

## Resposta da variedade de cana-de-açúcar RB867515 a doses de nitrogênio associadas à inoculação de bactérias diazotróficas<sup>(1)</sup>.

**Valfredo Almeida Chaves<sup>(2)</sup>; Helder Xavier Magalhães Júnior<sup>(3)</sup>; Jailson Silva Sousa<sup>(4)</sup>; Rafael Cassador Monteiro<sup>(3)</sup>; Danilo de Oliveira Machado<sup>(3)</sup>; Veronica Massena Reis<sup>(5)</sup>**

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos da CAPES e Embrapa Agrobiologia; <sup>(2)</sup> Mestrando em Agronomia – Ciência do Solo; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/Embrapa Agrobiologia; Seropédica, RJ; valfredo\_agronomia@hotmail.com; <sup>(3)</sup> Graduando em Agronomia/bolsista de iniciação científica; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/Embrapa Agrobiologia; <sup>(4)</sup> Graduando em Agronomia/bolsista de iniciação científica; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/Faperj; <sup>(5)</sup> Pesquisadora; Embrapa Agrobiologia.

**RESUMO:** A descoberta de novas tecnologias viáveis do ponto de vista econômico e ambiental é um fator de relevante no cenário agrícola atual. Este trabalho teve como objetivo o estudo da interação da inoculação de bactérias promotoras de crescimento associada à adubação nitrogenada na variedade de cana-de-açúcar RB867515. Utilizaram-se mini-toletes do terço superior de colmos da variedade RB867515, inoculando-se os mesmos com bactérias diazotróficas, obtendo os tratamentos: inoculado e testemunha. Posteriormente os mini-toletes foram plantados em vasos contendo 12 kg de solo associados a cinco níveis de adubação nitrogenada (0; 25; 50; 75 e 100 kg de N ha<sup>-1</sup>), totalizando 10 tratamentos. O experimento foi implantado ao ar livre na Embrapa Agrobiologia no dia 06/09/12 e teve duração de 78 dias. Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente ao acaso em esquema fatorial (2x5) com sete repetições. As plantas inoculadas obtiveram resposta linear crescente a adubação na avaliação de massa seca de raiz, parte aérea e total, não sendo observados resultados semelhantes para a testemunha. Observou-se diferenças significativas entre os tratamentos nas doses de 0, 25 e 100 kg de N ha<sup>-1</sup>. Concluiu-se que neste experimento a inoculação potencializou a resposta da variedade RB867515 a adubação nitrogenada.

**Termos de indexação:** inoculante, promoção de crescimento, adubação nitrogenada.

### INTRODUÇÃO

Atualmente é cada vez maior a busca por novas fontes de energia visando à autossuficiência energética em países cuja economia é dependente da utilização de combustíveis fósseis.

No Brasil, o etanol obtido da cana-de-açúcar tem se mostrado como uma das alternativas mais viáveis para utilização de uma energia limpa e renovável. Estima-se que a área de cultivo da cana-de-açúcar colhida na safra de 2012/2013 no Brasil será de 8,6 milhões de hectares (CONAB, 2012). Diante desse panorama, torna-se necessário a

adoção de tecnologias que contribuam para a sustentabilidade do sistema de produção de cana-de-açúcar.

Dentro desse contexto, a utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal apresenta-se como uma alternativa promissora, uma vez que estas por meio do processo de fixação biológica de nitrogênio podem suprir em parte a demanda deste nutriente, ou mesmo potencializar a sua absorção devido ao efeito de promoção de crescimento que pode ocorrer na raiz e parte aérea, reduzindo assim a necessidade de adubação nitrogenada, promovendo ganho econômico e ambiental.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo o estudo da interação da inoculação de bactérias promotoras de crescimento associada à adubação nitrogenada na variedade de cana-de-açúcar RB867515.

### MATERIAL E MÉTODOS

As mudas da variedade RB867515 foram retiradas do terço superior de colmos de plantas com 12 meses de idade que apresentavam bom aspecto fitossanitário e nutricional. As mudas foram fracionadas em mini-toletes de mesmo tamanho contendo uma gema viável. A inoculação foi realizada com inoculante polimérico (carboximetilcelulose e amido na proporção 60% e 40%) composto pelas seguintes bactérias diazotróficas: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR11281); *Azospirillum amazonense* (BR11145); *Herbaspirillum seropedicae* (BR11335); *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR11504) e *Burkholderia tropica* (BR11366), ambas selecionadas por OLIVEIRA et al. (2002, 2006). Efetuou-se a imersão dos mini-toletes durante 30 min. na solução inoculante diluída em água na proporção 1:100 (v/v). Os tratamentos obtidos foram: testemunha e inoculação dos mini-toletes por imersão. Após a inoculação, as mudas foram plantadas em vasos contendo 12 kg de amostras de terra oriundas de um Planossolo Háplico localizado na área experimental da Embrapa-Agrobiologia, no km 7 da BR 465, município de Seropédica-RJ. De acordo com a

análise química do solo realizou-se as seguintes correções: 42,91 mg de  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  de solo na forma de superfosfato simples; 18,33 mg de  $K_2O$   $kg^{-1}$  de solo na forma de cloreto de potássio e 505 mg de calcário dolomítico (PRNT = 91%)  $kg^{-1}$  de solo.

