

RESPOSTAS DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR À INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS

ERINEUDO DE LIMA CANUTO¹, JOANA FALCÃO SALLES², ANDRÉ LUIZ MARTINEZ OLIVEIRA¹, LIAMARA PERIN¹, VERÔNICA MASSENA REIS³ & JOSÉ IVO BALDANI³.

1- Pós-graduação em Agronomia – Ciência do Solo, UFRRJ. 2- Plant Research International, Binnenhaven 5, NL 6700 – Wageningen, Holland. 3- Pesquisadores Embrapa-Agrobiologia, Fax (0xx21) 2682-1500. E-mail: ibaldani@cpab.embapa.br, Seropédica-RJ

RESUMO

Foram realizados dois experimentos em vasos com substrato estéril à base de areia e vermiculita, em casa de vegetação e um experimento em vaso com solo mantido ao ar livre, com o objetivo de selecionar estirpes e/ou combinação de estirpes diazotróficas endofíticas visando a introdução comercial da prática da inoculação dessas bactérias em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar. Nos experimentos em casa-de-vegetação, foram testadas 44 isolados de bactérias diazotróficas endofíticas, inoculadas em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade SP70-1143. As estirpes que promoveram o maior acúmulo de massa seca total das plantas nos dois primeiros experimentos foram reavaliadas no experimento em vaso com solo e comparadas com as misturas das estirpes HRC53 x BR11329, PAL3 x HRC54 e PAL5 x HCC103. No experimento em vasos com solo, a inoculação das estirpes PAL3, CBAmC e HRC80 promoveu um aumento significativo de quantos no acúmulo de massa seca de colmos de cana enquanto que o maior acúmulo de N-total nos tecidos foi observado com a inoculação das estirpes CBAmC, Z94, HRC54 e da mistura PAL5 x HCC103. As demais estirpes não promoveram nenhum aumento ou os efeitos foram negativos. Os resultados mostraram que a resposta da inoculação foi bastante variável e dependente de vários fatores incluindo o genótipo vegetal e o ambiente. Novos estudos devem ser realizados visando aprimorar a metodologia de avaliação de seleção de estirpes, de modo a definir aquelas que possuem maior potencial para serem usadas comercialmente na inoculação de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio, cultura de meristemas, bactérias diazotróficas, endófitos, promotores de crescimento

ABSTRACT

RESPONSE OF MICROPROPAGATED SUGARCANE PLANTS TO INOCULATION WITH ENDOPHYTIC DIAZOTROPHIC BACTERIA

Greenhouse experiments (indoor and outdoor) were carried out to evaluate the potential of micropropagated sugarcane plants to respond the inoculation of endophytic nitrogen-fixing bacteria. Forty-four endophytic diazotrophic strains were inoculated separately in micropropagated plants of the variety SP 70-1143. The plants were grown in sterile substrate sand and vermiculite (1:1) in greenhouse during 90 days. The strains selected from the first two experiments were compared in a soil pot experiment with the mixtures HRC53 x BR11329, PAL3 x HRC54 and PAL5 x HCC103, during 180 days. A significant increase on stem dry matter was observed with the inoculation of the strains PAL3, CBAmC and HRC80 while the total-N accumulated in the plant tissues increased significantly with the inoculation of strains CBAmC, Z94, HRC54 and a mixture of PAL5 x HCC103. The other strains promoted none or negative responses. The results showed that the response to inoculation was variable and dependent on different aspects including plant genotype and environment. It suggests that new studies should be carried out to improve the methodology of strain selection envisaging to define those strains with the highest potential to be included in the commercial inoculation program of micropropagated sugarcane plants.

Key words: meristem culture, plant growth promoting bacteria, nitrogen fixation.

