entretanto, durante a maior parte do crescimento e desenvolvimento das plantas a atuação desse fitohormônio é mínima, exceto em condições de estresse ao meio. A relação do gênero *Azospirillum* spp. com etileno está ligada com a capacidade das estirpes em produzir AAC desaminase, enzima capaz de quebrar o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, precursor do etileno (BASHAN e BASHAN 2010; GLICK, 2014).

Tortora et al. (2011) encontraram produção de ácido salicílico decorrentes da inoculação com *A. brasilense*. Este é um ácido produzido por diversos gêneros de bactérias e tem sido relacionado com diversas atividades fisiológicas nas plantas como regulação de temperatura, mecanismos de abertura e fechamento de estômatos, germinação de sementes. O aumento da resistência aos patógenos também foi observado em plantas inoculadas com *A. brasilense*, estando relacionado ao ácido salicílico.

#### 4.3 AZOSPIRILLUM: FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O intuito inicial das pesquisas com microrganismos do solo foi estabelecer a contribuição das bactérias associativas baseado no diazotrofismo em gramíneas, similarmente ao que ocorria com a relação de simbiose das bactérias do gênero *Rhizobium* em leguminosas. A observação de que plantas do gênero *Paspalum* se mantinham mais verdes e possuíam maior teor de N em sua composição fazia surgir então a possibilidade de que as bactérias encontradas fixariam N nas raízes (DÔBEREINER, 1966). Assim, bactérias do gênero *Azospirillum* e outros gêneros teriam a capacidade de fornecer N para as gramíneas a partir da transformação do N<sub>2</sub> para amônio (BALDANI e BALDANI, 2005; HUERGO et al., 2008).

Dôbereiner (1966, p. 363 e 364) descreve em seu estudo as condições ideais de meio para que o desenvolvimento e a fixação do N ocorra,

“Ótimo ou bom desenvolvimento é obtido em meio sem N (Lipman mod.) com glicose, sacarose, galactose, maltose, metanol, butanol, etanol, manitol, glicerol, lactato, acetato, citrato, amido e dextrina [...] Em relação ao oxigênio o organismo se comporta como as outras espécies de *Azotobacter* [...] Verifica-se que tanto desenvolvimento como fixação de N do novo organismo são acelerados pela aeração do meio [...] Temperaturas bastante elevadas proporcionaram ótimo desenvolvimento do novo organismo [...] O novo organismo mostrou ótimo crescimento em pH 6.6 não tendo mostrado desenvolvimento abaixo do pH 5.5.”

Posteriormente, a relação da fixação de N com as bactérias se baseou também no aumento da concentração de N em grãos e folhas, com alteração no equilíbrio da concentração deste nutriente nas plantas e a redução da quantidade necessária do mesmo da fertilização exógena (CASSÁN e DIAZ-ZORITA, 2016). A utilização da redução com acetileno e em seguida a utilização do isótopo N<sup>15</sup> puderam estabelecer uma relação mais direta do diazotrofismo com o gênero *Azospirillum* (BALDANI e BALDANI, 2005).

Na fixação biológica, a inoculação com BFN tem papel na presença e atividade da enzima nitrogenase no sistema radicular da plantas, catalisando N<sub>2</sub> para forma de N assimilável pelas plantas, NH<sub>3</sub> (BHATTACHARJEE et al., 2008). A conversão do N<sub>2</sub> em NH<sub>3</sub> pela enzima muitas vezes é restrita devido ao alto gasto energético do processo, a presença de altas quantidades de amônio no meio ou condições restritivas a presença de O<sub>2</sub> (HUERGO et al., 2008). Assim a contribuição de *A. brasilense* para a fixação de nitrogênio é variável, dependente dos fatores

citados, estando geralmente entre 5 a 18% do total de N disponível às plantas e em muitos casos, não é identificada nenhuma contribuição (DOBEREINER, 1990). Estudos avaliando performance produtiva das culturas tem utilizado tratamentos com doses distintas de adubação nitrogenada. Em alguns casos com menores doses de N via fertilização, foi atribuído a melhoria em alguns parâmetros específicos de produção à FBN (BALDANI e BALDANI, 2005).

A redução do nitrato pela enzima nitrato redutase é o mecanismo proposto que explica o acúmulo de nitrogênio em folhas de algumas espécies de plantas quando são inoculadas com certas estirpes de *Azospirillum* (HUERGO et al., 2008). Isto porque após a absorção, as folhas são os órgãos que mais armazenam o N absorvido para posterior desaminação (BREDEMEIER e MUNDSTOCK, 2000).

Estudos controlados e em campo, usando mutantes negativos a enzima nitrato redutase, comprovaram que a assimilação de nitrato nas raízes e o seu conteúdo de N nas folhas, foi maior para plantas inoculadas (HUERGO et al., 2008). Embora não tenham encontrado melhorias nos parâmetros produtivos em trigo quando inoculados com *A. brasilense*, Galindo et al. (2017) obtiveram aumento do N residual na palhada, o que segundo os autores se refere a um efeito da FBN, a qual aumenta a capacidade da planta em recuperar este nutriente.

#### 4.4 AZOSPIRILLUM: EFEITOS SOMATÓRIOS E NA NUTRIÇÃO DAS PLANTAS DE MILHO E SORGO

A fixação de N<sub>2</sub> pode ocorrer conjuntamente com a produção de fitormônios, especialmente o AIA, causando aumento na produção de biomassa em vários órgãos das plantas. Assim, o termo “efeito aditivo” foi sugerido devido ao sinergismo de efeitos que podem acontecer decorrente da associação de microrganismos diazotróficos com a maioria das plantas. Esta descrição de efeito aditivo da inoculação é suportada principalmente pela similaridade dos efeitos entre substâncias promotoras de crescimento e também a fixação de N, que em condições de estudos a campo são de difícil identificação, o que acontece na maioria dos estudos avaliando produtividade e morfologia das plantas inoculadas com *A. brasilense* (BASHAN e BASHAN, 2010).

O efeito mais observado da inoculação é a diferenciação de crescimento de órgãos em plantas inoculadas, principalmente na morfologia do sistema radicular.

Nesse caso é observada maior massa seca, principalmente de raízes adventícias (HUNGRIA et al., 2010). Isto leva a favorecer não somente a maior absorção de substâncias nutritivas, mas também a maior exploração de nutrientes, principalmente menos móveis, no perfil do solo em uma área maior. Este fato é descrito não somente para macronutrientes, mas também para micronutrientes essenciais, bem como para a água. Os nutrientes que são absorvidos tendem a ser mais mobilizados e metabolizados durante os estágios reprodutivos das plantas, o que favorece a deposição dos mesmos nos grãos ocasionando incremento de massa e aumento da produtividade das culturas (TAIZ e ZIEGER, 2013).

A maior área radicular das raízes facilita a captação de água da solução do solo. Isto fica evidente quando plantas de sorgo que eram oriundas de sementes as quais foram inoculadas com *A. brasilense* possuíam maior vigor e turgência quando havia situações de estresse hídrico (PEÑA et al., 2008). A resistência ao estresse hídrico pode provocar retardamento da senescência em plantas.

O macro elemento fósforo (P), essencial nos processos de transformações de energia das plantas, tem recebido importante destaque relacionado a inoculação com *Azospirillum* spp. Pesquisas evidenciaram que algumas espécies de *Azospirillum* estão envolvidas em solubilização de fosfatos (RODRIGUEZ et al., 2004). Há aumento na concentração foliar de P em plantas de milho oriundos de sementes inoculadas com *Azospirillum brasilense* em dois anos de cultivo seguidos enquanto que as concentrações de N não foram afetadas (GALINDO et al., 2015). A capacidade que o inóculo tem em metabolizar polissacarídeos, exsudatos do sistema radicular, pode estar ligada com a facilitação da solubilização de fosfatos em locais com baixos níveis de P. Não somente P, mas outros elementos foram relacionados a melhoria de absorção com a inoculação com *Azospirillum* sp., os quais de grande importância nutricional para as plantas, como magnésio, cálcio, manganês, ferro, cobalto, zinco e cobre (BASHAN e BASHAN, 2010).

Estes efeitos citados foram relatados decorrentes da inoculação. Cada efeito pode ser induzido em diferentes fases de crescimento das plantas. Bem como, são efeitos variados entre espécies, manejo de inoculação e interação com condições ambientais específicas, o que torna o evento associativo por vezes incerto em condições de campo (BASHAN e BASHAN, 2010). Nessas condições, a importância da inoculação se dá baseada no aumento da produtividade das culturas e no aumento da eficiência de utilização de recursos (HAYAT et al., 2010).

As culturas apresentam durante seu crescimento várias fases, as quais tendem em menor ou maior grau estarem sujeitas a fatores de meio que causam estresse. A maioria dos efeitos descritos da inoculação com *Azospirillum* sp. sugere que os efeitos estressores são minimizados nas plantas (CASSÁN e DIAZ-ZORITA, 2016). A grande finalidade da inoculação está em aumentar a produção final das culturas, seja em biomassa ou grãos.

A seleção de estirpes de *A. brasilense* resultou um incremento de até 823 kg ha<sup>-1</sup> de milho em distintos locais no estado do Paraná-Brasil (HUNGRIA et al., 2010). A inoculação também aumenta o vigor das plantas, fazendo com que possuam maior estatura, sementes com maior densidade e incrementando a produtividade de grãos (HUNGRIA et al., 2010; LONGHINI et al., 2016, GALINDO et al., 2016). O teor de açúcares em grãos de milho para consumo humano foi mais elevado com o uso da inoculação com *A. brasilense* (NUMOTO et al., 2019).

Os achados quanto ao conteúdo de N na parte aérea das plantas são diversos, por exemplo, a inoculação não incrementou o teor de N nas folhas e na biomassa em milho (GALINDO et al., 2016; BERTONCELLI et al., 2017). Entretanto, Hungria et al. (2010) observaram que as folhas de milho colhidas e que eram provenientes do tratamento inoculado tinham maior conteúdo de N. Já a concentração de N nas raízes de plantas de sorgo é maior quando há inoculação quando comparado a ausência de adubação nitrogenada (PACOVSKY et al., 1985). O aumento da disponibilidade de N no solo na forma inorgânica aumenta a extração desse elemento pelas plantas e conseqüentemente tem-se maior concentração desse nutriente nas folhas (TAIZ e ZIEGER, 2013). Assim, pode haver a relação de FBN com o aumento de conteúdo de N nas partes aéreas das plantas.

A porcentagem de N nos grãos é maior quando há inoculação com *A. brasilense* segundo Hungria et al (2010). Ao contrário, o estudo de Araújo et al (2015) observou redução da participação deste elemento nos grãos de milho. No mesmo trabalho, a variação da concentração de N nos grãos ocorreu em associação a variação das doses de adubação nitrogenada na cultura, o que pode sinalizar a não ocorrência da FBN.

Similarmente aos efeitos do incremento da adubação nitrogenada há aumento da concentração de P nas folhas de plantas de milho provenientes da inoculação com *A. brasilense* (GALINDO et al., 2016; LONGHINI et al., 2016). O aumento do volume de raízes fasciculadas pode levar a melhor absorção de P em plantas de

sorgo (PACOVSKY et al., 1985), que pode ser ainda maior com altas concentrações de fosfatos disponíveis, facilitando a difusão para as raízes das plantas. Níveis de Zinco (Zn) foram maiores em folhas de plantas de milho inoculadas. O Zn é importante precursor do Triptofano e sua maior presença pode ser indicativo de produção de AIA pelas bactérias (SANTINI et al., 2018).

#### 4.5 SILAGENS DE MILHO E SORGO: ASPECTOS PRODUTIVOS E NUTRICIONAIS PARA VACAS LEITEIRAS

A utilização de forragem conservada na forma de silagem é a melhor forma de preservar o alimento com boa qualidade nutricional e mínimas perdas (YITBAREK e TAMIR, 2014). As silagens podem ser utilizadas como estratégia nutricional a fim de manter constante a qualidade de volumoso fornecido nos vários sistemas de produção de leite. Muitas plantas forrageiras podem ser ensiladas, mais destacadamente milho e o sorgo que possuem sistemas de produção bem estabelecidos, com manejo prático de cultivo e genótipos de elevada produtividade e resistência, resultando em potencial para confecção de silagens de excelente valor nutricional (BERNARDES; DO RÊGO, 2014).

O milho (*Zea mays* L.) é a cultura de maior importância para silagem em rebanhos leiteiros mais especializados. Isto porque a utilização das tecnologias produtivas são basicamente as mesmas que para a produção de grãos. Muita pesquisa e tecnologia foi desenvolvida para o cultivo do milho nos principais países produtores dessa cultura (KHAN et al., 2015). A genética aprimorada faz com que o potencial produtivo seja elevado, ficando o manejo como principal fator limitante da produção e qualidade da silagem (BERNARDES; DO RÊGO, 2014).

Em sistemas intensivos de produção de leite a silagem de milho é a principal fonte de volumoso utilizada na alimentação (FERRARETTO et al., 2018). Para a silagem de planta inteira, o milho consegue alcançar elevado valor energético devido à elevada participação de amido na MS das plantas. A participação do amido na MS, bem como o processamento dos grãos para obtenção da máxima degradabilidade ruminal são importantes para o aumento do potencial de produção de leite (FERRARETTO e SHAVER, 2012). Soma-se a boa digestibilidade e apropriada composição de fibra, essenciais para a nutrição de vacas leiteiras (FERRARETTO e SHAVER, 2012; SCHWAB et al., 2003).

O sorgo (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) se destaca por apresentar maior distribuição geográfica para cultivo, adaptando-se em regiões de clima com condições irregulares de precipitação, como estiagens esporádicas (VON PINHO et al, 2007). É uma cultura de escala global, capaz de fornecer diversificada gama de produtos, como por exemplo: fibras, cultivo para produção de açúcar e etanol, forragem para pastejo, silagem, produção de grãos para consumo humano, animal e energia. A cultura do sorgo apresenta grande potencial como uma estratégia no abastecimento de grãos e forragem no Brasil devido a flexibilidade da época de cultivo e adaptação em todas as regiões. Embora menos intensa que o milho, a genética do sorgo tem sido aprimorada para produção de grãos, silagem ou para duplo propósito (TABOSA et al., 2012).

A tecnologia de cultivo do sorgo é semelhante à do milho e para silagem, o sorgo possui características bromatológicas similares. Em muitos casos apresenta produtividade de biomassa maior que o milho, com menor custo de produção, por permitir mais de um corte com uma única semeadura (TABOSA et al., 2012). Da mesma forma que o milho, os grãos são importante fonte de energia para as bactérias ruminais pelo conteúdo de amido presente (Van Soest, 1994). A escolha por cultivares que produzam mais grãos na matéria seca tem sido preferência para confecção de silagens de sorgo, o que faz com que o valor nutritivo dessa silagem seja excelente. Normalmente, a silagem de sorgo possui maior teor de proteína bruta comparada ao milho, entretanto os coeficientes de digestibilidade são um pouco menores (BERNARDES e DO RÊGO, 2014).

A proporção de grãos é um fator determinante da qualidade das silagens de milho e sorgo, sendo responsáveis pela maior elevação no teor de matéria seca (MS) das forrageiras (ZOPOLLATTO et al., 2009; BERNARDES e DO RÊGO, 2014). Os grãos possuem elevada quantidade de amido na sua estrutura. O amido é um carboidrato altamente degradável no rúmen, sendo um substrato energético disponível para as bactérias (HALL, 2000; VAN SOEST, 1994). Os demais componentes estruturais das plantas, principalmente folhas e colmos, influenciam marcadamente a produtividade e a qualidade bromatológica das silagens nessas culturas (MELLO; NÖRNBERG, 2004; ZOPOLLATTO et al., 2009).

