



## Promoção de crescimento de trevo branco e milho em sucessão pela inoculação de bactérias diazotróficas<sup>(1)</sup>

**Leandro Hahn<sup>(2)</sup>; Enilson Luiz Saccol de Sá<sup>(3)</sup>; Rafael Goulart Machado<sup>(4)</sup>; William Rosa da Silva<sup>(5)</sup>; Suelen Oldra<sup>(5)</sup>.**

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

<sup>(2)</sup> Pesquisador Epagri, Estação Experimental de Caçador, Professor Universidade Alto Vale do Rio do Peixe (UNIARP), Caçador, SC, E-mail: [leandrohahn@epagri.sc.gov.br](mailto:leandrohahn@epagri.sc.gov.br); <sup>(3)</sup> Professor Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, bolsista CNPq, E-mail: [enilson.sa@gmail.com](mailto:enilson.sa@gmail.com); <sup>(4)</sup> Engenheiro Agrônomo Emater-RS, E-mail: [rgoulartmachado@gmail.com](mailto:rgoulartmachado@gmail.com); <sup>(5)</sup> Estudantes de Agronomia UFRGS, E-mail: [00170479@ufrgs.br](mailto:00170479@ufrgs.br) e [sukaoldra@gmail.com](mailto:sukaoldra@gmail.com).

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi avaliar a promoção de crescimento em plantas de trevo branco e milho pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal. O experimento foi conduzido a campo por dois anos. No inverno foi cultivado trevo branco e na sucessão, no verão, foi cultivado milho. Os tratamentos consistiram da combinação de duas doses de N e três tratamentos com inoculação de bactérias diazotróficas. Observou-se que a inoculação da estirpe SEMIA 222 e do isolado UFRGS Vp16 aumentou a nodulação, a produção de biomassa seca da parte aérea (MSPA) e o teor de N na MSPA de plantas de trevo branco. O uso de 200 kg.ha<sup>-1</sup> de N inibiu a nodulação em plantas de trevo branco. A inoculação do isolado UFRGS Vp16 e dos isolados de *Azospirillum* UFRGS EL-S UFRGS LG1-R e UFRGS M-S aumentou a produção de MSPA de plantas de milho.

**Termos de indexação:** *Trifolium repens*, *Azospirillum*, *Burkholderia*.

### INTRODUÇÃO

O trevo branco (*Trifolium repens*) é uma leguminosa forrageira perene que possui grande importância na composição de pastagens pela sua alta qualidade nutricional, aceitação pelos bovinos e alta capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) em simbiose com rizóbios (Carlsson & Huss-Danell, 2003). Sobre a capacidade de FBN do trevo branco, os valores têm variado de 54 a 291 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (Peoples et al., 1995).

A aplicação de N em pastagens de trevo branco, além de constituir um alto custo relativo, pode diminuir a FBN por atrasar a nodulação (Crush, 1987), reduzir o número e o tamanho de nódulos (Cowling, 1961), reduzir a atividade da enzima nitrogenase (Eltlib & Ledgard, 1988). A avaliação em experimentos de campo de rizóbios eficientes na FBN é de grande importância para otimizar sistemas

pastoris com esta leguminosa. O milho, cultivado em sucessão, pode ser beneficiado pelo trevo branco, principalmente pelo aumento do material orgânico rico em N adicionado ao solo (Diekow et al., 2005).

Para o milho, é bem documentada a sua capacidade de estabelecer relações rizosféricas e/ou endofíticas com promoção do crescimento das plantas com vários gêneros bacterianos (Caballero-Mellado et al. 2004). Ultimamente, tem havido grande interesse em estudar e utilizar rizóbios isolados de nódulos de leguminosas como promotores de crescimento em inúmeras gramíneas. Resultados positivos com o uso desta técnica já foram obtidos em arroz (Bhattacharjee et al. 2012), assim como em plantas de milho (Gutierrez-Zamora e Romero, 2001; Bécquer et al. 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a promoção de crescimento em plantas de trevo branco e milho pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal.

### MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido a campo, em área da Estação Experimental Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, localizada no município de Eldorado do Sul. O experimento foi implantado em 2010 e conduzido por dois anos. No inverno foi cultivado trevo branco, cultivar Zapicán Estanzuela e na sucessão, no verão, foi cultivado milho.

Os tratamentos consistiram da combinação de duas doses de N e três tratamentos com inoculação de bactérias diazotróficas. No cultivo de trevo branco, somente nas parcelas que receberam o tratamento controle sem inoculação foram aplicados 200 kg ha<sup>-1</sup> de N, sendo 80 kg ha<sup>-1</sup> na semeadura e 120 kg ha<sup>-1</sup> em cobertura 60 dias após a semeadura.

Na cultura do milho (híbrido Pioneer 30F53) foram aplicadas duas doses de N: 140 kg ha<sup>-1</sup>, o que corresponde à dose completa de N para o milho, definida pela análise do solo de acordo com



Comissão... (2004), e metade da dose ( $70 \text{ kg ha}^{-1}$  de N).

Os isolados inoculados nas plantas foram: UFRGS Vp16 (*Burkholderia* sp.), pertencente à Coleção de Culturas de Rizóbios da UFRGS, isolado de nódulo de trevo branco e selecionado pela sua alta eficiência na FBN (Alves et al., 2012), SEMIA 222 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*), estirpe recomendada para produção de inoculantes de *Trifolium repens*, obtida da coleção de estirpes SEMIA da FEPAGRO-RS. Também foi inoculada a mistura de três isolados de *Azospirillum brasilense*, UFRGS EI-S UFRGS Lg1-R e UFRGS M-S, pertencente à Coleção de Culturas de Rizóbios da UFRGS e que foram selecionados por sua alta eficiência na FBN em milho cultivado no Rio Grande do Sul e produção de ácido-indol-acético (AIA) *in vitro* (Röesch et al. 2007). As inoculações com as bactérias diazotróficas ocorreram nas mesmas parcelas para o trevo branco e para o milho.

Para a produção do inóculo, os isolados UFRGS Vp16 e SEMIA 222 foram crescidos em meio LM líquido e os isolados de *Azospirillum* inoculados em meio Dygs líquido. Os caldos das bactérias foram misturados em água esterilizada e aplicados manualmente com regador sobre a área total da parcela logo após a semeadura. Para os tratamentos com os isolados UFRGS Vp16 e SEMIA 222 foram aplicados  $3,3 \times 10^8$  células  $\text{m}^{-2}$  de parcela e nos tratamentos com *Azospirillum* foram aplicados  $9 \times 10^8$  células  $\text{m}^{-2}$  de parcela. A contagem da concentração de células foi realizada em câmara de Neubauer.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com quatro repetições, tendo as parcelas dimensões de 4,0 m de comprimento por 3,0 m de largura.

No trevo branco, avaliou-se a produção de biomassa seca da parte aérea (BSPA) e o teor de N da BSPA das plantas em amostras coletadas em área de  $0,25 \text{ m}^2$  ( $0,50 \times 0,50 \text{ m}$ ) pelo corte manual e aleatório de plantas a cinco cm do solo quando estas atingiam 10 cm de altura, sendo coletadas duas subamostras por parcela. Avaliou-se também o número de nódulos radiculares de 10 plantas por parcela.

No milho foram avaliados os teores relativos de clorofila na folha pela leitura dos valores de Índice de clorofila Falker (ICF) no estádio V<sub>6-7</sub>. No estádio R<sub>6</sub> foram cortadas dez plantas e, após secagem, foram pesadas e trituradas para determinação da MSPA. O rendimento de grãos foi obtido com a colheita manual das espigas das plantas dentro das três linhas centrais da parcela. A partir dos grãos colhidos, determinou-se o teor de N dos grãos de acordo com Tedesco et al. (1995).