Os tratamentos foram associados a cinco níveis de adubação nitrogenada (0; 25; 50; 75 e 100  $kg$  de  $N$   $ha^{-1}$ ), totalizando 10 tratamentos. O experimento foi implantado ao ar livre na sede da Embrapa Agrobiologia no mês de setembro de 2012 e teve duração de 78 dias. Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente ao acaso em esquema fatorial ( $2 \times 5$ ) com sete repetições.

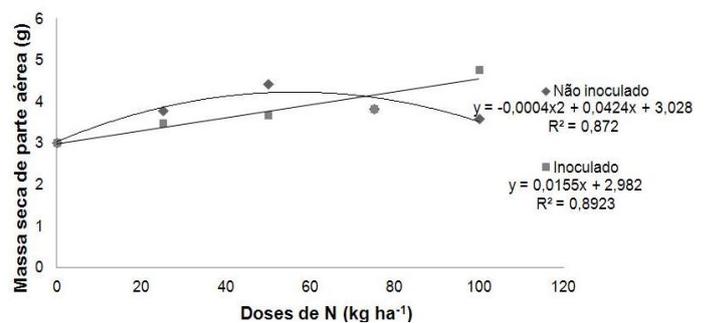
A colheita do experimento foi realizada no mês de novembro de 2012. Para estimativa da população de bactérias diazotróficas através do método do número mais provável (NMP), utilizaram-se duas repetições dos seguintes tratamentos: testemunha + 0  $kg$  de  $N$   $ha^{-1}$  e inoculação por imersão + 0  $kg$  de  $N$   $ha^{-1}$ . A contagem NMP foi realizada utilizando-se meios de cultivo semi-sólido sem adição de  $N$  para detecção das bactérias entre as diluições  $10^{-4}$  e  $10^{-7}$ , conforme metodologia descrita por DÖBEREINER et al. (1995). As demais repetições foram armazenadas em estufa de circulação de ar forçado por 10 dias a 65 °C até atingirem peso constante. Após a secagem determinou-se a massa seca de raiz, parte aérea e total.

Verificou-se a normalidade dos dados pelo teste de Lilliefors e homogeneidade de variâncias dos erros pelo teste de Cochran. O desdobramento do fator métodos de inoculação dentro do fator doses de nitrogênio foi analisado recorrendo-se ao teste Scott Knott, com  $p \geq 0,05$  para comparação das médias. Para análise do desdobramento do fator doses de nitrogênio dentro do fator métodos de inoculação utilizou-se regressão linear com  $p \geq 0,05$ . As análises foram realizadas nos programas estatísticos SAEG® (UFV) e SISVAR® (UFLA).

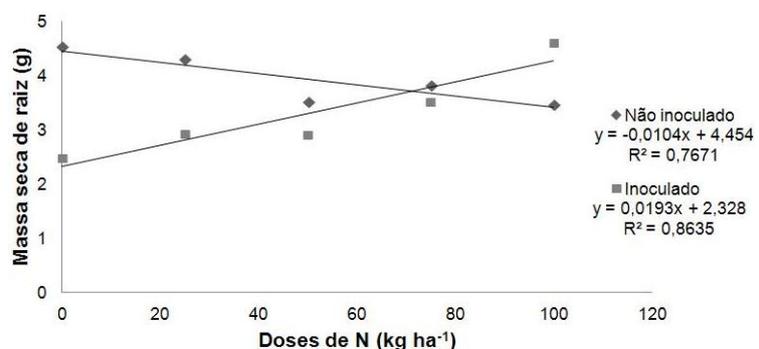
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes ao desdobramento do fator inoculação dentro do fator doses de nitrogênio para produção de biomassa das plantas são apresentados na **tabela 1**. Observa-se que os tratamentos com inoculação apresentaram valores de produção de biomassa inferiores aos tratamentos sem inoculação nas doses de 0, 25 e 50  $kg$   $N$   $ha^{-1}$ , sendo essa diferença significativa ao se avaliar a produção de massa seca de raiz e planta inteira nas doses de 0 e 25  $kg$   $N$   $ha^{-1}$ . Como a inoculação é feita com as bactérias que produzem elevadas quantidades de reguladores de crescimento, o excesso destas substâncias pode inibir o