Na nutrição de vacas leiteiras os alimentos são fracionados com o intuito de aplicar modelos desenvolvidos para prever o mais próximo possível a cinética de degradação no trato digestivo e o potencial de conversão alimentar (FOX et al.,

2003). Esses modelos permitem maximizar a produtividade animal e diminuir os impactos ao ambiente gerados pela atividade produtiva. O modelo MILK 2006 permite, por exemplo, estima a partir das frações dos alimentos a performance produtiva e energética das silagens de milho e a estimativa de eficiência alimentar animal e de área produtiva (SCHWAB et al., 2003).

## 5 ARTIGO 1 - INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* EM HÍBRIDOS DE MILHO PARA PRODUÇÃO DE SILAGEM DE PLANTA INTEIRA

Tiago João Tonin, Julio Viégas

### Resumo

A inoculação com *Azospirillum brasilense* na cultura do milho na maioria dos casos incrementa a produtividade de grãos e resulta em alterações morfológicas das plantas. O objetivo com este estudo foi avaliar o potencial de uso da inoculação com *A. brasilense* em híbridos de milho para produção de silagem. Utilizaram-se os híbridos AG 8690 e AG 8780, os quais tiveram suas sementes inoculadas na semeadura dos anos agrícolas 2016/2017 e 2017/2018. Foram avaliadas a produtividade e os parâmetros agronômicos e morfológicos das plantas para produção de silagem. Nas silagens, foi realizada análise química, com partição de carboidratos, digestibilidade *in vitro* e estimativas energéticas e de produtividade de leite via modelo MILK. A inoculação com *A. brasilense* não alterou a produtividade de silagem das plantas, média de 16760 kg de matéria seca (MS) por hectare. Houve menor peso de folhas nas plantas de milho do híbrido AG 8780 inoculado, enquanto que com *A. brasilense* o mesmo híbrido tendeu em aumentar a massa de grãos ensilada. No híbrido AG 8690 quando inoculado as plantas tenderam a serem 14 cm maiores. Em ambos os híbridos a inoculação aumentou o diâmetro e comprimento das espigas. Na silagem, as alterações químicas foram principalmente relacionadas ao aumento de 31,12 g.kg de MS no conteúdo de amido nos híbridos inoculados, o que melhorou a digestibilidade da MS. Com *A. brasilense* o modelo MILK estimou aumento de 3,5% na energia líquida de lactação das silagens e estimativa de produtividade superior em mais de 3600 kg de leite por hectare. Assim, a eficiência de utilização de N para produção de leite tendeu a ser maior com a inoculação. Com a inoculação com *A. brasilense* foi possível obter silagens de milho com maior digestibilidade da MS, maior estimativa de teor energético e eficiência alimentar, o que gera maior potencial de produtividade de leite por área e melhoria na utilização de recursos.

Palavras chave: Amido, BPCP, fitohormônios, nitrogênio, produção de leite.

## Abstract

Inoculation with *Azospirillum brasilense* in corn culture in most cases increases grain productivity and leads to morphological changes of the plants. The objective of this study was to evaluate the potential use of *A. brasilense* inoculation in corn hybrids for silage production. Hybrids AG 8690 and AG 8780 were used, which had their seeds inoculated in the sowing of agricultural years 2016/2017 and 2017/2018. The productivity and the agronomic and morphological parameters of plants for silage production were evaluated. In silages, bromatological analysis was performed, with carbohydrate partition, *in vitro* dry matter digestibility and energy and milk yield estimates via MILK model. Inoculation with *A. brasilense* did not alter the silage yield of the plants, average of 16760 kg of dry matter (DM) per hectare. There was less leaf weight in the corn plants of the AG 8780 hybrid inoculated, while with *A. brasilense* the same hybrid tended to increase the silage grain mass. In hybrid AG 8690 when inoculated the plants tended to be 14 cm larger. In both hybrids the inoculation increased the diameter and length of the ears. In silage, the bromatological changes were mainly related to an increase of 31.12 g.kg of DM in the starch content of the inoculated hybrids, which improved the digestibility of DM. With *A. brasilense* the MILK model estimated a 3.5% increase in the net energy of lactation in silages and an estimated higher productivity of over 3600 kg of milk per hectare. Thus, the efficiency of using N for milk production tended to be higher with inoculation. With the inoculation with *A. brasilense* it was possible to obtain corn silages with higher MS digestibility, higher energy content and feed efficiency, which generates higher milk productivity potential per area and improved resource utilization.

Key words: milk production, nitrogen, PGPB, hormones, starch.

## Introdução

As bactérias promotoras de crescimento das plantas (BPCP) têm importante papel no aumento da produtividade, ciclagem de nutrientes e diminuição das perdas, principalmente de nitrogênio (N) ao meio ambiente (HAYAT et al., 2010; HUNGRIA

et al., 2010). As BPCP são endofíticas e se associam às plantas principalmente pela colonização das raízes (BHATTACHARJEE et al., 2008). Dentre as BPCPs, o gênero *Azospirillum* tem sido estudado e utilizado com resultados satisfatórios em aumento da produtividade na cultura do milho para grãos e recentemente também para silagem (HUNGRIA et al., 2010; SKONIESKI et al., 2019). A espécie *A. brasilense* e suas estirpes foram utilizadas no desenvolvimento de inoculantes comerciais (BASHAN e BASHAN, 2010; HUNGRIA et al., 2010), o que possibilitou a disseminação dessa tecnologia no campo.

A inoculação pode levar ao aumento na produção de fitohormônios, principalmente ácido indolacético (AIA) e citocininas (TIEN et al., 1979; BASHAN e BASHAN, 2010), fixar N atmosférico (BHATTACHARJEE et al., 2008; HUERGO et al. 2008) e levar a melhoria da disponibilidade de fósforo assimilável (RODRIGUEZ et al., 2004). O efeito principal dos fitohormônios é a diferenciação do crescimento radicular axial, leva a melhoria da assimilação de nutrientes disponíveis na solução do solo (TIEN et al., 1976; BASHAN e BASHAN, 2010).

(SKONIESKI et al., 2017) relataram potencial de melhoria na qualidade bromatológica e aumento da produção em silagem de milho de plantas provenientes de sementes inoculadas. Alterações morfológicas nas plantas e aumento da biomassa para ensilagem também foram observadas (BERTONCELI et al., 2017; NAKAO et al., 2018). A inoculação com *A. brasilense* no milho leva ao aumento da massa de grãos (SKONIESKI et al., 2019), do conteúdo de N e outros nutriente nas folhas e grãos (GALINDO et al., 2016), de açúcares nos grãos (NUMOTO et al., 2019). Em silagens de milho, a participação de grãos é essencial para o aumento do conteúdo de amido, o que leva ao aumento da densidade energética. A ocorrência desses fatores em plantas leva a hipótese de que a produtividade e a qualidade das silagens de milho são, significativamente, melhoradas com a inoculação.

Com o objetivo de avaliar os efeitos da inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* sobre os parâmetros de produção e qualidade nutritiva das silagens de milho foi realizado o presente estudo.

## **Metodologia**

O estudo foi conduzido em duas safras agrícolas, nas estações de primavera e verão dos anos agrícolas de 2016/2017 e 2017/2018. A área experimental foi

instalada na cidade de Santa Maria – RS, Brasil, coordenadas latitude -29,73'12" Sul e longitude 53.71'82" Oeste, a 95 metros de altura do nível do mar. O solo da região é classificado como Argissolo Vermelho Distrófico (horizontes A e Bt definidos) (EMBRAPA, 2013). O clima é o Cfa, subtropical, sem estação seca e com verões quentes (PEEL et al., 2007).

No outono de ambos os anos agrícolas foi realizada semeadura de *Avena sativa* L. para obtenção de cobertura de solo para o plantio direto, na primavera. Durante o inverno que antecedia as safras foram tomadas amostras de solo da área experimental na profundidade de 0 a 20 cm para análise dos atributos físicos e químicos e recomendação de adubação de correção, manutenção e reposição (Tabela 1).

Tabela 1– Análise química do solo da área experimental nos dois anos de cultivo, Santa Maria, RS.

Safr/Ano	Arg.	pH	CTC	Al	Ca	Mg	P	K	M.O	Bases
	%		-----cmol/dm <sup>3</sup> -----				--mg/dm <sup>3</sup> --		-----%-----	
2016/2017	27,0	5,1	12,1	4,3	4,5	2,0	5,4	44,0	2,4	54,7
2017/2018	24,0	5,5	12,1	0,0	6,0	2,9	7,5	40,0	2,3	74,5

Arg. = argila; pH = pH em água; CTC = capacidade de troca de cátions; Al = alumínio; Ca = cálcio; Mg = magnésio; P = fósforo; K = potássio; M.O = matéria orgânica; Bases = saturação por bases; - Registro no Departamento de solos – UFSM sob número 16746 (2016) e 7492 (2017)

No inverno foi realizada adubação de correção com calcário dolomítico (70% de PRNT), em ambas as safras, para elevar o pH do solo a 6,0. As adubações com NPK foram realizadas para estimativa de produtividade de 18 ton MS ha<sup>-1</sup> de forragem e foram aplicados 20 kg ha<sup>-1</sup> de N na adubação de base (CQFS RS/SC, 2016). A área foi dessecada 30 dias antes da previsão do plantio com a aplicação de 3,0 Litros ha<sup>-1</sup> (1440 g ia/ha<sup>-1</sup>) de glifosato e 0,5 Litros ha<sup>-1</sup> de adjuvante mineral. Durante o desenvolvimento da cultura, foram aplicadas duas adubações de cobertura com N, divididas nos estágios V4 e V8, totalizando 220 kg ha<sup>-1</sup> de N em cobertura.

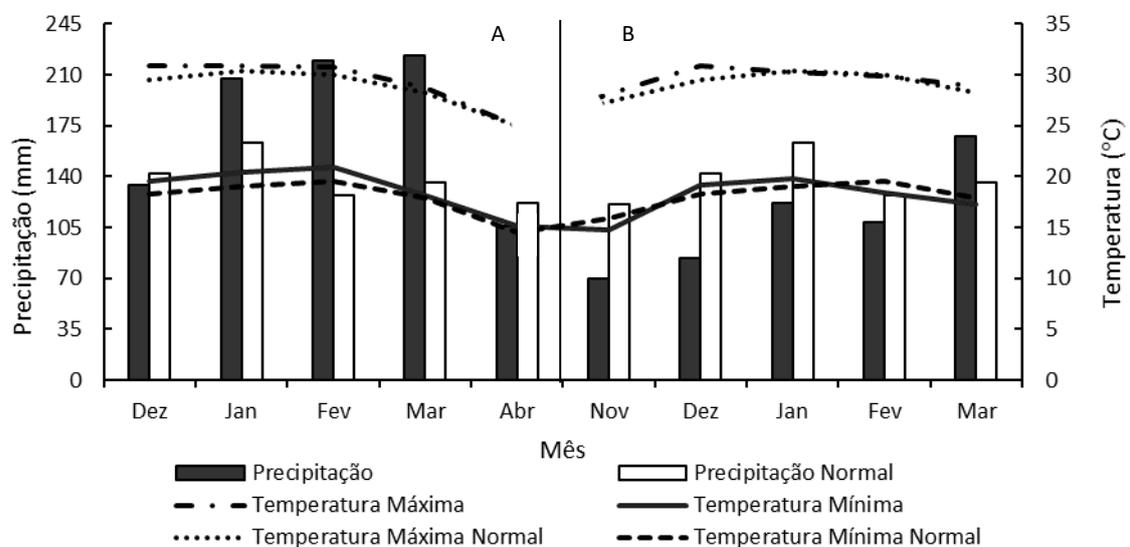
Foram utilizados dois híbridos comerciais de milho, AG 8690 e AG 8780 (Agrocere seeds), ambos com tecnologia VT PRO 3<sup>TM</sup>. Na semeadura, as sementes foram inoculadas à sombra com bactérias da espécie *Azospirillum*

*brasiliense*, estirpes Ab-V5 e Ab-V6 isoladas por HUNGRIA et al. (2010) na concentração de  $2,0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> com a utilização de 200 mL ha<sup>-1</sup> de inoculante (Aztotal® – Total Biotecnologia), diluído em água. Uma semeadora tracionada por trator agrícola, com 5 linhas, regulada para população de plantas de 65.000 plantas ha<sup>-1</sup> foi utilizada para semeadura.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso. A aleatorização consistiu no posicionamento das 5 linhas (parcelas) semeadas pela semeadora dentro da área experimental. O arranjo fatorial foi 2 x 2 x 2, composto pela inoculação (inoculado x não inoculado), dois híbridos utilizados e duas safras agrícolas, com 4 subdivisões por parcela (repetições). A área experimental total foi formada por 16 unidades experimentais. Cada unidade experimental possuía 5 linhas, espaçadas em 0,45 m, com 6 metros de comprimento, área de 13,5 m<sup>2</sup>.

As semeaduras ocorreram nos dias 02/12/2016 e 06/11/2017. Durante o desenvolvimento da cultura, foram aplicados herbicidas específicos para a cultura do milho e inseticidas para controle da lagarta do cartucho. Foi realizado o monitoramento das condições climáticas, precipitação (mm) e temperatura do ar (°C) durante todo o ciclo, através da estação meteorológica do Instituto Nacional de Meteorologia INMETOMM: 83936, localizado próximo à área experimental (Figura 1).

Figura 1 - Temperaturas mínima e máxima do ar (°C) e precipitação (mm), normal e ocorrida nas safras 16/17 (A) e 17/18 (B), durante a condução experimental em Santa Maria, RS.



Fonte: INMET.

O corte das plantas para ensilagem foi realizado em 25/03/2017 e 10/03/2018, tendo como base a linha do leite dos grãos, estágios  $\frac{1}{2}$  a  $\frac{3}{4}$ . As plantas da linha central de cada unidade experimental foram cortadas a uma altura média de 20 cm do solo e pesadas. Três plantas foram escolhidas (4ª, 8ª e 12ª plantas em cada fileira/unidade experimental sentido norte-sul) para a mensuração, com uso de uma trena, da altura total das plantas (até a inserção da folha bandeira). No mesmo momento, com uso de paquímetro digital, foi tomado o diâmetro de colmo, medido entre o primeiro e segundo entre nó da planta, contando a partir do solo.

Após o corte das plantas, cinco espigas foram escolhidas aleatoriamente para a contagem do número de fileiras em cada espiga, bem como selecionada aleatoriamente uma fileira na espiga para a contagem do número de grãos, obtendo-se por multiplicação de ambos, o número de grãos médio por espiga. Também, em cada espiga, efetuou-se a tomada de medida do comprimento, com régua graduada (mm) e diâmetro com auxílio de paquímetro digital.

Três plantas foram amostradas para separação dos componentes morfológicos em colmo, inflorescência, folhas verdes e folhas senescentes, palha da espiga, sabugo e grãos. Estes componentes morfológicos separados foram secados em estufa com ar circulante a 55 °C até peso constante para avaliação da participação final na massa seca total (MST) da forragem ensilada (g.kg MS). O restante das plantas foi triturada em picador de forragem, com tamanho de partículas médio de 19,8 mm (safra 16/17) e 20,2 mm (safra 17/18), mensurada de acordo com LAMMERS et al. (1996).

Após a trituração das plantas, 200 gramas de amostra de cada silo foram retirados para avaliação do teor de matéria seca (MS). A forragem picada foi compactada em mini silos experimentais, dentro de 4 sacos plásticos. No primeiro saco interno havia 2 kg de areia seca e no segundo saco interno estava a forragem picada (8 kg), compactada. Furos na parte inferior do saco com forragem foram feitos para saída do efluente, captado pela areia do primeiro saco. Com auxílio de um aspirador, o ar foi retirado dos dois primeiros sacos. O terceiro e quarto sacos serviram para evitar entrada de ar e proteção da luz solar.