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é cultivada em quase todas as regiões agrícolas brasileiras (Baldani *et al.*, 2002),

sendo o Brasil o maior produtor mundial com uma área plantada de aproximadamente cinco milhões de hectares e uma produtividade média de 70 t.ha⁻¹ de colmos frescos (IBGE, 2003). Uma lavoura de cana-

de-açúcar com produtividade de 100 t.ha⁻¹ de colmos, no primeiro ciclo cultural, acumula entre 180 e 250 kg. ha⁻¹ de N, enquanto que nos ciclos seguintes, pode-se acumular de 120 a 180 kg.ha⁻¹ de N (Orlando Filho *et al.*, 1980; Sampaio *et al.*, 1984). Esta cultura, que demanda grande quantidade de N, apresenta uma baixa resposta à adubação nitrogenada, o que sugere que a interação de alguns microrganismos diazotróficos endofíticos com as plantas seja um sistema natural de reposição do N exportado anualmente dos solos pela colheita. No Brasil, a dose de N-fertilizante recomendada pela COPERSUCAR (Cooperativa de Produtores de Açúcar e Álcool de São Paulo) para cana-de-açúcar é de 50 kg N.ha⁻¹ ano⁻¹ para cana planta e 100 kg N.ha⁻¹.ano⁻¹, a partir da primeira soca (Copersucar, 2000).

Os estudos sobre a fixação biológica de nitrogênio (FBN) associada à cana-de-açúcar tem se intensificado nos últimos anos e várias bactérias fixadoras de N₂ foram isoladas de tecidos de diversas partes da planta (Baldani *et al.*, 2002). Porém, ainda há muitas dúvidas sobre qual ou quais bactérias seriam as principais responsáveis pelo potencial de FBN desta cultura. Os dados de literatura mostram que a contribuição de FBN associada às plantas de cana-de-açúcar cultivadas no campo e sem inoculação varia de zero a 70%, conforme demonstrado pelas medições realizadas através da técnica de abundância natural de delta ¹⁵N e da técnica de diluição isotópica de ¹⁵N (Polidoro *et al.*, 2002; Urquiaga *et al.*, 1992). Apesar de ser conhecida a influência das variedades e das condições de fertilidade do solo sobre a FBN em cana-de-açúcar (Boddey *et al.*, 2001), pouco se conhece sobre o potencial da inoculação das bactérias diazotróficas endofíticas nesta cultura. Estudos recentes de inoculação de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar com uma mistura de 5 estirpes de espécies diferentes mostraram contribuições ao redor de 30% (Oliveira *et al.*, 2002). Desta forma, a seleção de bactérias diazotróficas endofíticas com alto potencial de associação e contribuição para a FBN, pode ser um fator diferencial para diminuir a dependência da cultura pelo N derivado do solo ou da adubação nitrogenada sem que haja perda de produção de cana-de-açúcar.

A comercialização de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil a partir da década de 80, com o objetivo de produzir mudas com características genéticas originais e excelente grau de fitossanidade. Entretanto, além de eliminar os microrganismos patogênicos, a micropropagação também promove a eliminação das bactérias diazotróficas endofíticas (Moraes & Tauk Tornisiello, 1997). A reintrodução de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar tem auxiliado os estudos da associação entre as plantas e as bactérias diazotróficas, e tem permitido avaliar o potencial de FBN e de promoção de crescimento devidos a inoculação de de bactérias diazotróficas endofíticas (Reis *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2002). Neste trabalho, buscou-se selecionar estirpes

de bactérias diazotróficas endofíticas que melhor se associem com plantas micropropagadas de cana-de-açúcar visando a introdução comercial da prática da inoculação dessas plantas micropropagadas e consequentemente beneficiar a cultura através do processo de FBN ou outros mecanismos de promoção de crescimento vegetal.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade SP 70-1143, foram utilizadas para avaliar o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. As plantas micropropagadas na fase de enraizamento foram individualizadas e transferidas para frascos com 50 mL de meio MS, modificado por Reis *et al.* (1999). Após 48 horas da transferência das plantas, os frascos que não apresentaram contaminação foram selecionados para receberem o inóculo bacteriano.

