

14º Prêmio Destaque na Iniciação Científica e Tecnológica - Bolsista de Iniciação Tecnológica Ciências Exatas, da Terra e Engenharias

2.12.02 - Microbiologia/Microbiologia Aplicada

## UTILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS BENÉFICOS NA PRODUÇÃO DE MUDAS DE CANA-DE-AÇÚCAR PELO SISTEMA MPB

Gabrielle M. F. Pierangeli<sup>1</sup>, Matheus A. P. Cipriano<sup>2</sup>, Elaine G. Labanca<sup>2</sup>, Mauro A. Xavier<sup>2</sup>, Adriana P. D. da Silveira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Autora, bolsista CNPq (PIBITI) no Instituto Agrônômico (IAC); gabi\_pierangeli@hotmail.com.

<sup>2</sup>Colaboradores, pesquisadores do Instituto Agrônômico (IAC).

<sup>3</sup>Orientadora, pesquisadora do Instituto Agrônômico (IAC); apdsil@iac.sp.gov.br

### Resumo:

O Brasil é um dos maiores produtores de cana-de-açúcar e o investimento em tecnologia permite obter maior produtividade e sustentabilidade em seu cultivo. Com esse propósito, o Programa Cana IAC criou o sistema de Mudanças Pré-Brotadas (MPB). A utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) é uma ferramenta para viabilizar a agricultura sustentável. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da inoculação de BPCPs, endofíticas e rizoféricas, e de FMAs em mudas de cana-de-açúcar do sistema MPB.

Foram realizados três experimentos, com duas fases: a primeira em bandejas, por 15 dias e a segunda em tubetes, por 45 dias. Os experimentos diferiram na quantidade de inoculações e na adubação. Foram realizadas análises de matéria seca, nutrição mineral e colonização micorrízica das mudas.

Os microrganismos testados tem potencial para aplicação no sistema MPB para melhores resultados, com a cultivar de cana-de-açúcar IACSP 95-5000.

**Autorização legal:** Pedido em andamento.

**Palavras-chave:** Bactéria promotora de crescimento de plantas; Fungo micorrízico arbuscular; Mudanças pré-brotadas.

**Apoio financeiro:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Programa CNPq/NWO (456420/2013)

### Introdução:

Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores de cana-de-açúcar (CONAB, 2016), cujo emprego pode ocorrer para fins de alimentação animal e fabricação de açúcar, álcool e etanol (PERIN, 2007).

O investimento em tecnologia permite obter maior produtividade e

sustentabilidade na produção de cana-de-açúcar (ROSSETO *et al.*, 2013) e, com esse propósito, foi desenvolvido pelo Programa Cana IAC o sistema de Mudanças Pré-Brotadas (MPB), que consiste na obtenção de mudas a partir do plantio de minirrebolos (LANDELL; CAMPANA; FIGUEIREDO, 2012).

A utilização de microrganismos benéficos às plantas permite viabilizar uma agricultura sustentável (CATTELAN, 1999). As bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCPs) desempenham processos ecológicos importantes, contribuindo para promover significativamente a produção agrícola (FIGUEIREDO *et al.*, 2010).

Sabe-se que algumas rizobactérias podem favorecer a promoção de crescimento de plantas por meio da produção de hormônios vegetais e disponibilizar nutrientes minerais para as plantas (CATTELAN, 1999). As bactérias endofíticas também promovem o crescimento de plantas de forma direta ou indireta. Dentre as principais BPCPs utilizadas na agricultura, encontram-se espécies pertencentes a gêneros como *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Rhizobium* sp. e *Enterobacter* sp. (MARIANO *et al.*, 2004).

Como já constatado, a inoculação de BPCPs resultou em maior acúmulo de matéria seca de cana-de-açúcar (CAMPOS, 2010; GÍRIO *et al.*, 2015; SANTOS; RIGOBELLO, 2016; TAULÉ *et al.*, 2016) e incrementou a absorção de nutrientes (FREITAS-IÓRIO, 2016).

As micorrizas também beneficiam as plantas e são formadas pela associação mutualísticas entre plantas vasculares e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). A planta proporciona um substrato energético ao fungo e este capta os nutrientes disponíveis no solo por intermédio da sua rede de hifas e os transporta à planta hospedeira (SILVEIRA, 1992). A inoculação de FMAs promove benefícios em muitas plantas de interesse agrícola, especialmente naquelas que passam

por um período em viveiro, para produção de mudas (SILVEIRA; GOMES, 2007; TRINDADE *et al.*, 2010).

