



Matéria seca de raízes em duas variedades de cana-de-açúcar com e sem inoculação com bactérias diazotróficas⁽¹⁾.

Doãn Martins Sperandio⁽²⁾; Rafaela Eloi de Almeida Alves⁽³⁾; Vinícius Pedroso Lima⁽⁴⁾; Márcio dos Reis Martins⁽³⁾; Nivaldo Schultz⁽⁵⁾; Segundo Urquiaga⁽⁶⁾

⁽¹⁾Trabalho executado com recursos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

⁽²⁾Mestrando do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, doanmartins@hotmail.com, bolsista CAPES; ⁽³⁾Bolsista de Pós-Doutorado, Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro, rafaelaelovalves@gmail.com, bolsista PDJ CNPq, reismartins@yahoo.com.br, bolsista PAPP - CAPES/FAPERJ ⁽⁴⁾Discente do Curso de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, pedroso.lima@yahoo.com.br, bolsista PIBIC; ⁽⁵⁾Docente do Departamento de Solos, Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, nsufrj@yahoo.com.br; ⁽⁶⁾Pesquisador, Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro, segundo.urquiaga@embrapa.br

RESUMO: Nos últimos anos as pesquisas com fixação biológica de nitrogênio (FBN) e uso de inoculante obtiveram avanços significativos, entretanto, ainda não existe um consenso sobre a quantificação da FBN e a eficiência do uso do inoculante. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência e contribuição do uso do inoculante composto com cinco estirpes de bactérias diazotróficas: (*Azospirillum amazonense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Bulkholderia tropica*) na produção de matéria seca de raízes (MSR) de cana-de-açúcar, na fase inicial de desenvolvimento. O experimento foi instalado no campo experimental da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro em um Argissolo Amarelo pobre em N. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com 4 tratamentos, 2 variedades (RB867515 e RB92579) com e sem inoculação, com 4 repetições. Foram realizadas duas avaliações com a quantificação de raízes em trincheiras de 1, 0 x 0,50 m (comprimento e largura, respectivamente) na linha do plantio, aos 90 e 180 dias após o plantio. Foram quantificadas as raízes nas camadas de 0 a 20, 20 a 40 e 40 a 60 centímetros de profundidade. Todo o montante de terra retirado foi peneirado e as raízes separadas e lavadas. Na sequência as raízes foram levadas para estufa a 65°C, até atingirem peso constante, e pesadas para obter a MSR. Nas duas variedades a inoculação promoveu aumento no volume de raízes, na camada de 0 – 20 cm, na segunda avaliação.

Termos de indexação: inoculante, bactérias diazotróficas, fixação biológica de nitrogênio.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a cana-de-açúcar foi uma das culturas que mais cresceu em área plantada no Brasil avançando sobre novas fronteiras, influenciando de forma decisiva no desenvolvimento

econômico, social e cultural das regiões onde novas unidades são instaladas. O balanço energético da produção de etanol de cana do Brasil varia ao redor de 9,35 unidades de energia produzida por cada unidade de energia fóssil investida na sua produção (Soares et al., 2009). Segundo a International Energy Agency (IEA, 2004) a emissão de CO₂ de etanol de cana-de-açúcar brasileira é 85% inferior à emissão da queima de combustíveis fósseis. Entre os fatores que tornam a cana-de-açúcar brasileira uma das mais eficientes culturas de produção energética do mundo encontram-se a FBN resultante da interação com bactérias diazotróficas que habitam os tecidos das plantas endofiticamente (Baldani et al., 2009). A hipótese de FBN na cana-de-açúcar foi embasada nos trabalhos pioneiros de Döbereiner (1953) quando foi verificada a ocorrência de *Azotobacter chroococcum* em solos ácidos da Baixada fluminense, no Estado do Rio de Janeiro e nos anos seguintes a presença de *Beijerinckia fluminensis* associada à rizosfera de cana-de-açúcar (Döbereiner & Ruschel, 1958) e *Azotobacter paspali* associada à rizosfera de *Paspalum notatum*, cultivar batatais (Döbereiner, 1966), sendo essas duas últimas fixadoras de N₂ atmosférico.

Segundo Orlando Filho et al. (1980); Urquiaga et al. (2012) e Schultz et al. (2012) a cana-de-açúcar pode acumular em torno de 200 kg ha⁻¹ no ciclo de cana-planta e de 120 a 180 kg ha⁻¹ nas soqueiras. Aproximadamente 70% do N acumulado na biomassa da parte aérea da cana-de-açúcar é exportado nos colmos destinados à indústria (Schultz et al., 2010). Se a saída de N do sistema solo-planta é maior que a reposição, isto indica que a cultura possui um sistema natural de reposição eficiente do N (Urquiaga et al., 2012). Com base nestas evidências diversos estudos sugerem que esta reposição de N seja proveniente do processo de FBN (Lima et al., 1987; Boddey et al., 2003; Oliveira et al., 2006; Urquiaga et al., 2012)).