A abertura dos silos ocorreu nos dias 25/07/2017 e 23/06/2018, 120 dias e 103 dias após a ensilagem, respectivamente. Na abertura, foram pesados os dois sacos internos para avaliação da matéria seca recuperada (RMS) (JOBIM et al.,

2007). Foi removida e descartada uma camada superior da silagem e amostras foram retiradas do interior das mesmas. Uma das amostras retiradas (200 gramas) foi prensada utilizando prensa hidráulica (Carver, Model C). Uma alíquota do líquido extraído da prensa foi utilizada para mensurar o N amoniacal ( $\text{NH}_3$ ) pelo método fenol-hipoclorito (Kozloski et al., 2006) e no restante do líquido foi medido o pH.

Outra amostra de silagem foi pré seca em estufa a 55 °C por 72 horas, pesada e moída em moinho de facas do tipo Willey com tamanho de 1 mm. Esta amostra foi utilizada para avaliação química e nutricional da silagem. Uma terceira amostra foi retirada, congelada (-18 °C) e posteriormente utilizada para avaliação do perfil de ácidos produzidos durante a fermentação anaeróbica.

A MST e a matéria mineral (MM) foram determinadas sequencialmente em estufa a 105 °C e mufla a 550 °C. A proteína bruta (PB) foi estimada pela destilação do N- método micro Kjeldahl e multiplicando o valor de N encontrado por 6,25 (AOAC, 1995). O extrato etéreo (EE) foi analisado com equipamento ANKOM XT15 (ANKOM Technology). Foram pesadas 0,5 g de amostra, acondicionadas em saquinhos com porosidade de 25 microns para determinação da fibra em detergente neutro corrigida para cinzas (FDNc), com uso de autoclave e  $\alpha$ -amilase termoestável e queima de resíduo tratado em mufla a 550 °C (SENGER et al., 2008). Outra amostra (0,5 g), acondicionadas em saquinhos de 25 microns usada para determinar a fibra em detergente ácido (FDA) (SENGER et al., 2008) e lignina em detergente ácido (LDA) com solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 72% (12 M), ambas em sequência analítica.

O conteúdo de açúcares solúveis na MS (AS) foram determinados pela extração com etanol 70° e estimados por colorimetria (Hall, 2000). Os ácidos acético, propiônico e butírico produzidos durante a fermentação foram mensurados de acordo com (TANGERMAN e NAGENGAST, 1996). O ácido láctico foi submetido ao processo de derivatização com auxílio N-terc-butilmetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) de acordo com (OMS-OLIU et al., 2011). As concentrações de todos os ácidos foram analisadas em cromatografia gasosa equipada com detector de ionização de chama (GC-FID), Varian Star 3400CX (CA, EUA). Para a quantificação do teor de amido total das silagens, a amostra foi submetida a digestão enzimática com amilase (Termamyl 120L), amiloglicosidase (AMG 300L) e protease (Flavourzyme 500L). Os açúcares resultantes dessa digestão foram quantificados em espectrofotômetro a  $\lambda = 505$  nm de absorvância,

utilizando o kit glicose oxidase-peroxidase (GOP) como reativo de cor (WALTER et al., 2005).

Amostras foram utilizadas para a análise e fracionamento do N utilizando método micro Kjeldahl (LICITRA et al., 1996). A extração do N insolúvel (NI) foi realizada com tampão borato fosfato e azida sódica e o N solúvel (NS) estimado por diferença da fração insolúvel e N total. As frações N insolúveis em detergente neutro (NIDN) e ácido (NIDA) foram realizadas quantificando o N em amostras previamente tratadas em ambas as soluções detergentes.

Amostras de 1mm, com peso de 1g e em duplicata foram utilizadas para avaliação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DivMS) e FDN (DivFDN) (Van Soest, 1994). A DivFDN foi considerada como a diminuição da massa da fração FDN inicial e após 48 horas de incubação. Para a execução deste estudo foi realizada a coleta do líquido ruminal de bovinos dotados de cânula de rúmen de 10 cm. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA), protocolo nº 5439180417. As amostras foram acondicionadas em saquinhos de poliéster (25 microns), colocados em recipientes, adicionado o líquido ruminal e solução tamponante com pepsina, incubadas a 39 °C por 48 horas com a agitação contínua. Após 48 horas, os saquinhos foram retirados, lavados e secos em estufa a 105 °C por 8 horas e então pesados. Posteriormente os saquinhos foram submetidos à análise de FDN (previamente descrito), lavados, secos em estufa a 105 °C por 8 horas, pesados e queimados em mufla a 550°C por 4 horas e pesagem das cinzas (VAN SOEST, 1994).

Foram estimados via modelo MILK 2006 o potencial produtivo de leite por hectare e por tonelada de MS das silagens (SCHWAB et al., 2003). O mesmo modelo forneceu estimativas segundo NRC (2001) da energia líquida de lactação (ELI – Mcal kg MS) e NDT (g.kg MS).

A eficiência da utilização do N foi calculada como a conversão do total de N disponível para as plantas, no solo e como adubação, em produtividade final de silagem e calculada de leite. A quantidade de N total foi calculada através da soma da adubação e da quantidade de N disponível da camada de 0 a 20 cm do solo através do teor de MO em 2000m<sup>2</sup> (MOLL et al., 1982). Considerou-se a quantidade produzida de cada variável com 1 kg de N disponível.

As variáveis foram analisadas inicialmente quanto à normalidade da distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk. Utilizou-se o procedimento Mixed (*proc. Mixed*) para avaliação e comparação de médias dos tratamentos. A variável safra agrícola entrou como variante aleatória no modelo durante a análise dos dados, assim utilizaram-se os dados médios das duas safras. Os efeitos da inoculação e híbridos foram analisados pelo teste F, primeiramente analisando a interação entre variáveis e posteriormente, quando não houver interação, os fatores isoladamente. Foi usado o pacote estatístico SAS® University Edition (SAS INSTITUTE, 2017). A significância do modelo considerada como: significativo ( $P \leq 0,05$ ) e tendência de ocorrência ( $0,05 < P \leq 0,1$ ).

Modelo experimental:

$$Y_{ijkl} = \mu + H_i + I_j + S_k + H_{ij} + \beta_l + \epsilon_{ijkl},$$

em que:  $Y_{ijkl}$ : representa o valor observado que recebeu o tratamento de ordem "ijkl";  $\mu$ : representa a média geral obtida;  $H_i$ : representa o efeito dos híbridos de ordem "i";  $I_j$ : representa o efeito da inoculação de ordem "j";  $S_k$ : representa o efeito de safra de ordem "k";  $H_{ij}$ : representa o efeito da interação entre híbrido e inoculação de ordem "ij";  $\beta_l$ : representa o efeito dos blocos de ordem "l";  $\epsilon_{ijkl}$ : componente do erro aleatório associado ao i- híbrido, j- inoculação, k - safra e l- efeito de bloco.

## Resultados

A inoculação das sementes dos híbridos AG 8690 e AG 8780 com *Azospirillum brasilense* promoveu alterações morfológicas nas plantas de milho, mas não foi observado ( $P > 0,1$ ) aumento na produtividade de MS para silagem (Tabela 2). Algumas das alterações morfológicas encontradas foram dependentes da interação entre os híbridos e a inoculação, como no caso de folhas, massa de grãos e altura das plantas.

As interações entre híbridos e bactérias foram demonstradas pela maior ( $P \leq 0,05$ ) participação de massa de folhas - 139,2 g.kg MS (não inoculado) e 119,9 g.kg MS (inoculado) - na silagem do híbrido AG 8780. A diminuição de folhas no híbrido AG 8780 inoculado resultou no aumento da massa dos grãos, com média de 455,2 g.kg MS, contra 437,9 g.kg MS do milho sem inoculação. No híbrido AG 8690, houve

tendência ( $P \leq 0,1$ ) de que as plantas inoculadas fossem superiores em altura total, médias de 260,7 cm inoculado e 246,8 cm sem inoculação.

Independente do híbrido, a inoculação promoveu desenvolvimento diferenciado nas espigas, evidenciado pelo aumento significativo ( $P \leq 0,05$ ) do diâmetro e do comprimento das mesmas. Apesar de melhorar a formação das espigas, a inoculação não causou efeito sobre o número total de grãos nas mesmas, o que está relacionado à fase vegetativa e reprodutiva anteriores ao tempo em que estas medidas foram tomadas.

Tabela 2 – Características químicas e morfológicas, produtividade de forragem para silagem de plantas de híbridos de milho inoculados com *A. brasilense*.

	Inoculação (I)		Híbrido (H)		Estatística		Teste F		
	Controle	<i>A. brasilense</i>	AG 8690	AG 8780	Média	EPM*	I	H	I x H
Matéria seca <sup>1</sup>	330,3	328,5	335,1	323,7	329,4	5,72	0,9095	0,4793	0,5854
Produção <sup>2</sup>	16636	17138	17141	16479	16760	523	0,4650	0,2966	0,9672
Folhas <sup>3</sup>	133,6	130,1	134,1	129,5	131,8	6,21	0,5933	0,4915	0,0051
Colmo <sup>3</sup>	251,8	238,6	253,7	236,8	245,2	9,29	0,1350	0,0602	0,4530
Senescente <sup>3</sup>	36,2	39,3	39,5	36,0	37,7	3,80	0,6296	0,5935	0,6279
Inflorescência <sup>3</sup>	8,9	10,0	8,3	10,6	9,5	0,47	0,1249	0,0126	0,4055
Palha <sup>3</sup>	60,8	61,8	55,1	67,6	61,3	2,00	0,5127	0,0007	0,5806
Grãos <sup>3</sup>	425,1	433,4	415,5	443,0	433,1	12,22	0,4334	0,0136	0,0925
Sabugo <sup>3</sup>	86,3	86,8	93,8	79,3	86,5	2,57	0,9269	0,0364	0,9862
Alt. Planta <sup>3</sup>	242,8	251,7	253,8	240,7	247,2	4,64	0,0142	0,0036	0,0883
Com. Espiga <sup>3</sup>	15,8	16,3	15,6	16,6	16,1	0,25	0,0581	0,0111	0,8856
Diam. Espiga <sup>3</sup>	5,1	5,2	5,2	5,2	5,2	0,05	0,0491	0,3216	0,5349
Grãos total	433,4	438,3	419,6	452,1	435,8	8,42	0,5803	0,0167	0,1699
EUNS <sup>5</sup>	57,0	59,6	59,4	57,4	58,4	1,79	0,2712	0,1268	0,8303

\*Erro padrão da média; <sup>1</sup> MS g.kg forragem; <sup>2</sup> Produção de forragem em kg MS ha<sup>-1</sup>; <sup>3</sup> Massa ensilada de folhas, colmo, folhas senescentes, inflorescência, palha da espiga, grãos e sabugo em g.kg de MS ensilada; <sup>4</sup> Altura total de planta, comprimento de espiga, diâmetro de espiga em cm; <sup>5</sup> Eficiência da utilização do N para produção de silagem (EUNS) em kg MS.kg N.

Os híbridos foram similares ( $P > 0,1$ ) em produtividade de MS das plantas para silagem, no teor de MS na colheita e sobre a massa de folhas senescentes. Todavia, o híbrido AG 8780 apresentou tendência ( $P \leq 0,1$ ) de menor participação de colmos e significativa ( $P \leq 0,05$ ) diminuição de inflorescência, palha e sabugo nas plantas ensiladas. Assim, este híbrido foi ensilado com maior massa de grãos na MS quando comparado ao AG 8690, efeito decorrente do maior comprimento de espiga e maior

quantidade de grãos nas espigas das plantas ensiladas. Sem aumento de produção de MS, a EUNS foi similar entre os híbridos inoculados e não inoculados.

Tabela 3 – Composição bromatológica, digestibilidade *in vitro* da matéria seca, características fermentativas, partição de carboidratos e nitrogênio nas silagens de híbridos de milho provenientes, ou não, da inoculação com *A. brasilense*.

	Inoculação (I)			Híbrido (H)		Estatística		Teste F	
	Controle	A. <i>brasilense</i>	AG 8690	AG 8780	Média	EPM	I	H	I x H
<i>Valor bromatológico e digestibilidade</i>									
MS <sup>1</sup>	340,2	337,0	338,9	338,4	341,3	7,57	0.6567	0.9228	0.0101
MM <sup>2</sup>	38,3	41,3	39,7	39,9	39,9	0,86	0.0962	0.9055	0.4385
PB <sup>2</sup>	74,4	73,4	73,4	74,4	73,3	1,77	0.4965	0.5925	0.0314
EE <sup>2</sup>	45,0	44,4	45,7	43,6	44,3	1,53	0.8549	0.3630	0.7521
FDNc <sup>2</sup>	407,4	418,7	410,4	415,7	411,5	7,47	0.3771	0.7043	0.4390
FDA <sup>2</sup>	272,5	301,1	289,2	284,3	283,8	11,79	0.0758	0.7536	0.6664
Lignina <sup>2</sup>	21,6	23,4	22,2	22,7	22,4	0,88	0.3181	0.7233	0.1158
DivMS <sup>2</sup>	589,5	613,1	598,1	604,6	601,3	8,40	0.0585	0.6034	0.5014
NH <sub>3</sub> <sup>3</sup>	43,6	43,1	43,7	42,9	43,3	1,49	0,9609	0,7188	0,9739
NIDN <sup>2</sup>	84,8	94,0	88,9	88,8	87,6	4,71	0.1236	0.9812	0.8729
NIDA <sup>2</sup>	55,4	60,2	56,7	59,5	58,1	2,98	0,1115	0,4676	0,7161
NS <sup>3</sup>	45,8	54,1	50,8	49,2	50,0	1,48	0.0077	0.5672	0.9199
pH	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	0,01	0,1576	0,8606	0,7812
RMS <sup>2</sup>	984,0	972,8	972,0	984,8	978,5	5,37	0,3798	0,4052	0,3988
<i>Perfil de carboidratos</i>									
CHOT <sup>2</sup>	842,6	840,6	841,0	842,1	842,3	3,07	0,6677	0,6772	0,1683
CNF <sup>2</sup>	437,2	422,4	432,1	427,5	431,8	9,55	0,2521	0,7194	0,2212
CA1 <sup>2</sup>	21,7	20,5	20,8	21,1	20,8	0,91	0,3074	0,8067	0,2892
CA2 <sup>2</sup>	33,2	30,1	33,5	29,8	31,5	1,62	0,2971	0,2193	0,6694
CA4 <sup>2</sup>	22,0	21,4	20,1	23,3	21,6	0,66	0,4200	0,0052	0,6509
CB1 <sup>2</sup>	297,1	328,2	308,9	316,4	302,9	18,65	0,0118	0,5277	0,9544
CB2 <sup>2</sup>	89,4	53,6	77,9	65,2	79,8	10,93	0,0371	0,4242	0,0426
CB3 <sup>2</sup>	337,5	347,7	343,4	341,9	343,1	7,66	0,5166	0,9268	0,8284
CC <sup>2</sup>	67,6	72,1	66,6	73,2	69,7	4,94	0,5311	0,3652	0,0271

\*Erro padrão da média; <sup>1</sup> MS g.kg de silagem; <sup>2</sup> MM, PB, EE, FDNc, FDA, lignina, DivMS, RMS, CHOT, CNF, soma de ácidos voláteis (CA1), ácido láctico (CA2), açúcares solúveis em água (CA4), amido (CB1), fibra solúvel (CB2), fibra digestível (CB3), fibra indigestível (CC), NIDN, NIDA em g.kg MS; <sup>3</sup> Nitrogênio solúvel (NS) e NH<sub>3</sub> em % do N total.