crescimento inicial quando aplicadas em doses elevadas (SPAEPEN et al. 2007). Outra possibilidade refere-se ao consumo de parte das reservas nos mini-toletes inoculados pelas bactérias conforme já observado por Marques Jr. et al. (2008). Segundo estes autores, a elevada densidade populacional das bactérias endofíticas inoculadas, além dos microrganismos nativos, leva a uma competição por carboidratos e outras biomacromoléculas, consumindo a reserva dos mini-toletes e promovendo decréscimo no acúmulo de matéria seca, o que poderia explicar, ao menos em parte, estes resultados. Contudo, embora as plantas inoculadas tenham apresentado menor desenvolvimento inicial, as mesmas apresentaram progressivo incremento de biomassa de raiz, parte aérea e biomassa total, em resposta a doses crescentes de  $N$ , sendo estatisticamente superiores as plantas não inoculadas em todos os parâmetros quando a comparação foi realizada dentro da dose de 100  $kg$   $N$   $ha^{-1}$ . As **figuras 1** e **2** demonstram que o acúmulo de biomassa de parte aérea e raiz obedeceram a um modelo linear crescente em resposta a adubação nitrogenada.



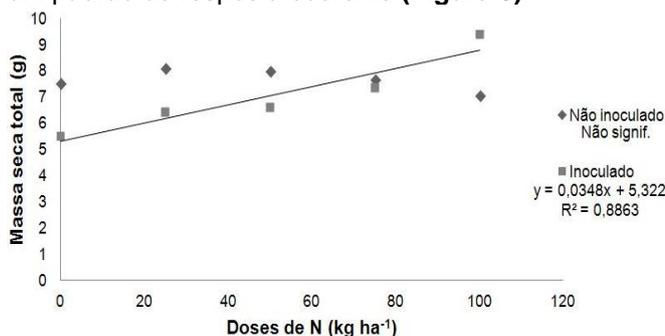
**Figura 1** - Acúmulo de massa seca de parte aérea em função da adubação nitrogenada em plantas da variedade RB867515 inoculadas e não inoculadas.



**Figura 2** - Acúmulo de massa seca de raiz em função da adubação nitrogenada em plantas da variedade RB867515 inoculadas e não inoculadas.

Respostas diferentes a adubação foram observados nas plantas que não receberam inoculação. Na **figura 1** percebe-se que a resposta das plantas não inoculadas a adubação nitrogenada obedeceu a um modelo quadrático, onde as mesmas apresentaram um máximo de resposta na dose de 50 kg N ha<sup>-1</sup>, passando a apresentar valores inferiores em relação às plantas inoculadas a partir da dose de 75 kg N ha<sup>-1</sup>. Já na **figura 2** observa-se que a adição de nitrogênio reduziu gradualmente a produção de biomassa radicular das plantas que não receberam inoculação.

Sendo assim, é provável que as diferentes respostas observadas entre plantas inoculadas e não inoculadas à adubação nitrogenada se deva a atuação desses microrganismos, uma vez que o dreno inicial de reservas dos toletes das plantas inoculadas posteriormente pode ter facilitado à resposta dessas plantas a adubação. Além disso, BASHAN et al. (2004) afirmam que a associação de bactérias promotoras de crescimento vegetal com plantas pode resultar em alongamento e desenvolvimento de raízes laterais e pelos radiculares, além de estimular a síntese de auxina. Tais efeitos podem ter contribuído para potencializar as respostas à adubação. De acordo com Bashan & Holguim (1997), o efeito de promoção de crescimento também está relacionada ao nível populacional da espécie microbiana associada, que pode condicionar uma maior disponibilidade de fitormônios para as plantas. Sendo assim, o fato de as plantas inoculadas apresentarem uma maior população de bactérias diazotróficas ao final do experimento (**Tabela 2**), é mais um indício de que mecanismos de promoção de crescimento poderiam estar atuando com maior intensidade nessas plantas, razão pela qual a produção de biomassa total dessas plantas obedeceu a um modelo linear crescente, enquanto que as plantas não inoculadas submetidas à mesma adubação não apresentaram um padrão de resposta coerente (**Figura 3**).



**Figura 3** - Acúmulo de massa total em função da adubação nitrogenada em plantas da variedade RB867515 inoculadas e não inoculadas.

## CONCLUSÃO

A inoculação restringiu inicialmente o desenvolvimento das plantas, porém condicionou uma resposta linear a adubação nitrogenada obtendo ganhos superiores à testemunha.