O inoculante a base de bactérias diazotróficas vem sendo avaliado em estudos de laboratório, casa



de vegetação e campo (Baldani et al., 2009; Schultz et al. 2012). Os resultados mostram que existe potencial para o uso do inoculante bacteriano para a cana-de-açúcar, no entanto, ainda com grande variabilidade de respostas positivas, ausência de respostas e até mesmo respostas negativas, com queda de produtividade. Um dos maiores desafios é identificar a forma de atuação destas bactérias no desenvolvimento da cana-de-açúcar, uma vez que estes resultados ainda são incipientes. Neste contexto, investigar o desenvolvimento do sistema radicular da cultura de interesse pode resultar em avanços nos estudos, uma vez que plantas com sistema radicular bem desenvolvido podem expressar de forma mais eficiente seu potencial produtivo. Gírio et al. (2015), avaliando o desenvolvimento inicial de plantas de cana-de-açúcar verificou que o inoculante bacteriano promoveu aumento no crescimento inicial de raízes e parte aérea de plantas de cana-de-açúcar.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do inoculante na promoção e desenvolvimento radicular em duas variedades de cana-de-açúcar.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi implantado em março de 2013, no campo experimental da Embrapa Agrobiologia, no km 7 da rodovia BR 465, município de Seropédica, RJ (22°44'38" S e 43°42'28" W e 26 m de altitude) em um Argissolo Amarelo pobre em N. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com 4 tratamentos e 4 repetições, em fatorial 2 x 2 (2 variedades com e sem inoculação). As variedades avaliadas neste estudo foram RB867515 e RB92579, provenientes do viveiro de mudas da usina Cruz Alta do grupo Guarani, localizada no município de Olímpia, São Paulo.

Os tratamentos foram duas variedades de cana-de-açúcar com e sem inoculação com bactérias diazotróficas. As parcelas foram constituídas de 6 linhas com 5 metros de comprimento, espaçadas a 1,2 metros, totalizando 36 m² por parcela.

Antes do preparo do solo foi realizada amostragem nas camadas de 0 a 20 e 20 a 40 cm para a avaliação da fertilidade natural do solo. Ressalta-se que a área em questão permaneceu sob pastagem composta basicamente por colônias (*Panicum maximum*) e mistura de diferentes espécies de braquiárias (*Urochloa* sp.) por aproximadamente 21 anos. Os resultados da análise química de amostras de terra encontram-se na **Tabela 1**.

A área foi roçada e então realizada uma aração e aplicação de calcário logo em seguida. Uma segunda aração foi realizada para incorporação do calcário. Após 40 dias da aplicação e incorporação

foi realizada a abertura dos sulcos e realizada adubação.

Tabela 1. Características químicas do solo da área experimental antes do preparo do solo. (Campo Experimental – Embrapa Agrobiologia).

Prof	pH	Ca	Mg	Al	H+Al	V	P	K
cm	H ₂ O	-----cmolc	dm ⁻³ -----	-----	-----	-%-	mg	dm ⁻³
0 – 20	5,47	0,80	0,31	0,21	2,33	31	3	16
20 – 40	5,22	0,67	0,19	0,45	2,16	25	2	6

A adubação de plantio foi realizada aplicando-se os fertilizantes no fundo dos sulcos, com aplicação de 100 kg ha⁻¹ de P₂O₅ na forma de superfosfato simples; 100 kg ha⁻¹ de K₂O na forma de cloreto de potássio; 40 kg ha⁻¹ de FTE BR12 (mistura de micronutrientes) e 0,4 kg ha⁻¹ de molibdênio, na forma de molibdato de amônio. Aproximadamente 60 dias após o plantio foi realizada uma adubação com mais 60 kg ha⁻¹ de K₂O, na forma de cloreto de potássio. Não houve aplicação de adubo nitrogenado.

As cinco estirpes de bactérias diazotróficas que comporam o inoculante foram previamente testadas e selecionadas por Oliveira et al. (2003), e estão descritas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Espécies de bactérias diazotróficas endofíticas, estirpes, variedades e respectivas partes das plantas de cana-de-açúcar de onde foram isoladas.