Os resultados foram submetidos à análise da variância pelo programa estatístico ASSYSTAT (Silva et al. 2009) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inoculação da estirpe recomendada para trevo branco SEMIA 222 proporcionou aumento da MSPA, N total na MSPA e do número de nódulos nas plantas de trevo branco (**Tabela 1**) em relação ao tratamento controle sem inoculação e sem aplicação de N e ao tratamento inoculado com *Azospirillum* nos dois anos. Além disso, observou-se que no ano de 2011, houve maior produção de MSPA e N total na MSPA nas plantas do tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 222 em comparação ao tratamento controle com aplicação de  $200 \text{ kg ha}^{-1}$  de N, demonstrando a sua alta eficiência na FBN.

A inoculação do isolado UFRGS Vp16 apresentou o mesmo desempenho na promoção de crescimento do trevo branco que a utilização de  $200 \text{ kg ha}^{-1}$  e da estirpe SEMIA 222, com exceção de uma menor produção de MSPA em 2011. Estes resultados comprovam a eficiência deste isolado na promoção de crescimento do trevo branco. UFRGS Vp16 foi isolado por Alves et al., (2012) e nos experimentos em casa de vegetação, em solo com umidade próximo da capacidade de campo ou sob um período de 30 dias de alagamento, demonstrou eficiência semelhante à estirpe SEMIA 222 na produção de MSPA e N total da MSPA em trevo branco.

A nodulação das plantas de trevo branco aumentou com a inoculação dos isolados SEMIA 222 e UFRGS Vp16. Houve formação de nódulos nas plantas dos tratamentos controle sem inoculação, demonstrando a presença de rizóbios no solo local compatíveis com trevo branco. Porém, estes apresentaram menor eficiência simbiótica demonstrado pela menor produção de MSPA e N total na MSPA do tratamento controle sem inoculação e sem N. A utilização de  $200 \text{ kg ha}^{-1}$  de N diminuiu o número de nódulos radiculares. Altas concentrações de N podem reduzir a nodulação (Eltlib & Ledgard, 1988).

Na safra 2011/2012, a inoculação dos três isolados de *Azospirillum* e do isolado UFRGS Vp16 aumentou a produção de MSPA com o uso de  $140 \text{ kg ha}^{-1}$  de N na cultura do milho (**Tabela 2**). Para as demais variáveis não houve efeito das inoculações.

A inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* para promoção de crescimento de milho apresenta resultados positivos em vários trabalhos (Jacoud et al. 1999; Hungria et al. 2010; Joe et al. 2012). As três culturas de *Azospirillum* usadas neste trabalho



foram isoladas por Roesch et al. (2007) de plantas de milho coletadas no estado do Rio Grande do Sul. Estes isolados destacaram-se entre 30 pela produção de ácido indol acético (AIA), um fitoregulador do grupo das auxinas, e pela capacidade de fixação de N. No presente trabalho, a promoção de crescimento das plantas de milho provavelmente se deve a diferentes mecanismos de promoção de crescimento, como a produção de fitoreguladores (Dobbelaere et al. 2003), ao aumento na absorção de nutrientes (Hungria et al. 2010), fixação de N (Montañez et al. 2009) ou por aumentar a disponibilidade de fósforo (Sessitsch et al. 2002).

Para a cultura do milho, há poucos trabalhos com inoculação de bactérias do gênero *Burkholderia*, ao qual pertence o isolado UFRGS Vp16 (Riggs et al. 2001; Miyauchi et al. 2008). UFRGS Vp16 foi isolado de nódulo de trevo branco e selecionado pela sua alta eficiência de fixação de N (Alves et al. 2012).

## CONCLUSÕES

A inoculação da estirpe SEMIA 222 e do isolado UFRGS Vp16 aumenta a nodulação, a produção de biomassa seca da parte aérea (MSPA) e o teor de N na MSPA de plantas de trevo branco.