As interações entre os tratamentos e os efeitos isolados encontrados na fase de colheita das plantas influenciaram, em alguns parâmetros, a qualidade nutricional das silagens. Foi observado que a silagem do híbrido AG 8690 sem a inoculação apresentou teor de MS superior, 347,7 g.kg, do que quando inoculado, 330,1 g.kg. A

MS mais elevada nesse híbrido inoculado, diminuiu a participação de fibra solúvel (CB2), média de 42,4 g.kg MS com a inoculação e 113,3 g.kg MS sem a inoculação. Assim, para a silagem do híbrido AG 8690 inoculado, ocorreu aumento da estimativa da fibra indigestível em cerca de 23 %, com médias de 79,4 g.kg MS, quando inoculado e 55,9 g.kg MS quando não inoculado. No híbrido AG 8780 a PB da silagem foi maior quando não houve a inoculação das sementes – 77,0 g.kg MS (sem inoculação) e 71,8 g.kg MS (inoculado).

Isoladamente, os efeitos da inoculação nos híbridos resultaram nas silagens em tendência de aumento da MM e da FDA (Tabela 3). Apesar disso um acréscimo aproximado de 4% na digestibilidade *in vitro* da MS e 18% nos níveis de NS no N total das silagens foi obtido com a inoculação.

Foi possível observar que a inoculação dos híbridos promoveu alterações no fracionamento dos carboidratos das silagens. Além da alteração da CB2 e fibra indigestível (CC), dependente da interação entre bactéria e híbridos, a participação de amido na MS das silagens foi de 31,1 g.kg MS, superior com a inoculação nos dois híbridos.

Tabela 4 - Estimativas energéticas de nutrientes digestíveis totais (NDT) e energia líquida de lactação (ELI), produção de leite por tonelada de matéria seca e produtividade de leite por hectare das silagens de milho oriundas de híbridos inoculados com *A. brasilense*.

	Inoculação (I)		Híbrido (H)		Estatística		Teste F		
	Controle	A. <i>brasilense</i>	AG 8690	AG 8780	Média	EPM*	I	H	I x H
NDT <sup>1</sup>	614,1	641,1	630,2	624,5	627,1	6,30	0,0459	0,9811	0,8122
ELI <sup>2</sup>	1,4	1,5	1,4	1,4	1,4	0,15	0,0746	0,9139	0,9312
Leite-MS <sup>3</sup>	1208	1315	1277	1248	1261	21	0,0188	0,5800	0,7556
Leite-ha <sup>4</sup>	20352	23964	21933	22071	22007	678	0,0511	0,9248	0,6346
EUNPL <sup>5</sup>	70,7	79,9	76,2	74,7	75,3	2,30	0,0892	0,7056	0,7724

\*Erro padrão da média; <sup>1</sup> NDT g.kg MS; <sup>2</sup> ELI em Mcal.kg; <sup>3</sup> Leite – MS = produção de leite estimada por tonelada de MS em Kg; <sup>4</sup> Leite – ha = produção de leite estimada por hectare em Kg, <sup>5</sup> EUNPL = eficiência de utilização do N para produção de leite (Kg estimado de leite produzido por kg de N disponível).

Na estimativa pelo modelo MILK (2006) do desempenho nutritivo dos híbridos de milho, a inoculação com *A. brasilense* alterou a perspectiva de performance das silagens de milho devido ao aumento na estimativa do conteúdo energético (Tabela 4). Houve acréscimo de 26 g.kg de MS de NDT, o que tendeu a elevar a ELI em 3,5

%. O aumento da estimativa energética das silagens proveniente dos híbridos inoculados possibilita que possa haver acréscimo da eficiência alimentar potencial da silagem, com aumento de até 107 kg leite para cada tonelada de MS consumida.

Ao incrementar a eficiência energética e alimentar, a inoculação dos híbridos gera maior produção de leite por unidade de área, apesar de não ter incrementado a produção total de MS de silagem. O acréscimo total de produção de leite estimado pelo modelo foi de 3612 kg ha<sup>-1</sup> com a inoculação quando comparado aos híbridos não inoculados.

A perspectiva de eficiência do uso do N disponível (MO do solo + adubação) para produção de leite tendeu ( $P \leq 0,1$ ) a ser superior com a inoculação, o que pode indicar melhor aproveitamento ou maior extração desse nutriente do solo. Não foram constatadas mudanças no teor de energia das silagens nos diferentes híbridos. Da mesma forma, os híbridos foram similares nas estimativas de produtividade de leite por kg de MS, produtividade por área e eficiência de utilização do N para produção de leite.

## Discussão

O principal efeito reportado nos estudos com *A. brasilense* no milho é o aumento da produtividade da cultura em grãos ou biomassa total das plantas que ocorrem em até 70% dos casos, em média (OKON e LABANDERA-GONZALEZ, 1994), mas que não foi observado neste trabalho avaliando as plantas inoculadas para produção de silagem. A fixação biológica do nitrogênio (FBN), um dos efeitos resultantes da inoculação, pode ter baixa eficiência em doses maiores de adubação nitrogenada (DÔBEREINER, 1966; MOREIRA et al., 2010; SKONIESKI et al., 2019). Entretanto, baixas doses de N aplicadas em cobertura podem resultar em baixa produção e diminuição da qualidade de silagens de milho. Os efeitos fisiológicos e morfológicos nas plantas decorrentes da produção de fitohormônios pela inoculação com *A. brasilense* tem tido maior importância recente que quando comparado a FBN (RODRIGUEZ et al., 2004; BASHAN e DE-BASHAN, 2010; CASTILLO et al., 2015; CASSÁN e DIAZ-ZORITA, 2016).

O sucesso da inoculação em promover aumento de produtividade no milho em alguns casos é dependente da interação entre genótipos, suas características e

as bactérias inoculadas (MOREIRA et al., 2010; SKONIESKI et al., 2019). Fica evidenciado pelos efeitos morfológicas e agrônômicos das plantas na ensilagem, que existiu interação das estirpes de *A. brasilense* com os dois híbridos, mas que as respostas foram diferentes para variáveis como participação de folhas, grãos e altura final das plantas. A inoculação, independente dos híbridos, melhora a formação das espigas, aumentando o diâmetro e seu comprimento, o que se relaciona com o aumento da produtividade de grãos (SKONIESKI et al., 2019).

O aumento da altura das plantas com a inoculação também é um dos fatores relacionados ao aumento da produtividade final de grãos no milho pela melhoria na captação de energia solar (HUNGRIA et al., 2010), mas não foi relacionado ao aumento de produtividade de MS neste trabalho. Como a maioria dos trabalhos avalia a produção de grãos, a continuidade nos processos fisiológicos das plantas, principalmente fotossíntese, foi interrompida com o corte das plantas para silagem. Soma-se que as máximas absorções de macronutrientes e principais micronutrientes acontece até 100 a 105 dias após emergência (MALAVOLTA, 2006). Então, o corte das plantas precocemente a sua maturidade pode ter interrompido a máxima absorção de nutrientes pelas raízes, bem como a captação de energia solar necessária para a absorção e transformação dos nutrientes (BREDEMEIER e MUNDSTOCK, 2000), que são responsáveis por aumentar biomassa seca e produtividade de grãos nas plantas de milho com a *A. brasilense*.

As tendências de maior participação de folhas e grãos nas plantas ensiladas estabelecida com a inoculação das sementes impactou na avaliação bromatológica das silagens, especialmente no perfil dos carboidratos e na solubilidade do N. Esses dois nutrientes são a base da alimentação dos ruminantes e determinantes no processo de produção de leite pelos animais (NRC, 2001; FOX et al., 2004; HIGGS et al., 2015). Os componentes estruturais das plantas influenciam a produtividade e a qualidade bromatológica das silagens (MELLO e NÖRNBERG, 2004; ZOPOLLATTO et al., 2009), mas a magnitude das alterações pode ser dependente também da fermentação anaeróbica.

Nas fases reprodutivas R2 a R6, as plantas de milho experimentam acelerado acúmulo de matéria seca nos grãos, ocasionado pela deposição de açúcares, especialmente amido. Foi evidenciado aumento do teor de açúcares em grãos de milho doce cujas sementes haviam sido inoculadas com *A. brasilense* (NUMOTO et al., 2019). Além da maior absorção de nutrientes do solo, a inoculação com *A.*

*brasiliense* aumenta a eficiência de captação da energia solar, pela maior quantidade de células fotossinteticamente ativas já que promove aumento no índice de área foliar das plantas (LONGHINI et al., 2016).

A deposição de amido nos grãos foi mais acentuada com a inoculação, o que aumentou a participação desse carboidrato na MS das silagens. Ao incrementar o teor de amido nas silagens fica evidente que a inoculação altera a fisiologia das plantas acelerando o seu desenvolvimento. O aumento da massa de folhas bem como maior altura das plantas, pode favorecer maior captação de energia solar e CO<sub>2</sub> pois há aumento do tamanho superficial de área fotossinteticamente ativa. O efeito da inoculação na formação das espigas explica o aumento da concentração de amido nas silagens. Uma vez que o número total de grãos por espiga não foi alterado, o principal efeito encontrado com a inoculação parece ser na formação dos grãos, o que influencia no comprimento e diâmetro das espigas.

A inoculação com *A. brasiliense* aumentou a concentração de N e outros nutrientes em alguns órgãos como folhas e grãos de milho (LONGHINI et al., 2016), o que pode levar a aumento de proteína bruta nesses tecidos (NUMOTO et al., 2019). Entretanto, para as silagens de milho no presente estudo, o teor de PB não foi incrementado pela inoculação, assim como em trabalho com silagens de BERTONCELLI et al. (2017), mas a estrutura como o conteúdo de N foi observado nas silagens foi modificado. Existe relação entre a absorção de N pelas plantas e a forma como este é utilizado e/ou armazenado diferentes tecidos e órgãos (TAIZ e ZIEGER, 2013). Essas diferentes formas de N nos diferentes tecidos dos alimentos volumosos alteram a solubilidade ruminal (LICITRA et al., 1996).

A absorção de N é favorecida pelo sistema radicular maior e também pela maior quantidade de energia nas plantas, necessária para realizar o transporte via transportador específico, do solo para interior das células da raiz. A preferência de absorção é por N na forma de amônio, embora nitrato também seja absorvido. O local de desaminação preferencialmente é nas folhas (BREDEMEIER e MUNDSTOCK, 2000). Isto pode levar a maior concentração dessas formas solúveis na parte aérea das plantas, aumentando o conteúdo nas silagens (NEUMANN et al., 2017).

O aumento da concentração de amido nas silagens, somado a maior solubilidade das proteínas são fundamentais também em incrementar a degradabilidade ruminal da matéria seca nas silagens (VAN SOEST 1994),

comprovado pela maior *D<sub>iv</sub>MS* das silagens provenientes de plantas inoculadas. Com maior digestibilidade nas silagens, a resposta estimada em produtividade de leite foi maior nos híbridos inoculados (SCHWAB et al., 2003). Além de fibra, a silagem de milho é importante fonte energia ao rebanho leiteiro (FERRARETTO et al., 2015) e o amido pode representar metade da energia contida nas silagens fornecida à vacas leiteiras (FERRARETTO e SHAVER, 2012).

O modelo MILK estimou melhoria do valor energético e produtividade de leite com o uso da inoculação com *A. brasilense* para produção das silagens. Estes fatores citados são importantes pois aumentam o leque de informações a respeito dos efeitos da inoculação com *A. brasilense* na cultura do milho, destinada aos mais variados fins. Assim há perspectivas de aumento da eficiência de fertilizantes, principalmente N, além de outros insumos utilizados, como por exemplo solo, haja vista maior expectativa de produção de leite por área (ESFAHANI et al., 2017).

A melhoria nos índices produtivos estimados corrobora com a proposição de efeito aditivo da inoculação, baseada no conceito de aumento da eficiência da utilização dos recursos empregados durante o cultivo. O efeito aditivo se fundamenta nos efeitos fisiológicos descritos com a inoculação os quais podem acontecer isoladamente, somatórios ou efeito em cascata e ocasionar alteração nas características agrônômicas das plantas (BASHAN e BASHAN, 2010). Já foi comprovada melhoria da eficiência agrônômica com a inoculação em plantas destinadas a colheita de grãos (GALINDO et al., 2016; SKONIESKI et al., 2019) e agora existe a possibilidade de estender os efeitos para produção de silagem.

O efeito estimado por este estudo demonstra o potencial da inoculação com *A. brasilense* em promover maior retorno produtivo e melhoria da eficiência de uso dos recursos nas silagens de milho destinadas a produção de leite, por alterar a fisiologia e morfologia das plantas e o valor nutricional das silagens. Assim, experimentos *in vivo* que avaliem os impactos da inoculação com *A. brasilense* em híbridos de milho para silagem sobre a produtividade animal devem ser estimulados, principalmente para validação dos resultados do modelo utilizado.

## Conclusões

A inoculação com *Azospirillum brasilense* induziu a alterações morfológicas nas plantas de milho ensiladas, mas não gerou aumento na produtividade de MS

Com a inoculação dos híbridos, as silagens têm aumento no conteúdo de amido e solubilidade da PB, o que proporciona maior digestibilidade da MS, maior teor energético. A inoculação dos híbridos gera maior expectativa eficiência alimentar e potencial de produtividade de leite estimados por área o que pode levar a melhoria na utilização de recursos empregados nos sistemas de produção leiteira.

### Referências bibliográficas

AKINS, M. S.; SHAVER, R. D. Influence of corn silage hybrid type on lactation performance by Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 12, p. 7811-7820, 2014.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 16th ed. AOAC International, Arlington, 474p, 1995.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium azospirillum promotes plant growth-a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77–136, 2010.

BERTONCELLI, P. et al. O manejo de inverno e inoculação de sementes influenciam na produtividade e qualidade da silagem de milho sob sistema plantio direto. **Revista Ceres**, v. 64, n. 5, p. 523–531, 2017.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 365–372, 2000.

CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. Azospirillum sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117–130, 2016.

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 of Plant Growth Regulation**, 2014.

CASTILLO, P. et al. **Phytohormones and other plant growth regulators produced by PGPR: The genus azospirillum**. In: Handbook for Azospirillum. In: CASSÁN F., OKON Y., CREUS C. (eds). Springer, Cham: Technical Issues and Protocols. p. 115 – 138, 2015.

COMISSAO DE QUIMICA E FERTILIDADE DO SOLO DO RS/SC – CQFS-RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Porto Alegre: SBCS- NRS, 400p, 2004.

DÔBEREINER, J. Azotobacter paspali sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de Paspalum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 357–365, 1966.

DOS SANTOS, G.; DE MORAES, J. M. M.; NUSSIO, L. G. Custo e análise de sensibilidade na produção de silagem. **Revista iPecege**, v. 3, n. 1, p. 39 – 48, 2017.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**, 3ª ed. ,Brasília – DF, 353 p., 2013.

ESFAHANI, S. M. J. et al. Efficiency and sustainability of silage corn production by data envelopment analysis and multi-functional ecological footprint: Evidence from Sarayan county, Iran. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 19, N. 7, p. 1453–1468, 2017.

FERRARETTO, L. F.; SHAVER, R. D. Meta-analysis: Effect of corn silage harvest practices on intake, digestion, and milk production by dairy cows. **Professional Animal Scientist**, vol. 28, n. 2, pag. 141-149, 2012.

FERRARETTO, L. F.; SHAVER, R. D.; LUCK, B. D. Silage review: Recent advances and future technologies for whole-plant and fractionated corn silage harvesting. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 3937–3951, 1 maio 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030218303199>>. Acesso em: 11 jul. 2019.

FERRARETTO, L. et al. Effect of corn silage hybrids differing in starch and neutral detergent fiber digestibility on lactation performance and total-tract nutrient digestibility by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, nº 1, p. 395-405, 2015.

