



Monitoramento Populacional e Promoção de Crescimento de Cana-de-Açúcar por Bactérias Diazotróficas no Sistema de Mudanças Pré-Brotadas⁽¹⁾.

Letícia Castro Nogueira⁽²⁾; Flaviane da Silva Ribeiro⁽²⁾; Camila Souza da Fonseca⁽⁴⁾; Otavio Queiroz⁽²⁾; Silvana Gomes dos Santos⁽³⁾; Verônica Massena Reis⁽⁵⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos do CNPQ Projeto 470824/2013-1.

⁽²⁾ Estudante de Engenharia Florestal; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; Seropédica, Rio de Janeiro; leticiacnogueira@gmail.com; Estudante de Engenharia Agrônoma; flavianesr07@gmail.com; otavioqueiroz7@hotmail.com; ⁽³⁾ Discente de Doutorado CPGA-CS; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; E-mail: silvanagomess@yahoo.com.br; ⁽⁴⁾ Apoio Técnico Embrapa Agrobiologia; Seropédica, Rio de Janeiro; E-mail: csf@hotmail.com; ⁽⁵⁾ Pesquisadora Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro; E-mail: veronica.massena@embrapa.br.

RESUMO: Bactérias diazotróficas são reconhecidas pela capacidade de promover o crescimento vegetal por diferentes vias, sendo as mais relatadas, a fixação biológica de nitrogênio e a produção de hormônios vegetais. A inoculação destas bactérias no sistema de mudas pré-brotadas pode acelerar e melhorar a qualidade destas mudas. Este trabalho tem o objetivo de avaliar o estabelecimento bacteriano após inoculação em duas variedades de cana-de-açúcar e em diferentes fases do sistema de produção de mudas, além do incremento proporcionado pelas bactérias no crescimento das plantas. Colmos vindos do campo foram preparados em laboratório através de tratamento térmico, fúngico e inoculação. Retirou-se também amostras de mudas aos 45 dias após inoculação para contagem da população bacteriana pelo método do Número Mais Provável. Aos 30 dias de cultivo das mudas em tubetes avaliou-se a massa seca da raiz, massa seca da parte aérea, altura, diâmetro, comprimento da folha +1, largura da folha +1 e número de folhas. Constatou-se que a aplicação do fungicida não afetou a população bacteriana do inoculante. O inoculante é eficiente em seu uso. A variedade IACSP955000 inoculada apresentou quase o dobro do número de bactérias quando comparada com o controle, mostrando a eficiência da inoculação. O tratamento térmico curto e fúngico não reduziu a população nativa de bactérias do colmo. A inoculação incrementou a massa seca da parte aérea e massa seca das raízes das plantas.

Termos de indexação: colonização, bactérias endofíticas, fixação biológica de nitrogênio.

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas no panorama agrícola brasileiro, visto sua importância na produção de açúcar e na matriz energética. Por isto torna-se necessário o estudo

comportamental, fisiológico e de técnicas que viabilizem seu crescimento e a sua produção (Schultz et al. 2012)

Bactérias diazotróficas são reconhecidas pela capacidade de fixar nitrogênio atmosférico e disponibilizar este nutriente as plantas. Diazotróficas são referidas também como Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP) por serem capazes de produzir diversos compostos promotores de crescimento vegetal e induzir repostas bioquímicas e moleculares na espécie hospedeira (Oliveira et al. 2002).

O sistema de Mudanças Pré-Brotadas (MPB) de cana-de-açúcar desenvolvido recentemente pelo Instituto Agrônomo de Campinas, SP; tem demonstrado características promissoras, como maiores ganhos econômicos com a redução de material propagativo, sanidade, uniformidade de estande e maior desenvolvimento inicial das plantas. O MPB visa à produção de mudas em tubetes a partir de gemas individualizadas ao contrário do sistema convencional que utiliza "colmo-semente" e o plantio de efetivamente uma planta em campo. (Landel et al., 2012) Ainda são necessários pesquisas que demonstrem a eficiência da inoculação de bactérias diazotróficas neste sistema.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento bacteriano e potencial de promoção de crescimento vegetal do inoculante recomendado para cana de açúcar ao longo do processo de produção de mudas.

MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar o efeito da inoculação na brotação e no acúmulo inicial de biomassa foi instalado um experimento em casa de vegetação automatizada com controle de umidade e temperatura na Embrapa Agrobiologia, localizada no km 7 da rodovia BR 465, no município de Seropédica-RJ



(22°44'38" S e 43°42'28" W e 26 m de altitude).

Utilizou-se duas variedades de cana-de-açúcar: RB867515 e IAC955000. O tratamento para produção de mudas seguiu o protocolo descrito por Landell et al. (2012). Colmos de cana-de-açúcar foram cortados em minitoletes contendo gemas individualizadas, logo depois realizado o tratamento térmico curto de acordo com Sanguino et al., (2006) e o tratamento fúngico por imersão dos colmos em solução fungicida Comet® a 0,1%. Logo após os colmos foram imersos durante 30 min no inoculante turfoso com a mistura de cinco estirpes bacterianas constituinte do inoculante para cana-de-açúcar: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) estirpe BR11281^T (PAL-5^T), *Herbaspirillum seropedicae* (Hs - BR11335 = HRC54), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Hr - BR11504 = HCC103), *Burkholderia tropica* (Bt - BR11366^T = PPe 8^T) e *Azospirillum amazonense* (Aa - BR11145 = CBAMc), com população de 10⁷ células bacterianas mL⁻¹. O tratamento controle consistiu na imersão dos toletes em turfa estéril apenas. Após inoculação os tratamentos foram dispostos em caixas contendo areia e vermiculita (2:1 v/v) estéril para a brotação e aos 15 dias transplantados para tubetes contendo substrato comercial Multiplant® com quatro repetições por tratamento. Aos 45 dias após a inoculação e 30 dias após transplante avaliou-se os parâmetros massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR). O diâmetro (D), altura (A), comprimento da folha +1 (CF+1) e a largura da folha +1 (LF+1) foram mensurados com régua e paquímetro.

Os dados foram analisados estatisticamente com auxílio do programa SISVAR através da ANOVA e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A contagem foi efetuada nas diferentes fases do crescimento das MPB. Primeira avaliação nas mudas colhidas no campo (T0), após tratamento fungico (Tr Fungicida), seguido pelo tratamento térmico (Tr. Térmico + Tr. Fungicida), após inoculação (Inoculado), contagem do inoculante (contagem do Inoculante na diluição 1:50 e na presença de 0,1% de fungicida) e contagem de raiz e parte aérea de plantas cultivadas em tubetes após 45 dias a inoculação. Para a contagem do número mais provável foram utilizados 10 g de cada amostra de colmo frescos, ou quando já brotado, foram separados em raiz e parte aérea. A metodologia utilizada foi a de Baldani et al. (2014). usando a Tabela de McCrady com três diluições. Os meios de cultivos semi-seletivos livres de N utilizados foram

JMV (seletivo para *Burkholderia* sp. - manitol 0,5%), LGI (seletivo para *Azospirillum amazonense* - sacarose 0,5%), LGI-P (seletivo para *Gluconacetobacter diazotrophicus* - sacarose 10%) e JNFB (seletivo para *Herbaspirillum* spp. - malato). O meio JNFB foi utilizado para avaliar as duas espécies de *Herbaspirillum* utilizadas no inoculante sendo o valor de contagem a média das duas estirpes. O crescimento bacteriano foi avaliado aos 7 dias após a inoculação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso do fungicida Comet® a base de piraclostrobina não afetou a população bacteriana (**Figura 1**) indicando que o tratamento das gemas com solução fungicida que é preconizada para a produção de MPB não interfere no estabelecimento inicial das bactérias do inoculante.

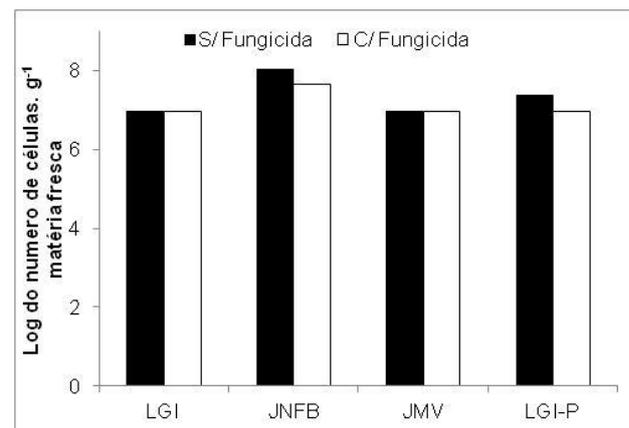


Figura 1: Contagem do número de células por g de inoculante contendo cinco espécies de bactérias diazotróficas estudadas na presença (C/Fungicida) e na ausência (S/Fungicida) do fungicida Comet a 0,1% em meio semi-sólido. Valores médios de duas amostras compostas.