O uso de 200 kg.ha<sup>-1</sup> de N inibe a nodulação em plantas de trevo branco

A inoculação do isolado UFRGS Vp16 e dos isolados de *Azospirillum* UFRGS EL-S UFRGS LG1-R e UFRGS M-S aumenta a produção de MSPA de plantas de milho.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo do primeiro autor.

## REFERÊNCIAS

ALVES, J.B. et al. Selection of rhizobia for *Trifolium repens* in flooded soil conditions. *Biotemas*, 25:39-45, 2012.

BHATTACHARJEE, R. B. et al. Indole acetic acid and ACC deaminase-producing *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* SN10 promote rice growth, and in the process undergo colonization and chemotaxis. *Biology and Fertility of Soils*, 48:173-182, 2012.

BÉCQUER, C.J. et al. Selection of rhizobium strains, inoculated in maize (*Zea mays*, L.), in field conditions in cattle ecosystems of Sancti Spiritus, Cuba. *Cuban J Agr Sci.*, 45:4, 2011.

CBALLERO-MELLADO, J. et al. *Burkholderia unamae* sp. nov. and N<sub>2</sub> fixing rizospheric and endophytic species. *Int. J. Syst. Evol.*, 54:1165-1172, 2004.

CARLSSON, G. & HUSS-DANEL, K. Nitrogen fixation in perennial forage legumes in the field. *Plant and Soil*, 253:353-372, 2003.

Comissão de química e fertilidade do solo - RS/SC - CQFSRS/SC. Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Porto Alegre: SBCS - Núcleo Regional Sul; 2004.

COWLING, D. W. The effect of nitrogenous fertiliser on established white clover sward. *Journal of the British Grassland Society*, 16:65-68, 1961.

CRUSH, J. R. Nitrogen fixation. In: BAKER, M. J.; WILLIAMS, V. M. (Ed.). *White clover*. Wallingford: CAB International, 1987. p. 185-201.

DOBBELAERE, S. et al. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit Rev Plant Sci.*, 22:107-149, 2003.

DIEKOW, J. et al. Soil C and N stocks as affected by cropping systems and nitrogen fertilization in a southern Brazil Acrisol managed under no tillage for 17 years. *Soil and Tillage Research*, 81:87-95, 2005.

ELTILIB, A. M. & LEDGARD, S. F. Production and N fixation by Grassland Kopu and Grassland Huia white clovers under different N regimes. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Wellington, v. 31, p. 325-330, 1988.

GUTIERREZ-ZAMORA, M.L & ROMERO, E.M. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *J Biotechnol.*, 91:117-126, 2001.

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

JACOUD, C. et al. Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. *Can J Microbiol.*, 45:339-342, 1999.

JOE, M. M. et al. Survival of *Azospirillum brasilense* flocculated cells in alginate and its inoculation effect on growth and yield of maize under water deficit conditions. *European Journal of Soil Biology*, 50:198-206, 2012.

MONTAÑEZ, A. et al. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by 15N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. *Biol Fert Soils*, 45:253-263, 2009.

MIYAUCHI, M.Y.H. et al. Interactions between diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungus in maize genotypes. *Sci Agr.*, 65:525-531, 2008.

PEOPLES, M.B et al. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant and Soil*, 174:3-28, 1995.

RIGGS, P.J. et al. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Aust J Plant Physiol.*, 28:829-836, 2001.

RÖESCH, L.F.W. et al. Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. *World J Microb Biot.*, 23:1377-1383, 2007.

SESSITSCH, A. et al. Advances in *Rhizobium* research. *Crc Rev Plant Sci.*, v.21, p.323-378, 2002.

TEDESCO, M.J. et al. Analysis of soil, plants and other materials. 2. ed. Departamento de Solos da UFRGS, Porto Alegre, Brazil, 1995.

**Tabela 1-** Biomassa Seca da Parte Aérea (BSPA), Nitrogênio total na BSPA e número de nódulos de trevo branco inoculado com bactérias diazotróficas em dois anos de cultivo.