## AGRADECIMENTOS

A UFRRJ pela formação profissional e a Embrapa Agrobiologia, CAPES, CNPq e Faperj pela estrutura e recursos financeiros.

## REFERÊNCIAS

- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; BASHAN, L.E. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). Canadian Journal of Microbiology, v.50, p.521-577, 2004.
- BASHAN, Y. & HOLGUIM, G. *Azospirillum*-planta relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento – Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar - 1º Levantamento da safra 2012/2013 (abril de 2012). Publicação trimestral em: [www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)
- DOBEREINER, J.;BALDANI,V.L.D.;BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas, p 28,-p19 ,1995.
- MARQUES jr, R. B.; CANELLAS, L. P.; SILVA, L. G.; OLIVARES, F. L. Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa-MG, v. 32, p. 1121-1128, 2008.
- OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DOBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub> – fixing bacteia on micropropagated sugarcane plants. Plant and soil 242: 205-215, 2002.
- OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. Plant and Soil, The Hague, NL, v. 284, n1-2, p. 23-32, jun. 2006.
- SPAEPEN S, VANDERLEYDEN J, REMANS R. 2007a. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant sig-naling. FEMS Microbiol Rev 31: 425–448

Tabela 1. Acúmulo de massa seca de parte aérea, raiz e total de plantas da variedade de cana-de-açúcar RB867515 cultivadas ao longo de 78 dias em vasos contendo 12 kg de amostras de terra oriundas de um Planossolo háplico e submetidas a diferentes doses de nitrogênio e inoculadas ou não com bactérias diazotróficas.

Massa seca de parte aérea (g)						
Inoculação	Doses de N (kg ha <sup>-1</sup> )					Média Geral
	0	25	50	75	100	
Testemunha	3,02 a	3,79 a	4,45 a	3,84 a	3,60 b	3,74 a
Inoc. por imersão no plantio	3,01 a	3,49 a	3,68 a	3,83 a	4,78 a	3,76 a
Massa seca de raiz (g)						
Inoculação	Doses de N (kg ha <sup>-1</sup> )					Média Geral
	0	25	50	75	100	
Testemunha	4,53 a	4,31 a	3,53 a	3,82 a	3,47 b	3,93 a
Inoc. por Imersão no plantio	2,49 b	2,93 b	2,92 a	3,52 a	4,61 a	3,29 b
Massa seca total (g)						
Inoculação	Doses de N (kg ha <sup>-1</sup> )					Média Geral
	0	25	50	75	100	
Testemunha	7,55 a	8,11 a	7,99 a	7,67 a	7,07 b	7,68 a
Inoc. por Imersão no plantio	5,51 b	6,43 b	6,61 a	7,36 a	9,39 a	7,06 a

\*As observações referem-se ao desdobramento do fator método de inoculação dentro do fator doses de nitrogênio utilizando-se 5 repetições por tratamento; Inoc. = Inoculação; N = Nitrogênio; kg = quilograma; ha = hectare; médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste Scott Knott a 5 % de probabilidade.

Tabela 2. Resultado da contagem NMP para os gêneros de bactérias diazotróficas *Burkholderia spp*, *Herbaspirillum spp*, *Azospirillum spp* e *Gluconacetobacter spp* referente às amostras de raiz e parte aérea da variedade de cana-de-açúcar RB867515 inoculada ou não com bactérias diazotróficas e cultivada ao longo de 78 dias em vasos contendo 12 kg de amostras de terra oriundas de um Planossolo Háptico.

Tratamentos	<i>Burkholderia spp.</i>		<i>Herbaspirillum spp.</i>	
	R.	P.A	R.	P.A
Testemunha (0 kg de N)	0,0	0,0	0,0	0,0
Inoc. Imersão no plantio (0 kg de N)	3,0x10 <sup>5</sup>	0,0	2,0x10 <sup>5</sup>	7,0x10 <sup>4</sup>
Tratamentos	<i>Azospirillum spp.</i>		<i>Gluconacetobacter spp.</i>	
	R.	P.A	R.	P.A
Testemunha (0 kg de N)	0,0	0,0	0,0	0,0
Inoc. Imersão no plantio (0 kg de N)	2,0x10 <sup>5</sup>	0,0	3,5x10 <sup>6</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>

Para realização da contagem de células utilizou-se duas repetições de cada tratamento para detecção das bactérias entre as diluições 10<sup>-4</sup> 10<sup>-7</sup>; População expressa em n° de células viáveis/ grama de massa fresca. Inoc.=Inoculado; R = Raiz; P.A = Parte aérea; N = nitrogênio; kg =quilograma.