As 44 estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas testadas são pertencentes às seguintes espécies: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (3R-2, 4R-2, 5R-2, 5F-2, 20R-2, 20R-4, 26R-2 PAL3, PPe4, PAL5, PSP14, PSP17, PSP22, PRJ14, PRJ45, PRJ50, PRJ53, PRJ54, PRJ55, PRJ60, BR11329, CHR e CHCA); *Herbaspirillum seropedicae* (HRC50, HRC53, HRC54, HRC80, M2, HCC100, HCC101, HCC102 e Z94); *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (HRC61, HCC103, M4, M5 e M6); *Azospirillum lipoferum* (5Sp, Az6 e 31P); *Azospirillum amazonense* (CBAmC) e *Burkholderia* spp (PPE6, PPE8 e M130), todas oriundas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. As bactérias foram crescidas durante 14 horas em meio líquido sob agitação (*G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp. e *A. lipoferum* em meio Dygs; *Azospirillum amazonense* em meio LGI e *Burkholderia* spp. em meio NB) (Dobereiner *et al.*, 1995), a uma temperatura de 30 °C. Uma alíquota de 100 µL de cada cultura com uma densidade ótica (D.O₅₄₀=1), contendo aproximadamente 10⁸ células/mL, foi adicionada aos frascos contendo as plantas micropropagadas e meio específico para inoculação.

Foram conduzidos três experimentos, dos quais dois em vasos do tipo Leonard preenchidos com uma mistura de areia e vermiculita estéreis, na proporção 1:1, em condições de casa de vegetação, e um em vaso com subsolo argiloso não estéril (ARGISSOLO vermelho-amarelo) ao ar livre, fora da casa-de-vegetação. No primeiro experimento foram testadas as 44 estirpes de bactérias, acima citadas, com um delineamento experimental de blocos ao acaso com três repetições. As plantas foram mantidas nos vasos de Leonard durante 65 dias e adubadas com solução nutritiva (Gruzman & Dobereiner, 1968). O efeito da inoculação foi avaliado através da determinação de do acúmulo de massa seca de raiz e da parte aérea, assim como do volume radicular pelo método de titulação (Carley & Watson, 1966). No segundo experimento, instalado de forma semelhante ao anterior, foram testadas as estirpes selecionadas no

primeiro experimento: HCC103, Z94, HRC80, HRC53, HRC54, BR11329, PRJ50, PRJ55, PAL3, PAL5, 3R-2 e CBAmC, mantendo-se as mesmas condições de crescimento e solução nutritiva. O efeito da inoculação foi avaliado através das mesmas características fenológicas apresentadas pelas plantas, porém aos 95 dias após a inoculação.

Um terceiro experimento foi conduzido em vasos com solo, fora da casa-de-vegetação, utilizando-se as mesmas estirpes testadas no segundo experimento além das misturas de estirpes HRC53 x BR11329, PAL3 x HRC54 e PAL5 x HCC103 selecionadas com base nos estudos realizados por Oliveira *et al.* (2002). Neste experimento, as plantas foram aclimatadas em casa de vegetação por 30 dias, em bandejas de isopor tipo plantágil, transferidas para vasos contendo 12 kg de solo previamente adubados com macro e microelementos, conforme a análise do solo. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis repetições. Aos 180 dias após o plantio, foram feitas as avaliações do acúmulo de massa fresca e seca de raiz e parte aérea, volume radicular pelo método de titulação citado anteriormente e determinação do nitrogênio total acumulado nos tecidos da planta pelo método de Kjeldahl (Alves *et al.*, 1994).

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa de análise de variância SisVar (versão 4.3), desenvolvido no departamento de ciências exatas da Universidade Federal de Lavras (<http://www.ufla.br>). A normalidade da distribuição de frequência de dados foi analisada aplicando-se o teste de Shapiro Wilk e o teste de médias utilizado foi o LSD (Least Significant Difference) com nível de significância de 10 % ($p < 0,10$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados observados no primeiro experimento não mostraram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos inoculados com as 44 estirpes de bactérias diazotróficas e o controle não inoculado, em relação às características analisadas (dados não apresentados). Porém, algumas estirpes promoveram um maior acúmulo de matéria seca total da planta comparada à planta controle. Com base nestes resultados, foi feita uma seleção das estirpes que se destacaram e foi instalado o segundo experimento objetivando reavaliar o efeito destas bactérias no desenvolvimento das plantas micropropagadas de cana-de-açúcar.