Variáveis	Ano 2010					CV (%)
	Controle - N	Controle+200 kg ha <sup>-1</sup> N	<i>Azospirillum</i>	SEMIA 222	UFRGS Vp16	
BSPA (kg ha <sup>-1</sup> )	1855,2 b	2046,7 ab	1908,1 b	2227,8 a	2100,0 ab	12,8
N total BSPA (kg ha <sup>-1</sup> )	59,4 b	69,5 ab	61,1 b	80,2 a	73,6 a	15,2
Número de Nódulos*	27,25 b	22,0 c	29,6 b	46,6 a	38,8 a	42,0
	Ano 2011					CV (%)
	Controle- N	Controle+200 kg ha <sup>-1</sup> N	<i>Azospirillum</i>	SEMIA 222	UFRGS Vp16	
BSPA total (kg ha <sup>-1</sup> )	2993,4 d	3671,5 bc	3244,7 cd	4509,7 a	3765,6 bc	15,2
N total BSPA (kg ha <sup>-1</sup> )	95,8 b	121,9 b	103,8 b	157,8 a	128,0 ab	13,2
Número de Nódulos*	19,9 b	25,9 b	21,3 b	34,4 a	37,4 a	51,2

Médias seguidas de letra igual não diferem entre si (Tukey, P<0,05). ns = não significativo. \* Dados transformados por  $\sqrt{(x+1)}$ . CV = coeficiente de variação.

**Tabela 2 -** Promoção de crescimento de milho inoculado com bactérias diazotróficas nas safras 2010/2011 e 2011/2012 e com 70 e 140 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio.

Safras	Nitrogênio (kg ha <sup>-1</sup> )	Controle	<i>Azospirillum</i>	SEMIA 222	UFRGS Vp16	Media	CV (%)
--- BSPA <sup>1</sup> (Mg ha <sup>-1</sup> ) ---							
2010/ 2011	70	16,9	17,9	16,9	17,9	17,4	8,4
	140	18,3	18,6	18,8	19,0	18,7	
	Media	17,6	18,3	17,9	18,5		
2011/ 2012	70	19,2 Ba	20,2 Ba	19,9 Ba	21,9 Ba	20,3	8,4
	140	22,3 Ab	24,3 Aa	22,4 Aab	24,0 Aa	23,3	
	Media	17,6	18,3	17,9	18,5		
--- Índice de clorofila Falker em V <sub>5-6</sub> ---							
2010/ 2011	70	41,6	43,9	40,2	45,1	42,7	4,6
	140	42,9	44,5	43,3	44,6	43,8	
	Media	42,3	44,2	41,8	44,9		
2011/ 2012	70	47,7	48,3	48,2	51,0	48,8 B	4,6
	140	55,1	53,2	53,2	54,2	53,9 A	
	Media	42,3	44,2	41,8	44,9		
--- Teor de nitrogênio no grão (g kg <sup>-1</sup> ) ---							
2010/ 2011	70	11,6	11,4	11,8	11,3	11,5	8,4
	140	11,0	11,4	11,0	11,8	11,3	
	Media	11,3	11,4	11,4	11,6		
2011/ 2012	70	13,1	14,1	13,1	14,3	13,7	8,4
	140	14,8	15,3	14,5	15,0	14,9	
	Media	11,3	11,4	11,4	11,6		
--- Rendimento de grãos (Mg kg <sup>-1</sup> ) ---							
2010/ 2011	70	6,2	6,3	6,3	6,1	6,2 B	12,1
	140	7,2	7,1	7,3	7,1	7,2 A	
	Media	6,7	6,7	6,8	6,6		
2011/ 2012	70	9,4	10,0	9,7	9,9	9,8 B	12,1
	140	11,3	11,1	11,2	11,5	11,3 A	
	Media	6,7	6,7	6,8	6,6		

<sup>1</sup> Biomassa Seca da Parte Aérea. Médias de tratamentos seguidas de letra igual minúscula na linha, em cada dose de nitrogênio, e maiúscula na coluna para cada safra, não diferem entre si (Tukey, P<0,05). CV = coeficiente de variação.