A contagem de bactérias foi realizada a cada fase da produção das MPB. Colmos diretos do campo (Zero), apresentaram uma população bacteriana nativa entre 3 e 4 log de células g de massa fresca⁻¹ (**Figura 2**). Com o tratamento fungico a população de *A. amazonense* (meio LGI) e *G. diazotrophicus* (meio LGI-P) apresentaram redução sendo que não houve crescimento no meio LGI-P nas diluições testadas. Com o tratamento térmico – amostra “Tr. Térmico + Tr. Fungicida” – a contagem apresentou mesma quantidade de bactérias quando comparado com a amostra anterior, exceto para *A. amazonense*, com apresentou um aumento de 1,8 para 3,17 log de

cél/g de massa fresca. Quando se comparou o tratamento referente a contagem do próprio inoculantes antes da aplicação (Contagem do Inoculante), percebe-se a eficiência do mesmo na inoculação, apresentando valores semelhantes. Isto mostra que as cinco estirpes foram inoculadas nos mesmos números populacionais.

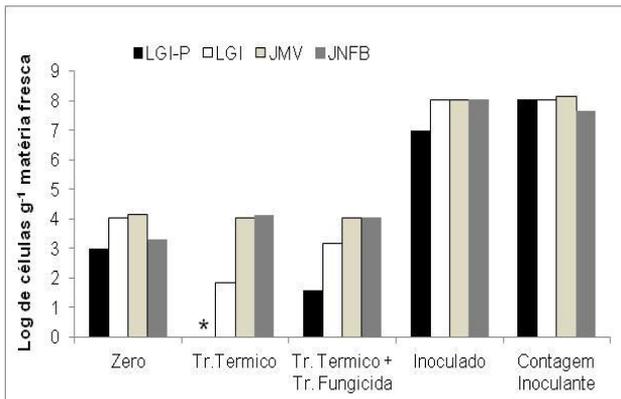


Figura 2: Contagem do número de células por g. de matéria fresca utilizando a variedade IACSP955000. Tratamentos: zero= Colmos direto do campo; Tr.Termico= Colmos após 30 minutos a 52C; Tratamento Térmico + Fungicida= Colmos tratados termicamente e após 3 minutos em imersão em solução fungicida 0,1%; Inoculado= Colmos tratados (termico e fúngico) e imerso por 30 minutos em inoculante turfoso (1:50); Contagem do Inoculante= Contagem de bactérias presentes no inoculante na diluição 1:50. * não apresentou formação de película.

A inoculação promoveu incremento de 23,83% de MSPA e 33,07 % de MSR aproximadamente na variedade IACSP955000. Já na RB867515, 23,07% de MSPA e 26,32% de MSR, de acordo com a **Tabela 1**. Não houve diferença entre os tratamentos nos parâmetros de altura, diâmetro e comprimento da folha +1.

A promoção de crescimento de cana-de-açúcar por essas bactérias pode estar relacionada a FBN, assim como pela produção de reguladores de crescimento vegetal, levando ao maior desenvolvimento do sistema radicular aumentando a absorção de água e nutrientes e com isso maior desenvolvimento de parte aérea e acúmulo de biomassa (Cassan et al., 2014).

Quando avaliado a **Tabela 2** com a **Tabela 1**, observa-se que a inoculação possui no incremento como já constatado, mas respaldada pela maior presença bacteriana na amostra inoculada.

CONCLUSÕES

A aplicação do fungicida não afeta a população bacteriana do inoculante. Amostra recém-inoculada

apresentam o dobro do número de bactérias quando comparadas ao controle. Tratamento térmico e fungico não reduzem a população bacteriana nativa dos colmos. A inoculação aumentou a massa seca de parte aérea e raízes das duas variedades testadas.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (proj. no. 470824/2013-1) e à Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ, pelas bolsas concedidas e à Embrapa Agrobiologia projeto número 03.14.086.00.00.