FOX, D. et al. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. **Animal Feed Science and Technology**, vol. 112 n. 1-4, p. 29-78, 2004.

GALINDO, F. S. et al. Corn yield and foliar diagnosis affected by nitrogen fertilization and inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 40, p. 1–18, 2016.

GODOY, J.C.S. et al. Produtividade de milho em resposta a doses de nitrogênio com e sem inoculação das sementes com *azospirillum brasilense*. **Campo Digital**, v.6, n.1, p.26-30, 2011.

HALL, M. B. **Neutral detergent-soluble carbohydrates: nutritional relevance and analysis – a laboratory manual**. University of Florida Extension – Extension, Institute of Food and Agricultural Sciences, n. 339, 2000.

HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 579–598, 2010.

HIGGS, R. J. et al. Updating the Cornell Net Carbohydrate and Protein System feed library and analyzing model sensitivity to feed inputs. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p. 6340–6360, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9379>>.

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and

- A. lipoferum improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1, p. 413–425, 2010.
- JOBIM, C. C. et al. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, suplemento especial, p.101-119, 2007.
- KHAN, N.A.; et al. Nutritive value of maize silage in relation to dairy cow performance and milk quality. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 95, n. 2, p. 238–52, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24752455>>.
- KOZLOSKI, G. V. et al. Evaluation of two methods for ammonia extraction and analysis in silage samples. **Animal Feed Science and Technology**, v. 127, n. 3–4, p. 336–342, 2006.
- LAMMERS, B. P.; BUCKMASTER, D. R.; HEINRICHS, A. J.. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. **Journal of dairy science**, v. 79, n. 5, p. 922-928, 1996.
- LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. M.; VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 57, n. 4, p. 347–358, 1 mar. 1996. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0377840195008373>>. Acesso em: 10 jul. 2019.
- LONGHINI, V.Z. et al. Inoculation of Diazotrophic Bacteria and Nitrogen Fertilization in Topdressing in Irrigated Corn. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 2, p. 338–347, 2016.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 631p. 2006.
- MELLO, R.; NÖRNBERG, J. L. Fracionamento dos carboidratos e proteínas de silagens de milho, sorgo e girassol. **Ciência Rural**, v.34 n.5, p.1537-1542, 2004.
- MOLL, R. H.; KAMPRATH, E. J.; JACKSON, W. A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. **Agronomy Journal**, v. 74, N. 3, p. 562-564, 1982.
- MOREIRA, F. M. D. S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: Diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74- 99, 2010.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**, Washington – DC, 7ed. 408p. 2001.
- NEUMANN, M. et al. Chemical fractionation of carbohydrate and protein composition of corn silages fertilized with increasing doses of nitrogen. **Ciência Rural**, v. 47, n. 5, p. 1-7, 2017.
- NUMOTO, A.Y. et al. Agronomic performance and sweet corn quality as a function of

inoculant doses (*Azospirillum brasilense*) and nitrogen fertilization management in summer harvest. **Bragantia**, v. 78, n. 1, p. 26–37, 2019.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n. 12, p. 1591-1601, 1994.

OMS-OLIU, G. et al. Metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development, ripening, and postharvest shelf-life. **Postharvest Biology and Technology**, v.62, p. 7–16, 2011.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences Discussions**, v. 4, n. 2, p. 439-473, 2007.

RODRIGUEZ, H. et al. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 11, p. 552–555, 2004.

SANTINI, J. M. K. et al. Doses and forms of *Azospirillum brasilense* inoculation on maize crop. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 22, n. 6, p. 373–377, 2018.

SAS INSTITUTE. **Free Statistical Software-SAS University Edition | SASSAS Documentation**, Cary SAS Institute, 2017.

SCHAEFER, P. E. et al. Inoculation with *azospirillum* *Brasilense* on corn yield and yield components in an integrated crop-livestock system. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 41, n. 1, p. 1–9, 2019.

SCHWAB, E. C. et al. Estimating silage energy value and milk yield to rank corn hybrids. **Animal Feed Science and Technology**, v. 1-4, n. 109, p. 1-18, 2003.

SENGER, C.C.D. et al. Short communication: Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, vol. 146, p.169-174, 2008.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de Alimentos (Métodos químicos e biológicos)**. 3 ed.UFV, Imprensa Universitária, Viçosa, MG, 2002. 165p.

SKONIESKI, F. R. et al. Effect of nitrogen topdressing fertilization and inoculation of seeds with *azospirillum* *brasilense* on corn yield and agronomic characteristics. **Agronomy 2019, Vol. 9, Page 812**, v. 9, n. 12, p. 812, 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/583134>>.

SKONIESKI, F. R. et al. Effect of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization rates on maize plant yield and silage quality. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 9, 2017.

TANGERMAN, A.; NAGENGAST, F.M. A gas chromatographic analysis of fecal

short-chain fatty acids, using the direct injection method. **Analytical Bioanalytical**, vol. 236, pag. 1–8, 1996.

TIEN, T.; GASKINS, M.; HUBBELL, D. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1016–1024, 1979. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/37/5/1016>>.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2ª Ed. Cornell University Press, 476 p. 1994.

WALTER, M.; SILVA, L. P. D; PERDOMO, D. M. X. Amido disponível e resistente em alimentos: adaptação do método da AOAC 996.11. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 39–43, 2005.

ZOPOLLATTO, M. et al. Alterações na composição morfológica em função do estágio de maturação em cultivares de milho para produção de silagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 3, p. 452–461, 2009.

## 6 ARTIGO 2. INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* EM HÍBRIDOS DE SORGO PARA PRODUÇÃO DE SILAGEM DE PLANTA INTEIRA

Tiago João Tonin, Julio Viégas

### Resumo

A inoculação com *Azospirillum brasilense* possui grande potencial de uso na cultura do sorgo pelas possibilidade de aumento de produção de grãos e biomassa. O objetivo com este estudo foi avaliar a produtividade de silagens em híbridos de sorgo inoculados com *A. brasilense*. Utilizaram-se os híbridos ADV 2499 e AG 2005 os quais tiveram suas sementes inoculadas na semeadura com *A. brasilense*. Na colheita das plantas para silagem foram avaliadas a produtividade de matéria seca (MS) e composição estrutural das plantas. Nas silagens, foram realizadas análises químicas com fracionamento de carboidratos, digestibilidade *in vitro* da matéria seca e estimativa energética e de produtividade de leite via modelo MILK. A inoculação com *A. brasilense* não aumentou a produtividade de MS de silagem nas plantas de sorgo com média de 13398 kg MS ha<sup>-1</sup>. As plantas inoculadas apresentaram maior diâmetro de colmo e comprimento de panículas, mas não houve aumento da participação de grãos na silagem. Nas silagens houve aumento de 8 g.kg MS no conteúdo de proteína bruta no híbrido AG 2005 inoculado, enquanto o conteúdo de carboidratos totais diminuiu aproximadamente 13 g.kg MS. Os híbridos inoculados produziram silagens com maior teor de fibra, mas sem alterar a digestibilidade da MS. O modelo não estimou melhoria do valor energético e no potencial de produção de leite com a inoculação. A inoculação em plantas de sorgo para silagem promoveu alterações na morfologia das plantas e na composição química da silagem, mas sem impacto na digestibilidade e nas estimativas de valor energético e produção de leite.

Palavras chave: carboidratos, fitohormônios, nitrogênio, produção de leite

### Abstract

Inoculation with *Azospirillum brasilense* has great potential for use in sorghum culture due to the possibility of increasing grain and biomass production. The objective of

this study was to evaluate the productivity of silage in sorghum hybrids inoculated with *A. brasilense*. The hybrids ADV 2499 and AG 2005 were used, which had their seeds inoculated in the sowing with *A. brasilense*. The dry matter (DM) production and structural composition of the plants were evaluated during the harvesting of the silage plants. In silage, bromatological analyses with carbohydrate fractionation, *in vitro* digestibility DM, energy and milk yield estimates via MILK model were performed. Inoculation with *A. brasilense* did not increase the yield of silage DM in sorghum plants with an average of 13398 kg<sup>-1</sup> of DM. Inoculated plants had a larger stem diameter and panicle length, but there was no increase in grain participation in silage. In silages there was an increase of 8 g.kg DM in the crude protein content in the AG 2005 hybrid inoculated, while the total carbohydrate content decreased by approximately 13 g.kg DM. The inoculated hybrids produced silages with higher fiber content but without changing the digestibility of DM. The model did not estimate improvement in energy value and milk production potential with inoculation. Inoculation in sorghum plants for silage promoted changes in plant morphology and in the chemical composition of silage, but without impact on digestibility, energy value and milk production estimates by model.

Key words: carbohydrates, hormones, milk production, nitrogen

## Introdução

As bactérias do gênero *Azospirillum* são rizobactérias endofíticas associativas consideradas como bactérias promotoras do crescimento das plantas (BPCP) (BALDANI e BALDANI, 2005; BASHAN e BASHAN, 2010; HAYAT et al., 2010) pois podem alterar os padrões do metabolismo e crescimento das plantas, (CALZAVARA et al, 2018). A espécie *Azospirillum brasilense* é uma das principais bactérias dentro das BPCP. Pode captar e disponibilizar N<sub>2</sub> na rizosfera e produzir substâncias químicas que causam a diferenciação no crescimento – fitohormônios e outros compostos bioquímicos (TIEN et al., 1979; PACOVSKY et al., 1985; CASSÁN e GARCÍA DE SALAMONE, 2008). A inoculação com *A. brasilense* vem se mostrando eficiente em melhorar a assimilação de nutrientes, diminuir o estresse por deficiência hídrica, aumentar a resistência das plantas a patógenos e aumentar as taxas de

fotossíntese (BASHAN e BASHAN, 2010) (HUNGRIA et al., 2010) (KALZAVARA et al., 2018).

Em plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) a inoculação com *A. brasilense* altera o crescimento e a morfologia das raízes (PACOVSKY et al., 1985), principalmente aumentando a massa seca total (ANDRADE e ZOZ, 2019), o que aumenta a área de exploração de nutrientes. Assim há aumento da biomassa aérea das plantas, resultado do aumento da massa de folhas, colmos e grãos (NAKAO et al., 2018). Especificamente em condições de deficiência hídrica a inoculação acresce a produtividade final de grãos pois há aumento do número de grãos por panícula (BLUM e OKON, 1988; DIAZ-FRANCO et al., 2008).

A inoculação com *A. brasilense* induziu ao aumento da concentração de ácido indolacético (AIA) em tecidos das plantas de sorgo, levando ao aumento da biomassa e maior índice de área foliar (GARCÍA-OLIVARES et al., 2006). A maior concentração de N e P nas folhas de plantas de sorgo inoculadas foram observadas (BLUM e OKON, 1988). Assim como em outras culturas agrícolas o sorgo é dependente de condições de meio para que ocorra a associação entre bactéria e plantas (OKON e LABANDERA-GONZALEZ, 1994; MOREIRA et al., 2010).

O objetivo principal da inoculação via sementes no sorgo é o aumento de produtividade de grãos, melhoria da absorção de nutrientes, diminuição das perdas de N e substituição parcial da adubação exógena. Os efeitos descritos na cultura para produção de grãos podem beneficiar ao aumento da produção de silagem, principalmente melhorando o valor nutricional pelo aumento da participação de grãos nas plantas de sorgo ensiladas. Isso pode levar ao aumento da participação de carboidratos solúveis, aumentando o teor energético da silagem. A maior concentração de N nos órgãos das plantas de sorgo induzida pela inoculação com *A. brasilense* também pode levar ao aumento do teor de proteína bruta nas silagens.

Com o objetivo de avaliar os efeitos da inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense* sobre os parâmetros de produção das plantas e qualidade nutritiva das silagens de sorgo foi realizado este estudo.

## **Metodologia**

O experimento foi realizado no ano agrícola 2016/2017. A área experimental instalada estava localizada na cidade de Santa Maria – RS, Brasil, latitude -

29,73'12" Sul e longitude 53.71'82" Oeste e à 95 metros de altura do nível do mar. O solo da região é classificado como Argissolo Vermelho Distrófico (horizontes A e Bt definidos) (EMBRAPA, 2013). O clima é o Cfa, subtropical, sem estação seca e com verões quentes (PEEL et al., 2007).

No mês de maio de 2016 foi realizada semeadura de *Avena sativa* L. para obtenção de cobertura de solo para o plantio direto, na primavera. Durante o inverno que antecedia as safras foram tomadas amostras de solo da área experimental na profundidade de 0 a 20 cm para análise dos atributos físicos e químicos e recomendação de adubação de correção, manutenção e reposição. A análise demonstrou os seguintes parâmetros para o solo da área experimental: argila – 27%; pH – 5,1; capacidade de troca de cátions - 12,1 (cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>); alumínio – 4,3 (cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>); cálcio – 4,5 (cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>); magnésio – 2,0 (cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>); fósforo – 5,4 (mg/dm<sup>3</sup>); potássio – 44,0 (mg/dm<sup>3</sup>); matéria orgânica 2,4% e saturação de bases – 54,7%.

No inverno foi realizada adubação de correção com calcário dolomítico (70% de PRNT), para elevar o pH do solo a 6,0. As adubações com NPK foram realizadas para estimativa de produtividade de 15 toneladas MS ha<sup>-1</sup> de forragem para silagem (CQFS RS/SC, 2016). Utilizou-se uma mistura de fertilizante NPK 5 - 20 - 20, superfosfato triplo e cloreto de potássio para atingir valores recomendados de cada macronutriente. A área foi dessecada 30 dias antes da previsão do plantio com a aplicação de 3,0 Litros ha<sup>-1</sup> (1440 g ia/ha<sup>-1</sup>) de glifosato e 0,5 Litros ha<sup>-1</sup> de adjuvante mineral. Durante o desenvolvimento da cultura, foram aplicadas duas adubações de cobertura com nitrogênio (N), divididas nos estágios V4 e V8, totalizando 160 kg ha<sup>-1</sup> de N.

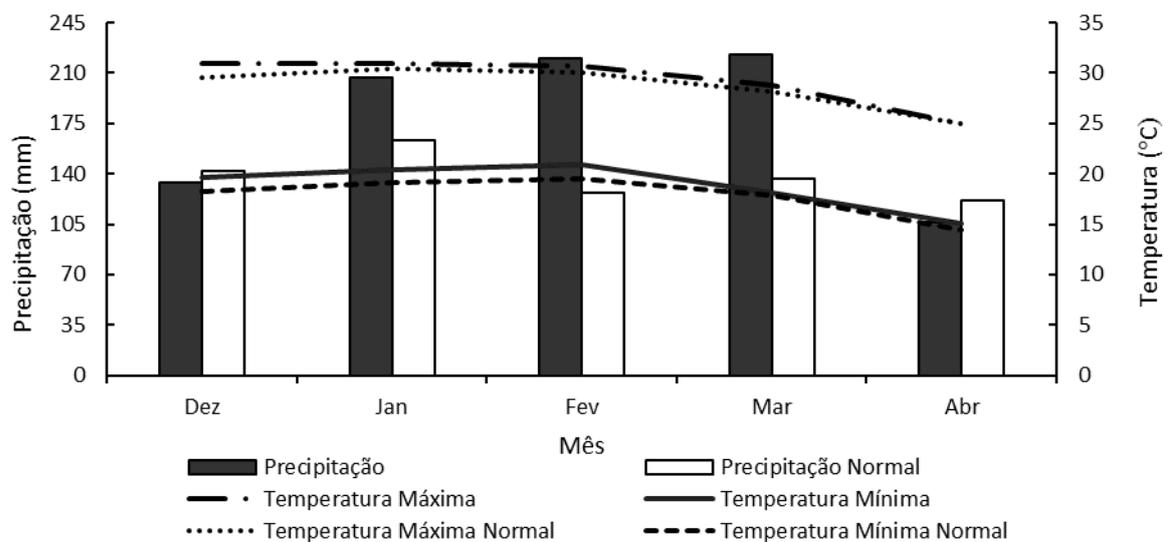
Foram utilizados dois híbridos comerciais de sorgo (*Sorghum bicolor* L, Moench), AG 2005E e ADV 2499BMR. Na semeadura, as sementes foram inoculadas à sombra com a bactéria *Azospirillum brasilense*, estirpes Ab-V5 e Ab-V6 isoladas por (HUNGRIA et al., 2010) na concentração de 2,0 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> com a utilização de 5mL de inoculante (Azototal® –Total Biotecnologia) para cada kg de sementes, diluídos em água. Uma semeadora tratorizada com 5 linhas, regulada para população de plantas de 120.000 plantas ha<sup>-1</sup> foi utilizada para semeadura.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso. A aleatorização consistiu no posicionamento das 5 linhas (parcelas) semeadas pela semeadora dentro da área experimental. O arranjo fatorial foi 2 x 2, composto pela inoculação

(inoculado x não inoculado) e dois híbridos, com 4 subdivisões por parcela (repetições). A área experimental total foi formada por 16 unidades experimentais. Cada unidade experimental possuía 5 linhas, espaçadas em 0,45 m, com 6 metros de comprimento, totalizando área total de 13,5 m<sup>2</sup>.