O objetivo foi avaliar os efeitos da inoculação de BPCPs endofíticas (IAC-BeCa-095 - *Kosakonia oryzae* e IAC-BeCa-088 - *Burkholderia caribensis*) e rizosféricas (IAC-RBca5 - *Pseudomonas* sp. e IAC-RBca11 - *Bacillus* sp.) e de FMAs (IAC-042 - *Claroideoglossum etunicatum* e IAC-03 - *Glomus macrocarpum*) em mudas de cana-de-açúcar do sistema MPB.

### Metodologia:

Foram realizados três experimentos em casa de vegetação, com duas fases: a primeira em bandejas, por 15 dias e a segunda em tubetes, por 45 dias, seguindo o padrão do sistema de mudas pré-brotadas (LANDELL; CAMPANA; FIGUEIREDO, 2012).

Os experimentos 1 e 2 tiveram esquema fatorial 5x2, sendo: 5 tratamentos bacterianos (*Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *B. caribensis*, *K. oryzae* – e 1 controle – sem inoculação bacteriana) x inoculação ou não de uma mistura de solo-inóculo de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs – *C. macrocarpum* e *G. etunicatum*), totalizando 10 tratamentos em cada experimento. No experimento 1, as inoculações de bactérias e de solo-inóculo de FMAs ocorreram nas duas fases e foram realizadas adubações, sugeridas por Landell, Campana e Figueiredo (2012) durante a fase em tubetes. No experimento 2, a inoculação de bactérias e de solo-inóculo de FMAs foi realizada apenas na fase em bandejas e não foram realizadas adubações. No experimento 1, foram feitas análises de massa de matéria seca, do teor de macro e micronutrientes da parte aérea, e de colonização micorrízica, enquanto que no experimento 2 a análise de nutrição mineral não foi realizada.

No experimento 3 foi realizado esquema fatorial 3x2x2, sendo: 3 tratamentos bacterianos (*Bacillus* sp., *K. oryzae* e 1 controle – sem inoculação bacteriana) x 2 cultivares de cana-de-açúcar (IACSP 95-5000 e IACSP 95-5094) x inoculação ou não de uma mistura de solo-inóculo de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs – *C. macrocarpum* e *G. etunicatum*), totalizando 12 tratamentos. A inoculação de bactérias e de solo-inóculo de FMAs ocorreu nas duas fases e o substrato utilizado já possuía adubação prévia, realizada no Centro de Cana do IAC. Foram feitas análises de massa de matéria seca, nutrição mineral e de colonização micorrízica das mudas.

Os inóculos bacterianos foram preparados com solução de sulfato de magnésio 0,01 mol/L, e os inóculos de fungos micorrízicos foram preparados com 500 mL de solo-inóculo de cada fungo.

Para a análise de massa de matéria seca da parte aérea e raízes, as mudas foram secas em estufa a 60°C e posteriormente pesadas.

A concentração de nitrogênio foi determinada pelo método Kjeldahl (GALVANI; GAERTNER, 2006) e para a determinação de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, ferro, manganês, cobre e zinco, utilizou-se a técnica de digestão nitro-perclórica por via úmida (BATAGLIA *et al.*, 1983). O boro foi analisado por digestão nitro-perclórica por via seca. As leituras foram realizadas por ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry).

Para a análise de colonização micorrízica, foi usado o método de coloração das raízes (KOSKE; GEMMA, 1989) e os fragmentos da raiz foram observados em microscópio óptico para verificação de hifas, vesículas e arbúsculos dos fungos.

Foram feitas análises estatísticas no programa Sisvar, com o teste Scott-Knott a 5% para comparação de médias.

### Resultados e Discussão:

**Experimento 1:** As bactérias *B. caribensis* e *Pseudomonas* sp. promoveram crescimento da parte aérea das mudas. Campos (2010), em experimento com plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar e utilizando o mesmo isolado de *Pseudomonas* sp. utilizado neste trabalho, também constatou promoção de crescimento da parte aérea das mudas. Freitas (2011) verificou que a aplicação de diazotróficas endofíticas oriundas de cana-de-açúcar em mudas do cultivar IACSP 95-5000, obtidas por micropropagação, favoreceu crescimento das plantas.