Espécies	Estirpes	Variedades	Partes da planta
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	BR 11281	<i>Saccharum</i> sp.	Raízes
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	BR 11335	SP701143	Raízes
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	BR 11504	SP701284	Colmos
<i>Azospirillum amazonense</i>	BR 11145	CB453	Colmos
<i>Bulkholderia tropica</i>	BR 11366	SP711406	Perfilhos

Todas as estirpes estão depositadas na coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia.

Para a obtenção do inoculante, as bactérias foram cultivadas em meio de cultura Dyg's (Rodrigues Neto et al., 1986) de forma individualizada. Em seguida, 75 mL de meio de cultura Dyg's, com população de 10⁹ células mL⁻¹ de cada estirpe, foram adicionados a 175 g de turfa estéril (pH final 6,0), e essa mistura foi acondicionada em saco de plástico de 250 g, para cada estirpe. A suspensão inoculante foi preparada com a diluição de uma dose contendo as cinco estirpes (5 sacos com 250 g) do inoculante em 200 L de água limpa.



Para as avaliações foram abertas trincheiras com 1,0 m de comprimento por 0,50 m de largura na linha do plantio. A coleta foi realizada nas camadas de 0-20, 20-40 e 40-60 cm de profundidade. Todo o montante de terra retirado foi peneirado, sendo as raízes separadas e lavadas na sequência. Após a lavagem as raízes foram levadas para estufa de circulação forçada à 60° C para secagem e posterior pesagem.

Os dados foram submetidos à análise estatística para verificação da distribuição normal dos dados e a homogeneidade das variâncias pelo software SAEG 9.1. A análise de variância e o teste de médias foram realizados com auxílio do software SIVAR 4.3. As médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento inicial de raízes apresentou variações nas duas avaliações realizadas, nas duas variedades (**Tabela 3 e 4**). Na variedade RB867515, na primeira avaliação o controle foi superior ao tratamento inoculado na camada de 0 a 20 cm; na camada de 20 a 40 cm ocorreu o inverso com o tratamento inoculado sendo superior ao controle, mais que o dobro. Na camada de 40 a 60 cm não foram verificadas raízes na primeira avaliação. Na segunda avaliação o tratamento inoculado apresentou massa seca de raízes superior ao controle na camada de 0 a 20 cm.

Tabela 3 – Matéria seca de raízes de cana-de-açúcar (Mg ha⁻¹), variedade RB867515 cultivada em Argissolo Amarelo com e sem inoculação com bactérias diazotróficas.

0 a 20 cm		
Tratamento	1ª coleta 90 DAP	2ª coleta 180 DAP
Controle	0,99 a	1,29 b
Inoculado	0,54 b	1,58 a
CV(%)	21,37	12,34
20 – 40 cm		
Controle	0,41 b	0,52
Inoculado	1,02 a	0,48
CV(%)	36,02	40,67
40 – 60 cm		
Controle	0,00	0,17
Inoculado	0,00	0,17
CV(%)	0,00	29,56

Médias oriundas de 4 repetições. Letras diferentes indicam que os tratamentos diferiram entre si na coluna. A ausência de letras indica que não houve diferença entre os tratamentos. DAP: dias após o plantio. C. V.: coeficiente de variação. Teste Scott-Knott a 5% de significância.

Nas camadas de 20 a 40 e 40 a 60 cm não houve diferença no acúmulo de raízes entre o controle e a inoculação.

Na variedade RB92579 não houve efeito de tratamento no desenvolvimento de raízes na primeira avaliação. Nesta avaliação não foi verificada a presença de raízes na camada de 40-60 cm de profundidade. Na segunda avaliação a inoculação promoveu aumento no volume de raízes na camada de 0-20 cm. Na camada de 20-40 não houve diferença e na camada de 40-60 cm o controle apresentou volume de raízes superior ao tratamento inoculado.

Tabela 4 – Matéria seca de raízes de cana-de-açúcar (Mg ha⁻¹), variedade RB92579 cultivada em Argissolo Amarelo com e sem inoculação com bactérias diazotróficas.

0 a 20 cm		
Tratamento	1ª coleta 90 DAP	2ª coleta 180 DAP
Controle	0,66	0,96 b
Inoculado	0,54	1,39 a
CV(%)	21,37	12,34
20 – 40 cm		
Controle	0,30	0,70
Inoculado	0,31	0,86
CV(%)	36,02	40,67
40 – 60 cm		
Controle	0,00	0,25 a
Inoculado	0,00	0,12 b
CV(%)	0,00	29,56

Médias oriundas de 4 repetições. Letras diferentes indicam que os tratamentos diferiram entre si na coluna. A ausência de letras indica que não houve diferença entre os tratamentos. DAP: dias após o plantio. C. V.: coeficiente de variação. Teste Scott-Knott a 5% de significância.