No segundo experimento, as plantas inoculadas com as bactérias PAL3, HRC54, PAL5, HCC103 e HRC80 apresentaram um maior volume radicular, embora não diferissem estatisticamente das plantas não inoculadas. Já a inoculação das misturas PAL5 x HRC54, PAL5 x HCC103 e da estirpe HRC53 promoveram um efeito negativo sobre o volume radicular (Figura 1). Efeito negativo da inoculação na sobrevivência das plantas de cana-de-açúcar micropropagadas quando inoculadas com a mistura de cinco estirpes de diferentes espécies de bactérias diazotróficas também foram observados por Oliveira *et al.* (2002). A avaliação do acúmulo de matéria seca total da planta mostrou que a inoculação das estirpes CBAmC, HCC103 e PAL3 promoveu um efeito positivo no desenvolvimento das plantas, porém os resultados não diferiram estatisticamente dos demais tratamentos de inoculação. Por outro lado, a inoculação com a estirpe PRJ50 e a mistura PAL5 x HRC54 afetou negativamente o desenvolvimento destas plantas (dados não apresentados).

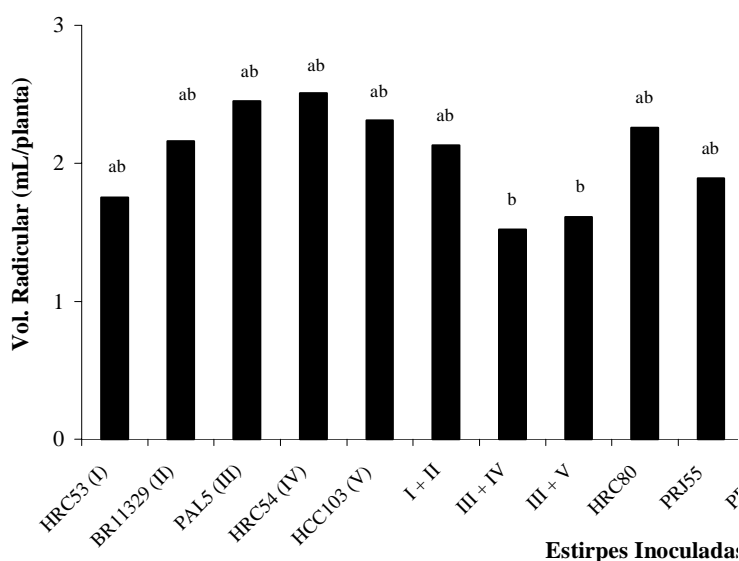


Figura 1- Efeito da inoculação de diferentes estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas no volume radicular de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade SP 70-1143, 95 dias após a inoculação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,10$). Dados referentes ao 2º experimento.

O terceiro experimento, conduzido em vasos com solo ao ar livre mostrou que os tratamentos de inoculação com as estirpes HRC80, PAL3 e HRC54 proporcionaram maior acúmulo de massa seca de raiz em comparação ao tratamento controle não inoculado (dados não apresentados). Já a inoculação com as estirpes PAL3 e CBAmC promoveu um aumento significativo no

acúmulo de massa seca de colmo, em comparação ao tratamento controle não inoculado. Entretanto, um menor acúmulo de massa de colmo foi observado com a inoculação das estirpes: HRC53 e HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae*; BR11329, PRJ50 e 3R-2 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e a mistura HRC54 x PAL5 (Figura 2).

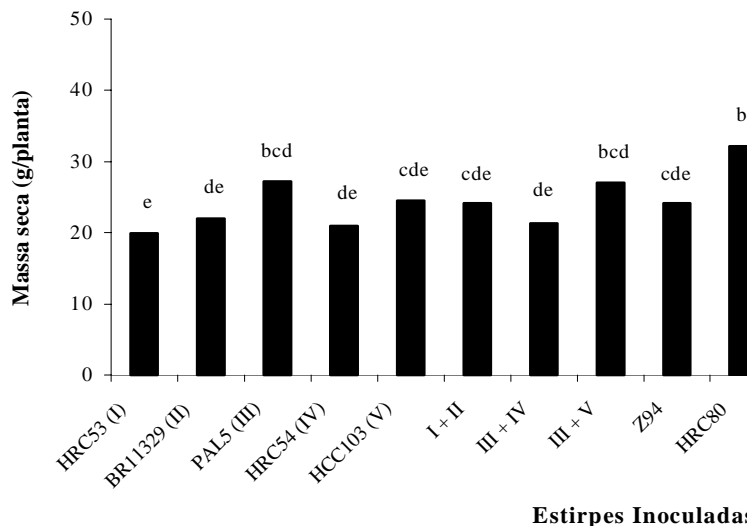


Figura 2 - Efeito da inoculação de diferentes estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas no acúmulo de massa seca de colmo de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade SP 70-1143, 180 dias após a inoculação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,10$). Dados referentes ao 3º experimento.