A inoculação de *B. caribensis* promoveu maiores teores de manganês, potássio, magnésio, boro e enxofre e *Pseudomonas* sp. promoveu maiores teores de manganês, potássio, magnésio e enxofre. Além disso, as mudas com inoculação isolada dessas bactérias apresentaram raízes com maior colonização micorrízica em comparação com os demais tratamentos, o que pode explicar a promoção de crescimento e os maiores teores nutricionais que essas bactérias promoveram na ausência de inoculação dos fungos.

As mudas com inoculação apenas dos fungos micorrízicos não tiveram alteração

no seu crescimento, mas apresentaram maiores teores de cálcio, enxofre, fósforo, nitrogênio, potássio, boro, cobre, manganês e zinco, em comparação com as mudas sem inoculação dos fungos. TELLECHEA (2007) já havia observado maiores teores de cálcio e nitrogênio na parte aérea de mudas de cana-de-açúcar associadas a fungos micorrízicos e cultivadas a partir de minirrebolos.

O efeito benéfico dos fungos micorrízicos em proporcionar melhor nutrição mineral das plantas já foi observado em diversos estudos, como em abacateiro (SILVEIRA; SOUZA; KOLLER, 2002), capim-marandu (COSTA *et al.*, 2012) e mandioca (NASCIMENTO, 2012).

A bactéria *K. oryzae* com inoculação micorrízica promoveu maiores teores de cálcio e enxofre na parte aérea das mudas e *Bacillus* sp. promoveu maiores teores de cobre e zinco, em comparação aos seus respectivos tratamentos sem inoculação dos fungos. Além disso, essas bactérias também promoveram o crescimento da parte aérea das mudas. No entanto, esses tratamentos bacterianos não diferiram estatisticamente do controle inoculado com fungos nos teores desses nutrientes, sugerindo que a co-inoculação não foi significativa para a nutrição e o crescimento da parte aérea das mudas.

Apenas o tratamento *K. oryzae* associado à inoculação com fungo micorrízico promoveu maior colonização micorrízica em comparação com os demais tratamentos com fungo e com o seu respectivo tratamento sem inoculação dos fungos. Freitas (1994), em experimentos com feijoeiro, observou relação de preferência entre bactérias e fungos micorrízicos, em relação à ocorrência de colonização radicular pelos fungos.

Embora *K. oryzae* co-inoculada com os fungos micorrízicos tenha proporcionado maior colonização micorrízica, essa colonização foi pouco refletida em benefícios às mudas de cana-de-açúcar. Isso pode ter ocorrido porque, mesmo que um fungo micorrízico arbuscular esteja colonizando amplamente as raízes de uma planta hospedeira, esse acontecimento nem sempre acarreta em efeitos benéficos relevantes para a planta (DINIZ, 2007). A associação micorrízica arbuscular apresenta como constituintes essenciais, além das raízes das plantas e da colonização das raízes pelas estruturas do fungo, o micélio extrarradicular que se desenvolve no solo e absorve os nutrientes (CAVALCANTE; GOTO; MAIA, 2009). Em alguns casos, não há relação entre a porcentagem de colonização micorrízica e a produção de micélio externo pelo fungo

micorrízico (TRISTÃO; ANDRADE; SILVEIRA, 2006; NOGUEIRA E CARDOSO, 2000).

**Experimento 2:** As bactérias *B. caribensis* e *Pseudomonas* sp. sem inoculação micorrízica promoveram crescimento da parte aérea em comparação com os demais tratamentos sem fungo micorrízico, o que foi também observado com a inoculação de *Bacillus* sp. no segundo experimento. A ausência de adubação pode ter influenciado na resposta das mudas à inoculação bacteriana, como apontado por Tellechea (2007), que observou que em mudas de cana-de-açúcar do cultivar RB72454, obtidas a partir de minirrebolos, a inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae* proporcionou aumento da massa de matéria seca da parte aérea na ausência de adição de fósforo.

Em comparação ao experimento 1, houve uma diferença na colonização micorrízica, que pode estar relacionada a fatores como composição ou adubação do substrato ou espécie do fungo micorrízico arbuscular. Tellechea (2007), em experimento com mudas de cana-de-açúcar cultivadas a partir de minirrebolos, verificou diferentes taxas de colonização micorrízica dependendo do fungo utilizado e que a incorporação de maior dose de fósforo acarretou em uma diminuição da colonização micorrízica nas raízes das mudas.