A semeadura ocorreu no dia 02/12/2016. Durante o desenvolvimento da cultura, para o controle de ervas daninhas foi realizada a capina manual das parcelas. Foi realizado o monitoramento das condições climáticas, precipitação (mm) e temperatura do ar (°C) durante todo o ciclo, através da estação meteorológica do Instituto Nacional de Meteorologia - INMET OMM: 83936 (INMET, 2019) localizado próximo a área experimental (Figura 1).

Figura 1 - Temperaturas mínima e máxima do ar (°C) e precipitação (mm), normal e ocorrida na safra 16/17 durante a condução experimental em Santa Maria, RS.



Fonte: INMET.

O corte das plantas para ensilagem foi realizado em 25/03/2017, tendo como base a maturação dos grãos, de pastoso a farináceo. Antes do corte, três plantas foram escolhidas (4<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> plantas em cada fileira/unidade experimental sentido norte-sul) para a mensuração, com uso de uma trena, da altura total das plantas (até a inserção da folha bandeira) e o comprimento de panícula, da folha bandeira até o topo da mesma. No mesmo momento, com uso de paquímetro digital, foi tomado o

diâmetro de colmo, medido entre o primeiro e segundo entre nó da planta, contando a partir do solo.

As plantas da linha central de cada unidade experimental foram cortadas a uma altura média de 20 cm do solo e pesadas. Três plantas foram amostradas para separação dos componentes morfológicos em caule, folhas verdes, folhas senescentes, panícula sem grãos e grãos. Estes componentes morfológicos separados foram secados em estufa com ar circulante a 55 °C até peso constante para avaliação da participação final na massa seca total da forragem ensilada (g.kg MS). O restante das plantas foi triturado em picador de forragem, com tamanho de partículas médio de 14,53 mm, mensurada de acordo com Lammers et al. (1996).

Após a trituração, 200 gramas de amostra de cada silo foi retirada para avaliação do teor de matéria seca (MS). A forragem picada foi compactada em mini silos laboratoriais, dentro de 4 sacos plásticos. No primeiro saco interno havia 2 kg de areia seca e no segundo saco interno estava a forragem picada (8 kg), compactada. Furos na parte inferior do saco com forragem foram feitos para saída do efluente, captado pela areia do primeiro saco. Com auxílio de um aspirador de pó o ar foi retirado dos dois primeiros sacos. O terceiro e quarto sacos eram pretos para evitar entrada de ar e proteção contra luz solar.

A abertura dos silos ocorreram no dia 25/07/2017, 120 dias após a ensilagem. Na abertura, foi removida uma camada superior de silagem dos silos e amostras foram retiradas do interior dos mesmos. Uma das amostras retiradas (200 gramas) foi prensada por prensa hidráulica (Carver, Inc - Model C). Uma alíquota do líquido extraído da prensa foi utilizada para mensurar o nitrogênio amoniacal (NH<sub>3</sub>) pelo método phenol-hipoclorito (KOZLOSKI et al., 2006) e no restante do líquido foi medido o pH. A recuperação de matéria seca foi calculada de acordo com a metodologia descrita por Jobim et al. (2007).

Outra amostra de silagem foi retirada, pré seca em estufa a 55 °C por 72 horas, pesada e moída em 1mm em moinho de facas. Esta amostra foi utilizada para avaliação bromatológica e nutricional da silagem, posteriormente descrita. Uma terceira amostra foi retirada e congelada (-18 °C), depois utilizada para avaliação da produção de ácidos produzidos durante a fermentação das silagens.

A matéria seca total (MST) e a matéria mineral (MM) foram determinadas sequencialmente em estufa a 105 °C e mufla a 550 °C. A proteína bruta (PB) foi determinada pela destilação do N - método micro Kjeldahl e multiplicando o valor

final pelo fator 6,25 (AOAC, 2005). O extrato etéreo (EE) foi analisado com equipamento ANKOM XT15 (ANKOM Technology). Foram pesadas 0,5 g de amostra, acondicionadas em saquinhos com porosidade de 25 microns para determinação da fibra em detergente neutro corrigida para cinzas (FDNc), com uso de autoclave e  $\alpha$ -amilase termoestável (Termamyl 120L, Novozimes Latin America, LTDA) e queima de resíduo tratado em mufla a 550 °C (SENGER et al., 2008). Outra amostra (0,5 g), acondicionadas em saquinhos de 25 microns usada para determinar a fibra em detergente ácido (FDA) (SENGER et al., 2008) e lignina em detergente ácido (LDA) com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72% (12 M), em sequencia analítica.

O conteúdo de açúcares solúveis na MS (AS) foi determinado pela extração com etanol 70° e estimado por colorimetria (HALL, 2000). Os ácidos acético, propiônico e butírico produzidos durante a fermentação foram mensurados (TANGERMAN e NAGENGAST, 1996). O ácido láctico foi submetido ao processo de derivatização com auxílio N-terc-butilmetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) (OMS-OLIU et al., 2011). As concentrações de todos os ácidos foram analisadas em cromatografia gasosa equipada com detector de ionização de chama (GC-FID), Varian Star 3400CX (CA, EUA). Para a quantificação do teor de amido total das silagens, a amostra foi submetida a digestão enzimática com amilase (Termamyl 120L), amiloglicosidase (AMG 300L) e protease (Flavourzyme 500L). Os açúcares resultantes dessa digestão foram quantificados em espectrofotômetro a  $\lambda = 505$  nm de absorbância, utilizando o kit glicose oxidase-peroxidase (GOP) como reativo de cor (WALTER et al., 2005).

Amostras foram utilizadas para a análise e fracionamento do nitrogênio (N) utilizando método micro Kjeldahl (LICITRA et al., 1996). A extração do nitrogênio insolúvel (NI) foi realizada com tampão borato fosfato e azida sódica. O nitrogênio solúvel (NS) foi estimado pela subtração do NI do N total. As frações de N insolúveis em detergente neutro (NIDN) e ácido (NIDA) foram realizadas quantificando o N em amostras previamente tratadas em ambas as soluções.

Amostras de 1mm com peso de 1g e em duplicata foram utilizadas para avaliação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca e digestibilidade da FDN (FDN<sub>dig</sub>). As amostras foram acondicionadas em saquinhos selados de poliéster (25 microns) e posteriormente inoculadas com líquido ruminal proveniente de um bovino fistulado recebendo dieta a base de feno e milho moído. Para a execução deste estudo foi realizada a coleta do líquido ruminal de bovinos dotados de cânula de

rúmen de 10 cm. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA), protocolo nº 5439180417. Os saquinhos foram colocados em recipientes, adicionado o líquido ruminal e solução tamponante com pepsina, incubadas a 39 °C por 48 horas com a agitação contínua. Após 48 horas, os saquinhos foram retirados, lavados e secos em estufa a 105 °C por 8 horas e então pesados. Posteriormente os saquinhos foram submetidos a análise de FDN (previamente descrito), lavados, secos em estufa a 105 °C por 8 horas, pesados e queimados em mufla a 550°C por 4 horas e pesagem das cinzas (VAN SOEST, 1994)

Foram estimados via modelo MILK 2006 o potencial produtivo de leite por hectare e por tonelada de matéria seca das silagens. O mesmo modelo forneceu estimativas segundo NRC (2001) da energia líquida de lactação (ELI – Mcal kg MS) e NDT (g.kg MS) (SCHWAB et al., 2003).

A eficiência da utilização do N foi calculada como a conversão do total de N disponível para as plantas, no solo e como adubação, em produtividade final de silagem e estimada via modelo, de leite. A quantidade de N total foi calculada através da soma da adubação e da quantidade de N disponível da camada de 0 a 20 cm do solo através do teor de MO em 2000m<sup>2</sup> (MOLL et al., 1982). Considerou-se quantidade produzida de cada variável com 1 kg de N disponível.

As variáveis foram analisadas inicialmente quanto a normalidade da distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk. Utilizou-se o procedimento Mixed (*proc. Mixed*) para avaliação e comparação de médias dos tratamentos. Os efeitos da inoculação e híbridos foram analisados pelo teste F, primeiramente analisando a interação entre variáveis e posteriormente, quando não houvesse interação, os fatores isoladamente. Foi usado o pacote estatístico SAS<sup>®</sup> University Edition (SAS INSTITUTE, 2017). A significância do modelo considerada como: significativo ( $P \leq 0,05$ ) e tendência de ocorrência ( $0,05 < P \leq 0,1$ ).

Modelo experimental utilizado foi o seguinte:

$$Y_{ijk} = \mu + H_i + I_j + HI_{ij} + \beta_k + \epsilon_{ijk},$$

em que:  $Y_{ijk}$ : representa o valor observado que recebeu o tratamento de ordem “ijkl”;  $\mu$ : representa a média geral obtida;  $H_i$ : representa o efeito dos híbridos de ordem “i”;  $I_j$ : representa o efeito da inoculação de ordem “j”;  $HI_{ij}$ : representa o efeito da interação entre híbrido e inoculação de ordem “ij”;  $\beta_k$ : representa o efeito dos blocos

de ordem “k”; eijk: componente do erro aleatório associado ao i – híbrido, j- inoculação, k - efeito de bloco.

## Resultados

A inoculação com *A. brasilense* promoveu alterações na composição morfológica das plantas de sorgo ensiladas (Tabela 1). As plantas provenientes da inoculação tenderam ( $P \leq 0,1$ ) a apresentar redução na massa de colmos. Apesar dessa tendência, observou-se que as plantas em que houve a inoculação das sementes o diâmetro dos colmos foi maior. Da mesma forma as plantas inoculadas tiveram maior comprimento de panículas, o que representa crescimento diferenciado de algumas estruturas como resultado da inoculação com *A. brasilense*.

Tabela 1 - Produtividade de matéria seca de forragem, características morfológicas e químicas de plantas para ensilagem oriundas de híbridos de sorgo inoculados com *Azospirillum brasilense*.

	Inoculação (I)		Híbrido (H)		Estatística		Teste F		
	Controle	<i>A. brasilense</i>	ADV 2499	AG 2005	Média	EPM*	I	H	H x I
Matéria seca <sup>1</sup>	334,9	341,5	313,3	362,8	338,0	11,20	0,7673	0,0339	0,7646
Produção <sup>2</sup>	13154	13643	13987	12810	13398	506	0,6406	0,2712	0,2901
Folhas <sup>3</sup>	10,5	11,0	9,1	12,4	10,9	0,65	0,5819	0,0197	0,6037
Colmo <sup>3</sup>	30,7	29,8	33,7	26,8	30,1	1,03	0,0895	<,0001	0,6051
Senescente <sup>3</sup>	8,0	9,2	11,3	6,9	9,0	0,99	0,9968	0,0289	0,2585
Panícula <sup>3</sup>	12,6	14,8	10,1	17,3	13,9	1,55	0,3416	0,0416	0,6749
Grãos <sup>3</sup>	37,1	35,2	35,8	36,5	36,0	1,46	0,5337	0,7679	0,3634
Alt. planta <sup>4</sup>	190,8	188,8	194,0	185,6	189,8	2,76	0,7113	0,1373	0,3744
D. colmo <sup>4</sup>	1,9	2,2	2,2	2,0	2,2	0,05	0,0026	0,0023	0,1223
C. panícula <sup>4</sup>	26,9	28,7	27,2	28,4	2,3	0,56	0,0549	0,3211	0,4941
EUNS <sup>5</sup>	45,7	47,4	44,3	46,3	46,5	1,75	0,6697	0,3162	0,3350

\*Erro padrão da média; <sup>1</sup> MS em g.kg de forragem; <sup>2</sup> produção total de matéria seca em kg ha<sup>-1</sup>; <sup>3</sup> total de componentes estruturais na matéria seca das plantas em g.kg MS; <sup>4</sup> altura de planta, comprimento de panícula e diâmetro de colmo em cm; <sup>5</sup> Eficiência da utilização do N para produção de silagem kg MS.kg N.

Apesar de terem sido encontradas tais alterações morfológicas, não houve com a inoculação significativo aumento na produção de MS das plantas para silagem, da mesma forma que *A. brasilense* não afetou o tamanho das plantas e a participação de grãos na silagem. Com a similaridade de produção de MS entre

plantas inoculadas e não inoculadas, a eficiência de utilização do N se manteve similar.

Nos híbridos houve maior teor de MS nas plantas no AG2005, mas entre os híbridos observou-se similaridade na produtividade de silagem, participação de grãos na MS, altura total e comprimento de panícula das plantas ensiladas. Da mesma forma como na inoculação, a similaridade da produtividade entre híbridos levou a paridade na eficiência de utilização de N entre ambos híbridos testados. O híbrido AG2005 que possuiu maior teor de MS na colheita, teve diminuída a participação de colmos, enquanto que maior porcentagem de folhas e peso total de panícula sem grãos foram ensilados quando comparado ao híbrido ADV2499. O ADV2499 se caracterizou pelo maior desenvolvimento dos colmos, tanto em massa nas plantas quanto em diâmetro final, além de maior senescência foliar. Não foram observadas interações entre híbridos e as estirpes de *A. brasilense* utilizadas.

As silagens do híbrido AG2005 inoculado com *A. brasilense* demonstraram aumento de 8,2 g.kg de MS no conteúdo de PB (99,3 g.kg MS inoculado e 91,1 g.kg MS não inoculado) enquanto houve similaridade no híbrido ADV 2499 inoculado e não inoculado. Inversamente, no fracionamento de carboidratos das silagens, observou-se que os CHOT nas plantas não inoculadas do híbrido AG 2005 foram superiores às inoculadas com *A. brasilense* - médias de 798,3 e 785,4 g.kg MS, respectivamente.

Nos conteúdos de carboidratos solúveis, a inoculação no híbrido AG2005 resultou em silagens com conteúdo de açúcares solúveis aproximadamente 20% superior às plantas não inoculadas, com médias de 21,8 e 17,6 g.kg MS, respectivamente. Como resultado da inoculação com *A. brasilense* nas plantas de sorgo, de maneira geral os dois híbridos quando inoculados possuíram maior conteúdo de parede celular, observado pelo aumento no conteúdo de FDNc nas silagens.

Os conteúdos de CNF, o perfil de ácidos voláteis (CA1) e ácido láctico (CA2), amido (CB1) e frações digestíveis (CB3) e indigestíveis (CC) da fibra não foram alteradas pela inoculação. O comportamento oposto nos conteúdos de FDNc e açúcares solúveis (CA4) e PB encontrados com a inoculação fez com que a digestibilidade da MS fosse similar entre os tratamentos inoculado e não inoculado.