Oliveira *et al.* (2002) ao inocularem diferentes espécies de bactérias diazotróficas, isoladas e em mistura, em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, observaram que *Herbaspirillum* spp, *A. amazonense* e a combinação de cinco espécies de bactérias apresentaram um aumento significativo no acúmulo de massa fresca de colmos das plantas. Entretanto, a inoculação individualizada da bactéria *G. diazotrophicus* promoveu um efeito negativo no acúmulo de massa fresca de colmos quando comparado com o controle não inoculado. Neste experimento, a avaliação do acúmulo de nitrogênio nos

tecidos das plantas crescidas nos vasos após 180 dias de crescimento, mostrou que as plantas inoculadas com a mistura das estirpes PAL5 x HCC103 e das estirpes individualizadas HRC54, Z94 e CBAmC apresentaram um maior teor de nitrogênio nos tecidos (Figura 3). Por outro lado, a inoculação da estirpe HRC80 proporcionou uma redução no N-total acumulado nos tecidos das plantas em comparação ao controle não inoculado, enquanto que as demais estirpes apresentaram pouco ou nenhum efeito no acúmulo de nitrogênio nas plantas (Figura 3).

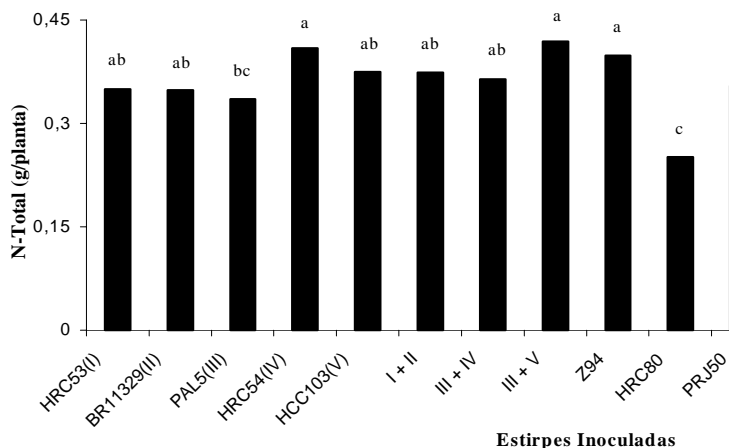


Figura 3- Efeito da inoculação de diferentes estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas no acúmulo de N-total em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade SP 70-1143, 180 dias após a inoculação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,10$). Dados referentes ao 3º experimento.

Foi observada uma elevada variabilidade entre repetições dentro de cada tratamento, e uma heterogeneidade no desenvolvimento das plântulas oriundas da micropropagação. A dificuldade em selecionar plântulas de mesmo tamanho entre as mudas micropropagadas obtidas para o estudo, é um aspecto que prejudica a comparação dos tratamentos testados e seus possíveis efeitos em curto espaço de tempo. Mesmo no experimento em vasos com solo, nem sempre foi possível observar uma redução desta variabilidade e conseqüentemente, a avaliação da contribuição da FBN e de outros mecanismos devidos a inoculação da bactéria podem estar subestimados, conforme já observados por Oliveira *et al.* (2002). Os autores observaram que a inoculação da variedade SP 70-1143 com uma mistura de cinco estirpes de diferentes espécies de bactérias diazotróficas, assim como da inoculação com a mistura de espécies do gênero *Herbaspirillum* foram os tratamentos que apresentaram maior contribuição da FBN (30%).