**Experimento 3:** Ocorreu pouca germinação dos minirrebolos em alguns tratamentos da cultivar IACSP 95-5094, o que inviabilizou as posteriores análises das mudas da referida cultivar. O isolado *Bacillus* sp., sem inoculação micorrízica, promoveu crescimento da raiz em comparação aos demais tratamentos sem fungo e ao seu respectivo tratamento com inoculação dos fungos. Santos e Rigobelo (2016), ao inocular as bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* em mudas de cana-de-açúcar cultivadas pelo sistema MPB, também constataram aumento da massa de matéria seca das raízes das mudas.

As mudas que tiveram apenas a inoculação dos fungos micorrízicos *C. macrocarpum* e *G. etunicatum* não apresentaram melhora na nutrição mineral em comparação com as mudas sem inoculação desses fungos, diferente do ocorrido no experimento 1. Esse fato pode estar relacionado com a adubação distinta nos dois experimentos.

A bactéria *K. oryzae* co-inoculada com os fungos micorrízicos promoveu o crescimento da parte aérea e das raízes das mudas, além de promover maiores teores de

cálcio, fósforo, cobre e manganês, em comparação ao seu tratamento sem fungo e aos demais tratamentos com fungo. Esses resultados mostram que a co-inoculação de *K. oryzae* com os fungos micorrízicos mostrou efeito sinérgico benéfico para o crescimento e para a nutrição mineral das mudas, com a adubação realizada pelo Centro de Cana do IAC.

Não foi observada diferença estatística entre os tratamentos para a colonização micorrízica, independente da inoculação dos fungos.

### Conclusões:

A adubação do substrato influenciou a resposta das mudas à inoculação dos microrganismos.

A inoculação isolada das bactérias *B. caribensis* e *Pseudomonas* sp. foi benéfica para a promoção de crescimento da parte aérea e para a nutrição mineral, independente da adubação e do número de inoculações.

A inoculação apenas dos fungos micorrízicos promoveu melhor nutrição mineral das mudas quando não foi utilizado o substrato adubado conforme recomendação do Centro de Cana do IAC.

A co-inoculação das bactérias *K. oryzae* e *Bacillus* sp. com os fungos micorrízicos, comparando com a inoculação isolada das bactérias, beneficiou a nutrição mineral e o crescimento das mudas.

Ocorreu efeito sinérgico da co-inoculação de *K. oryzae* com os fungos micorrízicos para a promoção de crescimento e nutrição mineral das mudas com o substrato adubado conforme recomendação do Centro de Cana do IAC.

Os microrganismos testados possuem potencial para aplicação no sistema MPB, utilizando a cultivar de cana-de-açúcar IACSP 95-5000.

### Referências bibliográficas

BATAGLIA, O. C. *et al.* **Métodos de análise química de plantas**. Campinas: Instituto Agronômico, Boletim Técnico, n.78, 48p, 1983.

CAMPOS, J. T. **Rizobactérias promotoras de crescimento de cana-de-açúcar**. 2010. 59f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Curso de Pós-Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2010.

CATTELAN, A. J. **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento**

**vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, Documentos Embrapa, n.139, 36p., 1999.

FREITAS, R. de P. **Bactérias diazotróficas endofíticas associadas à cana-de-açúcar**. 2011. 85f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Curso de Pós-Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2011.

GALVANI, F.; GAERTNER E. Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta. **Circular Técnica**, Corumbá, 2006.

GÍRIO, L. A. S. *et al.* Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.50, n.1, p.33-43, 2015.

KOSKE, R. E.; GEMMA, J. N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, v.92, n.4, p.486-488, 1989.

LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P. **Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas**. Campinas: Instituto Agronômico, Documentos IAC, n.109, 16p, 2012.

SANTOS, R. M. dos; RIGOBELLO, E. C. Uso de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* na promoção de crescimento de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, AGRÍCOLA E AMBIENTAL (CBMAAA), **Ciência e Tecnologia**: FATEC-JB, Jaboticabal, v.8, número especial, 2016.

SILVEIRA, A. P. D. da. Micorrizas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Coord.). **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.257-282.

TELLECHEA, F. R. F. **Fungos micorrízicos, bactérias diazotróficas endofíticas e fósforo no crescimento e acúmulo de nutrientes em mudas de cana-de-açúcar**. Tese (Mestrado em Produção Vegetal). Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, 2007.