Tabela 2 – Composição bromatológica, digestibilidade *in vitro* da matéria seca, características fermentativas, fracionamento de carboidratos e nitrogênio nas silagens de híbridos de sorgo provenientes da inoculação com *A. brasilense*.

	Inoculação (I)		Híbrido (H)		Estatística		Teste F		
	Controle	A. <i>brasilense</i>	ADV 2499	AG 2005	Média	EPM*	I	H	H x I
<i>Valor bromatológico e digestibilidade</i>									
MS <sup>1</sup>	329,3	316,7	288,1	357,8	322,9	10,20	0,1085	<,0001	0,6961
MM <sup>2</sup>	61,9	63,7	62,6	62,9	62,8	1,20	0,5247	0,9638	0,4196
PB <sup>2</sup>	91,0	93,7	89,5	95,2	92,3	1,40	0,2283	0,0172	0,0197
EE <sup>2</sup>	46,7	43,5	40,6	50,4	45,1	2,00	0,4780	0,0147	0,2878
FDNc <sup>2</sup>	472,4	492,5	497,8	461,9	482,4	7,30	0,0451	0,0066	0,6198
FDA <sup>2</sup>	302,5	308,3	298,7	310,9	305,2	3,00	0,3885	0,0494	0,6267
Lignina <sup>2</sup>	53,5	55,2	66,4	42,3	54,3	3,70	0,7214	0,0001	0,1964
DiMS <sup>2</sup>	486,9	486,4	469,4	501,8	486,6	7,80	0,8328	0,0484	0,7768
NH <sub>3</sub> <sup>3</sup>	45,6	54,1	32,5	64,5	49,6	5,60	0,3050	0,0022	0,6218
NIDN <sup>2</sup>	27,4	28,3	30,8	24,8	27,6	1,33	0,8232	0,0171	0,1207
NIDA <sup>2</sup>	12,2	12,8	14,8	10,2	12,5	0,63	0,2013	<,0001	0,3736
NS <sup>3</sup>	34,9	37,0	35,3	36,6	36,0	0,99	0,3033	0,5045	0,5361
pH	3,9	3,9	3,9	4,0	3,9	0,01	0,5683	0,0905	0,3620
RMS <sup>2</sup>	890,5	918,6	890,5	925,9	911,8	93,40	0,6924	0,1438	0,4435
<i>Perfil dos carboidratos</i>									
CHOT <sup>2</sup>	800,3	798,6	807,1	793,0	800,5	3,29	0,7958	0,0202	0,0075
CNF <sup>2</sup>	320,0	307,8	310,6	320,6	313,3	7,62	0,4820	0,5305	0,4452
CA1 <sup>2</sup>	15,5	18,9	18,4	16,0	17,2	1,59	0,3296	0,4833	0,6026
CA2 <sup>2</sup>	18,0	20,0	20,8	17,2	19,0	1,52	0,5443	0,2729	0,6690
CA4 <sup>2</sup>	14,9	17,2	12,5	19,6	16,1	1,06	0,0152	<,0001	0,0288
CB1 <sup>2</sup>	199,0	196,9	204,6	191,3	197,9	7,03	0,8864	0,3689	0,2115
CB2 <sup>2</sup>	86,2	48,4	54,3	95,8	65,6	14,99	0,1183	0,1148	0,2476
CB3 <sup>2</sup>	357,7	383,5	349,8	381,0	370,6	8,91	0,1361	0,1171	0,7994
CC <sup>2</sup>	117,5	108,8	115,5	108,4	113,2	3,85	0,3010	0,4178	0,4308

\*Erro padrão da média; <sup>1</sup> MS em g.kg de silagem; <sup>2</sup> MM, PB, EE, FDNc, FDA, lignina, DiMS, RMS, CHOT, CNF, soma de ácidos voláteis (CA1), ácido láctico (CA2), açúcares solúveis em água (CA4), amido (CB1), fibra solúvel (CB2), fibra digestível (CB3), fibra indigestível (CC), NIDN e NIDA todos valores em g.kg MS; <sup>3</sup> Nitrogênio solúvel (NS) e NH<sub>3</sub> em % do N total.

As variáveis fermentativas das silagens – pH, NH<sub>3</sub> e RMS não foram alteradas pela inoculação das sementes, bem como os conteúdos de MS, MM, EE, FDA e lignina. Embora maior conteúdo de PB encontradas nas silagens do híbrido AG2005 inoculado, observou-se que o perfil de solubilidade do N não foi alterado pela inoculação das plantas de sorgo.

Assim como na colheita das plantas, a MS das silagens do híbrido AG2005 se manteve superior ao híbrido ADV2499. A maior MS e relacionando-se a algumas

alterações nas plantas, principalmente o aumento de folhas verdes, fizeram com que houvesse acréscimo no teor de extrato etéreo das silagens e diminuição da participação da FDN e de LDA. Embora tenha havido aumento da FDA para o híbrido AG2005, a DivMS foi 32 g.kg MS superior que o híbrido ADV2499. O teor de NH<sub>3</sub> foi maior também no híbrido AG2005, indicando maior atividade fermentativa. Na partição de CHO e N houve maior teor de CHOT no híbrido ADV2499 e devido ao maior conteúdo de parede celular observado, resultou em aumento no NIDN e NIDA.

Ao se estimar a produção de leite pelo modelo MILK, não foram observadas respostas positivas da inoculação no valor energético da silagem, eficiência alimentar e produtividade de leite por hectare (Tabela 3). A eficiência de utilização de nitrogênio estimada para produção de leite não foi alterada visto que não houve perspectiva de aumento de produtividade e eficiência alimentar.

Tabela 3 - Estimativas energéticas, produção de leite por tonelada de matéria seca e produtividade de leite por hectare das silagens de sorgo oriundas de híbridos inoculados com *A. brasilense* segundo modelo MILK 2006.

	Inoculação (I)		Híbrido (H)		Estatística		Teste F		
	Controle	<i>A. brasilense</i>	ADV 2499	AG 2005	Média	EPM*	I	H	H x I
NDT <sup>1</sup>	60,5	61,2	60,9	60,7	60,87	0,64	0,6592	0,8725	0,7785
ELI <sup>2</sup>	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	0,02	0,9667	0,7728	0,7845
Leite –MS <sup>3</sup>	1185	1198	1192	1192	1192	22	0,8040	0,9955	0,7831
Leite – ha <sup>4</sup>	15429	16612	16668	15158	16020	658	0,3897	0,2827	0,3647
EUNPL <sup>5</sup>	53,8	56,8	57,9	52,7	55,6	2,28	0,4455	0,3340	0,3702

\*Erro padrão da média; <sup>1</sup> NDT em g.kg MS; <sup>2</sup> ELI em Mcal.kg; <sup>3</sup> Leite – MS = produção de leite estimada por tonelada de MS em Kg; <sup>4</sup> Leite – ha = produção de leite estimada por hectare em Kg; <sup>5</sup> EUNPL = eficiência de utilização de N para produção de leite em kg leite.kg N.

Embora efeitos sobre a qualidade da silagem tenham sido observadas entre os híbridos, o modelo não estimou superioridade de qualquer híbrido no valor energético, estimativas de produção e produtividade de leite e EUNPL.

## Discussão

Os estudos que testaram a inoculação em plantas de sorgo são encontrados em menor número na literatura científica relacionado à bactérias diazotróficas, quando

comparado a outras culturas, principalmente quando compara-se ao milho e trigo (PACOVSKY et al., 1985; GARCÍA-OLIVARES et al., 2006; PEÑA, 2008; NAKAO et al., 2018). Assim como no milho, os efeitos ocorrem com maior ou menor intensidade de acordo com a interação entre genótipos e bactéria. O efeito observado no aumento do comprimento das panículas podem levar ao aumento da produtividade de grãos em plantas com a inoculação. A potencialidade da inoculação nessa cultura é grande, visto a distribuição geográfica do cultivo e as multifinalidades de uso dessa planta, destacando-se na alimentação animal e também humana.

Melhoria nas taxas de absorção de nutrientes do solo, relacionados aos efeitos da inoculação na produção de fitohormônios foram relacionadas com a alteração na morfologia das raízes (TIEN et al., 1979; BASHAN e BASHAN, 2010; CASTILLO et al., 2015). (ANDRADE e ZOZ, 2019) encontraram aumento da massa de raízes em plantas de genótipo de sorgo inoculados com *A. brasilense*. Os efeitos são encontrados basicamente em aumento das raízes, que expandem-se em até 30% a mais que plantas não inoculadas, aumentando a área de absorção devido a maior área de exploração das raízes na solução do solo. Foram observadas maiores taxas de absorção de N e P nas plantas de sorgo inoculadas (PACOVSKY et al., 1985). É possível que isto tenha ocorrido neste estudo e que a inoculação tenha beneficiado o crescimento também dos colmos pela similaridade de tecidos e células e a conexão entre os dois órgãos.

Embora as folhas sejam os órgãos mais fotossintetizadores, os colmos mesmo que em menor escala também podem realizar fotossíntese. O aumento do diâmetro de colmos induzido pela inoculação pode beneficiar o transporte de nutrientes relacionado ao aumento do diâmetro dos feixes vasculares e também a produção de energia pela fotossíntese (TAIZ e ZEIGER, 2013). A ocorrência de maior participação de FDN nas silagens de plantas inoculadas demonstra que houve mudança na formação da parede celular das plantas. O aumento da fração FDN sem alteração nas demais frações (FDA e LDA) indica aumento da hemicelulose (VAN SOEST, 1994).

O aumento da quantidade de AS residuais da fermentação nas silagens de plantas de sorgo provenientes da inoculação pode ter relação com capacidade tamponante das forragem ensilada (JOBIM et al., 2007). Maior capacidade tamponante da forragem ensilada resulta em maior tempo de ação de microrganismos para acidificação da massa até a estabilização da atividade das bactérias fermentadoras (HOOKE e HATFIELD, 2003; KUNG et al., 2018). Assim,

com maior tempo de fermentação o consumo de substrato energético solúvel foi maior. A fração carboidrato A4 nas plantas de sorgo é composta basicamente pelos monossacarídeos glicose e frutose e dissacarídeo sacarose (HALL, 2000), os quais todos podem ser usados como fonte de energia bacteriana na fermentação anaeróbica.

Aumento na concentração de N em tecidos aéreos e também nas raízes já foram relacionados à inoculação com *A. brasilense* em plantas de sorgo e milho (PACOVSKY et al., 1985; GALINDO et al., 2016). Aumento do conteúdo de N nos tecidos se relaciona com maior absorção, a qual pode ser devido a FBN ou pelo aumento das raízes induzido pelo fitohormônios, uma vez que a adubação nitrogenada foi a mesma. A maior concentração deste nutriente na parte aérea das plantas inoculadas e colhidas para silagem possibilitou que houvesse aumento do teor de PB no híbrido AG 2005.

As alterações ocorridas na composição química das silagens das plantas inoculadas não foram suficientes para alterar a estimativa energética, eficiência alimentar e produtividade de leite. Aumento do conteúdo de FDN representa diminuição de conteúdo celular, o que não estimula ao aumento da degradabilidade ruminal e assim, melhora nas estimativas de energia (VAN SOEST, 1994; HALL, 2000). O modelo MILK 2006 trabalha avaliando a produção de MS por hectare, a qual não teve alteração com a inoculação. Da mesma forma as mudanças nos padrões bromatológicos não foram suficientes para alterar os resultados da simulação (SCHWAB et al., 2003). Em não havendo alterações nos inputs do modelo, a quantidade estimada dos parâmetros não foi alterada. Igualmente, o valor energético dos alimentos necessita que haja transformações importantes dentro da avaliação bromatológica do alimento a fim de melhorar a participação de componentes mais digestíveis (HALL, 2000). Embora isso tenha acontecido entre híbridos, a produção de MS menor no AG 2005, o qual apresentou melhores parâmetros bromatológicos, fez com que na simulação entre híbridos estes tivessem potencial de produção semelhantes.

## **Conclusões**

A inoculação com *A. brasilense* em híbridos de sorgo não ocasionou aumento na produção de MS de silagem. Na morfologia das plantas, o inoculação

aumentou o diâmetro dos colmos e o comprimento das panículas das plantas mas não aumentou a participação de grãos na silagem.

Com a inoculação nas sementes do híbrido AG2005 é possível obter silagens com maior teor de PB. Apesar disso, a inoculação não alterou a digestibilidade da MS, os teores de energia e a estimativa de produtividade de leite das silagens de sorgo.

### Referências bibliográficas

ANDRADE, A. D. F. et al. Azospirillum brasilense inoculation methods in corn and sorghum. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, vol.49, p. 1 – 9, 2019.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 16th ed. AOAC International, Arlington, 474p, 1995.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549–579, 2005.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium azospirillum promotes plant growth-a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77–136, 2010.

BLUM, A.; OKON, Y. Improvement of the water status and yield of field-grown grain sorghum (sorghum bicolor) by inoculation with azospirillum brasilense. **The Journal of Agricultural Science**, v. 110, n. 2, p. 271–277, 1988.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 365–372, 2000.

CASSÁN, F. D.; GARCÍA DE SALAMONE, I. **Azospirillum sp: cell physiology, plant response, agronomic and environmental research in Argentina**. 1ª ed., ISBN 978-987-98475-8-9, Buenos Aires, 2008.

CASTILLO, P. et al. **Phytohormones and other plant growth regulators produced by PGPR: The genus azospirillum**. In: Handbook for Azospirillum In: CASSÁN F., OKON Y., CREUS C. (eds). Springer, Cham: Technical Issues and Protocols. p. 115 – 138, 2015.

COMISSAO DE QUIMICA E FERTILIDADE DO SOLO DO RS/SC – CQFS-RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Porto Alegre: SBCS- NRS, 400p, 2004.

MOREIRA, F. M. D. S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: Diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74- 99, 2010.

DIAZ-FRANCO, A.; JACQUES-HERNÁNDEZ, C.; PEÑA DEL RIO, M. Productividad

de sorgo em campo associada com micorriza arbuscular y Azospirillum brasilense. **Universidade y Ciencia**, v.24, n.3, p. 229 – 237, 2008.

DÔBEREINER, J. Azotobacter paspali sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de Paspalum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 357–365, 1966.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA - EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3ª ed. ,Brasília – DF, 353 p., 2013.

GALINDO, F. S. et al. Corn yield and foliar diagnosis affected by nitrogen fertilization and inoculation with Azospirillum brasilense. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 40, p. 1–18, 2016.

GODOY, J.C.S. et al. Produtividade de milho em resposta a doses de nitrogênio com e sem inoculação das sementes com azospirillum brasilense. **Campo Digital**, v.6, n.1, p.26-30, 2011.

GARCÍA-OLIVARES, J. et al.. Azospirillum brasilense biofertilization in sorghum at northern Mexico. **Agricultura técnica en México**, v. 32, n. 2, p. 135–141, 2006.

HALL, M. B. **Neutral detergent-soluble carbohydrates: nutritional relevance and analysis – a laboratory manual**. University of Florida Extension – Extension, Institute of Food and Agricultural Sciences, n. 339, 2000.

HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 579–598, 2010.

HIGGS, R. J. et al. Updating the Cornell Net Carbohydrate and Protein System feed library and analyzing model sensitivity to feed inputs. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p. 6340–6360, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9379>>.

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of Azospirillum brasilense and A. lipoferum improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1, p. 413–425, 2010.

JOBIM, C. C. et al.. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, suplemento especial, p.101-119, 2007.

KOZLOSKI, G. V. et al. Evaluation of two methods for ammonia extraction and analysis in silage samples. **Animal Feed Science and Technology**, v. 127, n. 3–4, p. 336–342, 2006.