REFERÊNCIAS

- BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; VIDEIRA, S.S.; BODDEY, L.H. & BALDANI, V.L.D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil*, 384:413-431, 2014.
- CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J. & SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-bacteria-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *J. Plant Growth Regulat.*, 33:440459, 2014.
- LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A.; DINARDO-MIRANDA, L. L.; SCARPARI, M. S.; GARCIA, J. C.; BIDÓIA, M. A. P.; SILVA, D. N.; MENDONÇA, J. R.; KANTHACK, R. A. D.; CAMPOS, M. F.; BRANCALÍÃO, S. R.; PETRI, R. H. & MIGUEL, P. E. M. Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas. *Documentos IAC*, 109, 16p, 2012.
- OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DOBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant Soil*, 242:205-215, 2002.
- SANGUINO, A.; MORAES, V.A.; CASAGRANDE, M.V. Curso de formação e condução de viveiros de mudas de cana-de-açúcar. 43 p. 2006.
- SCHULTZ, N.; MORAIS, R. F.; SILVA, J. A.; BAPTISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P.; LEITE, J. M.; PEREIRA, W. CARNEIRO JÚNIOR, J. B.; ALVES, B. J. R.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S & REIS, V. M. Avaliação agrônômica de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. *Pesq. Agropec. Bras.*, 47:261-268, 2012.



Tabela 1. Promoção de crescimento de mudas de cana-de-açúcar por bactérias diazotróficas (inoculante múltiplo) aos 45 dias após inoculação e 30 dias após a transplante para os tubetes. Valores médios de seis repetições

| Variedades | Tratamento | MSPA | MSR | Altura | D | CF+1 | LF+1 | NFIs |
|-------------|------------|----------|----------|--------|--------|---------|--------|-------|
| IACSP955000 | Controle | 1.1963 B | 0.2542 B | 6.42 A | 7.08 A | 29.34 A | 1.18 A | 5.4 A |
| | Inoculado | 1.5706 A | 0.3798 A | 7.00 A | 7.69 A | 32.60 A | 1.30 A | 4.8 A |
| RB867515 | Controle | 1.1063 B | 0.4461 B | 9.00 A | 6.11 A | 33.10 A | 0.90 B | 4.6 A |
| | Inoculado | 1.4381 A | 0.6055 A | 9.20 A | 6.77 A | 38.10 A | 1.06 A | 5.2 A |
| CV % | | 17.06 | 17.45 | 14.43 | 8.77 | 12.70 | 10.56 | 10.00 |

MSPA- massa seca da parte aérea; MSR- massa seca da raiz; D-diâmetro; CF+1-comprimento da folha +1; LF+1- largura da folha +1; NFIs- número de folhas. Média de 5 repetições.* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Número mais provável de células bacterianas (NMP) em massa fresca (MF) de raízes e parte aérea de duas variedades de cana-de-açúcar após aos 45 dias após inoculação e 30 dias de cultivo em tubetes contendo substrato comercial Multiplant®.

| Meio Cultivo | Raiz | | | | Parte aérea | | | |
|--------------|---|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|
| | RB867515 | | IACSP955000 | | RB867515 | | IACSP955000 | |
| | Controle | Inoculado | Controle | Inoculado | Controle | Inoculado | Controle | Inoculado |
| | -----Log ₍₁₀₎ do n ^o de células grama de massa fresca ⁻¹ ----- | | | | | | | |
| LGI-P | 4.60 | 5.17 | 4.95 | 6.65 | 4.95 | 5.65 | 4.60 | 5.65 |
| LGI | 4.95 | 5.65 | 4.60 | 7.04 | 5.97 | 6.39 | 5.47 | 6.30 |
| JNFB | 4.95 | 6.00 | 5.87 | 7.04 | 5.39 | 5.65 | 5.65 | 6.65 |
| JMV | 4.60 | 4.84 | 4.95 | 6.17 | 5.39 | 6.17 | 5.04 | 6.65 |

Valores médios de duas repetições compostas.