Os efeitos positivos da inoculação de algumas estirpes de bactérias no crescimento das plantas podem estar associados ao processo de FBN, à síntese de hormônios de crescimento produzidos pelas bactérias ou mesmo a um efeito sinérgico destes fatores atuando nos diferentes estádios de desenvolvimento da planta. Segundo Bashan & Holguin (1997), os fitohormônios, principalmente o ácido indol-acético (AIA) excretados por *Azospirillum*, desempenham papel essencial na promoção de crescimento das plantas em geral.

A FBN em gramíneas tem sido objeto de constante estudo nos últimos anos, porém ainda carece de um conhecimento mais profundo da associação planta/bactéria, visando explorar o potencial da interação em benefício do desenvolvimento da planta e conseqüente aumento de produção. No caso de cana-de-açúcar, as avaliações das contribuições da FBN em condições de campo tem sido na maioria das vezes positiva, porém poucos estudos que envolvam a inoculação de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar com bactérias diazotróficas previamente selecionadas foram realizados. Este estudo procurou utilizar, numa primeira etapa, a metodologia de seleção em vasos de Leonard, seguido da avaliação em vasos com solos para determinar o efeito das estirpes selecionadas no desenvolvimento das plantas. Os resultados mostraram que a resposta a inoculação é bastante variável e parece ser dependente de vários fatores incluindo o genótipo da planta e o ambiente. Portanto, novos estudos devem ser realizados visando aprimorar a metodologia de seleção de estirpes, de modo a definir aquelas que possuem maior potencial para serem usadas comercialmente na inoculação de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos programas PADCT III e PRONEXII/CNPq pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ALVES, B. J. R.; SANTOS, J. C. F.; URQUIARGA, S. BODDEY, R. M. Métodos de determinação do nitrogênio em solo e planta. In: *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Ed.: ARAÚJO, R. S., HUNGRIA, M. Brasília, p. 449-469, 1994.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. *Functional Plant Biology*, v.29, p.417-423, 2002.
- BASHAN, Y. & HOLGUIM, G. *Azospirillum*-planta relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.
- BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R. & URQUIAGA, S. Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugar cane and other grasses. *Australian Journal of Plant Physiology*, v.28, p.889-895, 2001.
- COPERSUCAR 2000. Adubação nitrogenada em cana-planta. *Agrícola Informa*, Centro de Tecnologia Copersucar, v. 115, p.1-2, 2000.
- CARLEY, H. E.; WATSON, R. D. A new gravimetric method for estimating root surface areas. *Soil Science*. v. 102, p. 289-291, 1966.
- DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D. & BALDANI, J. I. *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas em plantas não leguminosas*. Brasília: EMBRAPA – SPI: Itaguai-RJ. EMBRAPA – CNPAB. 60p. 1995.
- GRUZMAN, I; DOBEREINER, J. IN: Anais da IV reunião latino americana sobre inoculantes para leguminosas. Porto Alegre, p. 84, 1968.
- IBGE – Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA, 2003.
- MORAES, V. A; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Efeito da inoculação de *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) variedade SP70-

- 1143, a partir de cultura de meristemas. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, SBM, . p. 215. Rio de Janeiro, 1997.
- OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DOBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂ -fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*, v.242, p. 205-215, 2002.
- ORLANDO-FILHO, J., HAG, H. P., ZAMBELLO, E. JR. Crescimento e absorção de macro nutrientes pela cana-de-açúcar, variedade CB 41-76 em função de idade em solo do Estado de São Paulo. *Bol. Técnico nº 2, 128p.*, Planalsucar, SP, 1980.
- POLIDORO, J. C. *O molibdênio na nutrição nitrogenada e na contribuição da fixação biológica do nitrogênio associada à cultura da cana-de-açúcar*. Seropédica-RJ, UFRRJ, 185 p. *Tese de Doutorado*, 2002.
- REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; OLIVEIRA, A. L. M.; REIS, Jr., F. B.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants with *Acetobacter diazotrophicus*. *Plant and soil*, v. 206, p. 205–211, 1999.
- SAMPAIO, E. V. S. B., SALCEDO I. H., BETTANY, J. Dinâmica de nutrientes em cana-de-açúcar. I – Eficiência na utilização de uréia (¹⁵N) em aplicação única ou parcelada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v.19, p. 943 – 949, 1984.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S. & BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane : Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Sci. Am J.*, v. 56, n.1, p.105-114, 1992.