KUNG, L. et al. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4020–4033, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13909>>.

LAMMERS, B. P.; BUCKMASTER, D. R.; HEINRICHS, A. J.. A simple method for the

analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. **Journal of dairy science**, v. 79, n. 5, p. 922-928, 1996.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. M.; VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 57, n. 4, p. 347–358, 1 mar. 1996. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0377840195008373>>. Acesso em: 10 jul. 2019.

MOLL, R.; KAMPRATH, E.; JACKSON, W. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. **Agronomy Journal**, v. 74, n.3, p. 562–564, 1982

NAKAO, A.L. et al. Intercropping *Urochloa brizantha* and sorghum inoculated with *Azospirillum brasilense* for silage. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 49, n. 3, p. 501–511, 2018.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n. 12, p. 1591-1601, 1994.

OMS-OLIU, G. et al. Metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development, ripening, and postharvest shelf-life. **Postharvest Biology and Technology**, v.62, p. 7–16, 2011.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences Discussions**, v. 4, n. 2, p. 439-473, 2007.

PACOVSKY, R. S.; PAUL, E. A.; BETHLENFALVAY, G. J. Nutrition of sorghum plants fertilized with nitrogen or inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v. 85, n. 1, p. 145–148, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02197807>>.

PEÑA, M. A. A.; DÍAZ FRANCO, C.; HERNÁNDEZ J.H. Sorghum productivity in the field associated with arbuscular mycorrhiza and *Azospirillum brasilense*. **Universidad y Ciencia**, v. 24, n. 3, p. 229–237, 2008.

SANTINI, J. M. K. et al. Doses and forms of *Azospirillum brasilense* inoculation on maize crop. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 22, n. 6, p. 373–377, 2018.

SAS INSTITUTE. **Free Statistical Software-SAS University Edition | SASSAS Documentation**, Cary SAS Institute, 2017.

SCHWAB, E. C. et al. Estimating silage energy value and milk yield to rank corn hybrids. **Animal Feed Science and Technology**, n. 109(1-4), p. 1-18, 2003.

SENGER, C.C.D. et al. Short communication: Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and**

**Technology**, vol. 146, p.169-174, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. Ed. Artmed, Porto Alegre. 2013. 918 pag.

TANGERMAN, A.; NAGENGAST, F.M. A gas chromatographic analysis of fecal short-chain fatty acids, using the direct injection method. **Analytical Bioanalytical**, vol. 236, pag. 1–8, 1996.

TIEN, T.; GASKINS, M.; HUBBELL, D. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1016–1024, 1979. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/37/5/1016>>.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2ª Ed. Cornell University Press, 476 p. 1994.

WALTER, M.; SILVA, L. P. D; PERDOMO, D. M. X. Amido disponível e resistente em alimentos: adaptação do método da AOAC 996.11. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 39–43, 2005.

## 7 DISCUSSÃO

Esperava-se que, assim como em outros trabalhos realizados no mesmo tipo de solo (TONIN, 2016, BERTONCELLI et al., 2017, SKONIESKI et al., 2017 e SKONIESKI et al., 2019) que houvesse resposta da inoculação com *A. brasilense* no aumento da produtividade de MS para silagem. Entretanto, para as duas espécies este aumento não foi observado. De qualquer forma, haveria essa possibilidade de não obtenção de resposta positiva na produtividade. Assim como nos trabalhos acima citados e na revisão de literatura de (OKON e LABANDERA-GONZALEZ, 1994) os quais citam que até aproximadamente 30% dos estudos não encontram respostas da inoculação ou não conseguem identificar interação entre estirpes e híbridos.

Observou-se que efeitos da inoculação, entretanto, ocorreram em todos os híbridos na alteração da morfologia das plantas colhidas ou na composição química das silagens, o que representa as possibilidades de uso da inoculação para alterar as características das silagens de milho e sorgo. O evento mais importante ocorrido, e que se deu de maneira geral em todos os híbridos e nas duas espécies, foi o fato de ter havido melhoria significativa na formação dos órgãos reprodutivos das plantas, comprimento e diâmetro de espiga e comprimento de panícula, através do uso do inoculante. Embora não se tenha tomado essa medida, é possível que tenhamos tido grãos com maior tamanho, o que contribuiu para o aumento no diâmetro e comprimento das espigas e o maior comprimento final de panícula também pode estar relacionado com maior número de grãos.

Este efeito de aumento da massa dos grãos, associado ao maior tamanho final de plantas no milho, maior comprimento final de panículas e diâmetro de colmo no sorgo com uso da inoculação, parece mostrar que os efeitos da mesma são mais acentuados nas fases finais do ciclo das culturas. Talvez esse seja um motivo para que o sucesso da inoculação em aumentar a produtividade tenha acontecido em trabalhos avaliando a colheita para grãos, pois a colheita para silagem acontece mais precocemente. Associando os principais efeitos da inoculação, produção de fitohormônios e FBN, quanto maior o ciclo em que se faz a avaliação das plantas, maior pode ser a acumulação dos efeitos nas plantas. Os efeitos na inoculação em acumular biomassa das plantas de milho é maior a partir da entrada das mesmas nos estágios reprodutivos (TONIN, 2016).

O incremento da massa dos grãos em um dos híbridos de milho com a inoculação foi o principal evento encontrado nesse trabalho e que podemos então relacionar com a melhoria da qualidade bromatológica das silagens dessa espécie. O amido em suas duas formas de armazenamento é o principal carboidrato encontrado dentro dos grãos de milho e esta fração de CNF possui rápida taxa de degradação ruminal, o que aumenta o teor energético das silagens. Então, embora não tenhamos tido aumento de produtividade de MS com a inoculação, a perspectiva é que esta aumente a produção de energia das silagens de milho. Assim, é possível produzir silagens com maior potencial de fornecimento de nutrientes aos animais, o que aumenta o potencial de produção de ácido propionico no rúmen, principal precursor da síntese de lactose na glandula mamária, e responsável pelo aumento do potencial de produtividade animal.

É possível enfatizar que o uso da inoculação com *A. brasilense* para produção de silagens de milho e sorgo pode ser benéfico por dois motivos principais: aumento da produção da biomassa produzida nas duas espécies (TONIN, 2016; SKONIESKI et al, 2007, NAKAO et al., 2018) ou melhoria do valor nutricional das silagens, encontrado nesse trabalho. Os impactos na avaliação bromatológica nas silagens de sorgo foram mais brandos, embora há de se destacar aumento do teor de PB nas silagens como um dos principais efeitos encontrados com a inoculação nesta espécie.

A inoculação com *A. brasilense* causou alterações interessantes na forma como o N foi observado na silagem de milho, com maior participação da forma solúvel de N nas silagens. As folhas são os locais aonde normalmente se encontra formas de N solúveis, pois em outros órgãos como nos grãos e principalmente nos caules o N se encontra em formas ligadas a carboidratos, lignina ou outros compostos, o que diminui a solubilidade e a degradabilidade ruminal (VANS SOEST, 1994; LICITRA et al., 1996). A FBN pode ser uma via de obtenção de maior quantidade de N assimilável pelas plantas (HUERGO et al., 2008). Mas a passagem das formas assimiláveis de N do solo para dentro das raízes depende de gasto de energia pelas plantas (BREDEMEIER e MUNDSTOCK, 2000). A energia pode ser fornecida pelo aumento da fotossíntese devido ao maior índice de área foliar ou aumento do teor de clorofila, efeitos descritos já descritos pela inoculação nas plantas.

## 8 CONCLUSÃO GERAL

A inoculação com *Azospirillum brasilense* não aumentou a produtividade de MS para silagem das plantas de milho e sorgo nos híbridos utilizados.

Há alterações na morfologia das plantas induzidas pela inoculação das sementes, como aumento no diâmetro e comprimento das espigas de milho e panícula nas plantas de sorgo, altura final de plantas e diâmetro dos colmos.

Nas silagens de milho, a inoculação aumenta o teor de amido e a solubilidade da proteína, o que resulta em incremento da digestibilidade da MS, maior conteúdo de energia e silagens de milho com maior potencial de produção de leite.

Nas silagens de sorgo, o uso da inoculação aumenta o teor de PB na silagem do híbrido AG 2005 e no conteúdo de fibra em detergente neutro. Não se observou melhoria da digestibilidade, da densidade energética e estimativa de produtividade de leite nas silagens de sorgo oriunda de plantas inoculadas.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, R. M. et al. Resposta do milho verde à inoculação com *Azospirillum brasilense* e níveis de nitrogênio. **Ciência Rural**, v. 44, n. 9, p. 1556-1560, 2014.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549–579, 2005.
- BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S. N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 80, n. 2, p. 199-209, 2008.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77 – 136, 2010.
- BERNARDES, T. F.; DO RÊGO, A. C. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1852–1861, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7181>>.
- BERTONCELLI, P. et al. O manejo de inverno e inoculação de sementes influenciam na produtividade e qualidade da silagem de milho sob sistema plantio direto. **Revista Ceres**, v. 64, n. 5, p. 523–531, 2017.
- BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 365–372, 2000.
- CASSÁN, F. D.; GARCÍA DE SALAMONE, I. **Azospirillum sp: cell physiology, plant response, agronomic and environmental research in Argentina**. 1ª ed., ISBN 978-987-98475-8-9, Buenos Aires, 2008.
- CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117–130, 2016.
- 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 of Plant Growth Regulation**, n. 33, p. 440 – 459, 2014.
- CASTILLO, P. et al. **Phytohormones and other plant growth regulators produced by PGPR: The genus *azospirillum***. In: Handbook for *Azospirillum*. In: CASSÁN F., OKON Y., CREUS C. (eds). Springer, Cham: Technical Issues and Protocols. p. 115 – 138, 2015.
- DAY, J.; NEVES, M.; DÖBEREINER, J.; Nitrogenase activity on the roots of tropical forage grasses. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 2, n. 7, p. 107-112, 1975.

- DOBBELAERE S., OKON Y. **The plant growth-promoting effect and plant responses**. In: ELMERICH, C., NEWTON, W.E. (eds) Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations. Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress, Springer, Dordrecht, v. 5, p. 145 – 170, 2007.
- DOBBELAERE, S. et al. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and soil**, v. 212, n. 2, p. 153-162, 1999.
- DÖBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no Brasil. **Estudos Avançados**, v.4, n. 8, p. 144-152, 1990.
- DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 357–365, 1966.
- FERRARETTO, L. F.; SHAVER, R. D. Meta-analysis: Effect of corn silage harvest practices on intake, digestion, and milk production by dairy cows. **Professional Animal Scientist**, v. 28, n. 2, p. 141-149, 2012.
- FERRARETTO, L. F.; SHAVER, R. D.; LUCK, B. D. Silage review: Recent advances and future technologies for whole-plant and fractionated corn silage harvesting. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 3937–3951, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030218303199>>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- FERRARETTO, L. et al. Effect of corn silage hybrids differing in starch and neutral detergent fiber digestibility on lactation performance and total-tract nutrient digestibility by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 1, p. 395-405, 2015.
- FOX, D. et al. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. **Animal Feed Science and Technology**, v. 112 n. 1-4, p. 29-78, 2004.
- GALINDO, F. S. et al. Corn yield and foliar diagnosis affected by nitrogen fertilization and inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 40, p. 1–18, 2016.
- GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 30–39, 2014.
- HALL, M. B. **Neutral detergent-soluble carbohydrates: nutritional relevance and analysis – a laboratory manual**. University of Florida Extension – Extension, Institute of Food and Agricultural Sciences, n. 339, 2000.
- HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 579–598, 2010.
- HUERGO, L. F. et al. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F. D.; SALAMONE, I. G. DE (Eds.). ***Azospirillum* sp.: cell physiology**,

**plant interactions and agronomic research in Argentina.** 1. ed. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 276.

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1, p. 413–425, 2010.

LANZAS, C. et al. A revised CNCPS feed carbohydrate fractionation scheme for formulating rations for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, n. 136, v. 3-4, p. 167-190, 2007.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. M.; VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 57, n. 4, p. 347–358, 1 mar. 1996. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0377840195008373>>. Acesso em: 18 jul. 2016.

LONGHINI, V.Z. et al. Inoculation of Diazotrophic Bacteria and Nitrogen Fertilization in Topdressing in Irrigated Corn. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 2, p. 338–347, 2016.

MELLO, R.; NÖRNBERG, J. L. Fracionamento dos carboidratos e proteínas de silagens de milho, sorgo e girassol. **Ciência Rural**, v.34, n.5, p.1537-1542, 2004.

NAKAO, A.L. et al. Intercropping *Urochloa brizantha* and sorghum inoculated with *Azospirillum brasilense* for silage. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 49, n. 3, p. 501–511, 2018.

KHAN, N.A. et al. Nutritive value of maize silage in relation to dairy cow performance and milk quality. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 95, n. 2, p. 238–52, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24752455>>.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL- NRC. Nutrient Requirement Tables. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7ª Ed. National Academies Press, Washington, DC. 405 p. 2001.

NUMOTO, A.Y. et al. Agronomic performance and sweet corn quality as a function of inoculant doses (*Azospirillum brasilense*) and nitrogen fertilization management in summer harvest. **Bragantia**, v. 78, n. 1, p. 26–37, 2019.

PACOVSKY, R. S.; PAUL, E. A.; BETHLENFALVAY, G. J. Nutrition of sorghum plants fertilized with nitrogen or inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v. 85, n. 1, p. 145–148, 1985.

PEÑA, M. A. A.; DÍAZ FRANCO, C.; HERNÁNDEZ J.H. Sorghum productivity in the field associated with arbuscular mycorrhiza and *Azospirillum brasilense*. **Universidad y Ciencia**, v. 24, n. 3, p. 229–237, 2008.

RODRIGUEZ, H. et al. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 11, p. 552–555, 2004.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology**. 4.ed. Belmont: Wadsworth Publishing Company, Belmont – CA.1992. 682p.

SANTINI, J.M.K. et al. Doses and forms of *Azospirillum brasilense* inoculation on maize crop. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 22, n. 6, p. 373–377, 2018.

SCHWAB, E. C. et al. Estimating silage energy value and milk yield to rank corn hybrids. **Animal Feed Science and Technology**, v. 1-4, n. 109, p. 1-18, 2003.

SKONIESKI, F. R. et al. Effect of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization rates on maize plant yield and silage quality. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 9, p. 722–730, 2017.

TABOSA, J.N. et al. **Genótipos de Sorgo Forrageiro no Semiárido de Pernambuco e Alagoas – Estimativas de Parâmetros Genéticos de variáveis de Produção**. XXIX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO - Águas de Lindóia, São Paulo, 2012

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. Ed. Artmed, Porto Alegre. 2013. 918 pag.

TIEN, T.; GASKINS, M.; HUBBELL, D. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1016–1024, 1979.

TONIN, T.J. **Adubação nitrogenada e inoculação com *Azospirillum brasilense* na cultura do milho para grão e silagem**. Dissertação de mestrado. UFSM, Santa Maria, 2016. 78 pág.

TORTORA, M.; DIAZ, J. R.; PEDRAZA, R. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 4, p. 275–286, 2011.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2<sup>a</sup> Ed. Cornell University Press, 476 p. 1994.

VON PINHO, R. G. et al. Produtividade e qualidade da silagem de milho e sorgo em função da época de semeadura. **Bragantia [online]**, v.66, n.2, p.235-245, 2007.

YITBAREK, M. B.; TAMIR, B. Silage Additives: Review. **Open Journal of Applied Sciences**, v. 4, n. 5, p. 258 – 274, 2014.

ZOPOLLATTO, M. et al. Alterações na composição morfológica em função do estágio de maturação em cultivares de milho para produção de silagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 3, p. 452–461, 2009.