Apesar da irregularidade dos resultados, nas duas variedades a inoculação promoveu aumentos no volume de raízes na segunda avaliação realizada até 180 dias após o plantio. Estes resultados mostram que o inoculante pode estar influenciando o sistema radicular da cana-de-açúcar a partir do desenvolvimento das raízes dos perfilhos, destacando-se na camada superficial do solo onde ocorre maior atividade dos microrganismos, entre os quais devem estar presentes, principalmente na rizosfera as bactérias introduzidas via inoculação.

CONCLUSÕES

A inoculação promoveu aumento no desenvolvimento das raízes dos perfilhos, na camada superficial do solo, nas duas variedades, até 180 dias após o plantio.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Agrobiologia pelo campo experimental e laboratórios, e aos órgãos de fomento CNPq e CAPES.



REFERÊNCIAS

- BALDANI, J. I.; TEIXEIRA, K. R. S.; SCHWAB, S.; OLIVARES, F. L.; HEMERLY, A. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; NOGUEIRA E. M.; ARAÚJO, J. L. S.; BALDOTTO, L. E. B.; SOARES, L. H. B.; VINAGRE, F.; BALDANI, V. L. D.; CARVALHO, T. L. G.; ALVES, B. J. R.; JAMES, E. K.; JANTALIA, C. P.; FERREIRA, P. C. G.; VIDAL, M. S.; BODDEY, R. M. Fixação Biológica de Nitrogênio em Plantas da Família da Poaceae (antiga gramineae). In: RIBEIRO M. R. ARAÚJO, NASCIMENTO, C. W.; RIBEIRO FILHO, M. R.; CANTALICE, J. R. B. (Ed.). Tópicos em Ciência do Solo. 1 ed. Viçosa-MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 2009. p.203-271.
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. M. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant and Soil*, v. 252, p.139-149, 2003.
- DÖBEREINER, J. *Azotobacter* em solos ácidos. *Biological Institute Ecology Experimental Agriculture.*, v.11, p.1-36. 1953.
- DÖBEREINER J. & RUSCHEL A. P. Uma nova espécie de Beijerinckia. *Revista de Biologia (São Paulo)* v. 1, p. 261-272, 1958.
- DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp. Nov., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v.1, p.357-365, 1966.
- GÍRIO, L. A. S.; DIAS, F. L. F.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; SCHULTZ, N.; BOLONHEZI, D.; MUTTON, M. A. Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar provenientes de mudas pré-brotadas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 50, n.1, p.33-43, 2015.
- IEA, International Energy Agency. *Biofuels for transport: An International Perspective*. Paris, France. Disponível em at: <http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2004/Biofuels2004.pdf>.
- LIMA, E.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugarcane using a ¹⁵N aided nitrogen balance. *Soil Biol. Biochem.*, v.19, p.167-170, 1987.
- OLIVEIRA, A. L. M. de; CANUTO, E. de L.; REIS, V. M.; BALDANI J. I. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. *Brazilian Journal Microbiology*, 34:59-61, 2003. Supl. 1.
- OLIVEIRA, A.L.M. de; CANUTO, E. de L.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; BALDANI J.I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 284, n. 1-2, p. 23-32, 2006.
- ORLANDO-FILHO, J.; HAAG, H. P.; ZAMBELLO J. R. E. Crescimento e absorção de macronutrientes pela cana-de-açúcar, variedade CB 41-76 em função de idade em solos do Estado de São Paulo. *Boletim. Técnico N° 2, Planalsucar, Piracicaba, SP*, 1980, 128p.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA, J. R. V. A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* PV. *Citri* TIPO B. *Suma Phytopathologica*, v.12 1986. 16p.
- SCHULTZ, N.; LIMA, E.; PEREIRA, M.G; ZONTA, E. Efeito residual da adubação na cana-planta e da adubação nitrogenada e potássica na cana-soca colhidas com e sem a queima da palhada. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.34, p.811-820, 2010.
- 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 variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 47, n.2, p.261-268, 2012.
- SOARES, L. H. DE B.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Mitigação das emissões de gases efeito estufa pelo uso de etanol da cana-de-açúcar produzido no Brasil. *Seropédica, Embrapa Agrobiologia*, 2009. 14p. (Circular Técnica 27).
- URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F.; BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. *Plant and Soil*, v.356, p.5-21, 2012.