



## USO DE BACTÉRIAS TOLERANTES A SECA EM MUDAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Raissa Sylvestrin **Stancatte**<sup>1</sup>; Henrique Barros **Vieira**<sup>2</sup>; Danilo Tosta **Souza**<sup>2</sup>; Itamar Soares de **Melo**<sup>3</sup>; Nilza Patrícia **Ramos**<sup>4</sup>

Nº 15422

**RESUMO** – Bactérias não patogênicas associadas à rizosfera podem aumentar a tolerância de plantas a estresse biótico e abiótico. Estas têm sido aplicadas como biofertilizantes podendo mitigar efeitos do estresse hídrico. Neste sentido, o presente trabalho objetivou avaliar o vigor e a tolerância ao estresse hídrico de mudas de cana-de-açúcar inoculadas com *Bacillus* spp. Foram testadas as combinações de 19 variedades comerciais de cana-de-açúcar x 1 tratamento com um isolado de *Bacillus* spp. (BTHE – bactéria tolerante ao estresse hídrico) e 1 testemunha com água (H<sub>2</sub>O). Para a determinação do vigor de mudas determinou-se a biomassa da raiz (g planta<sup>-1</sup> na base seca) sob regime regular de irrigação. Já a tolerância ao estresse hídrico foi determinada pela eficiência relativa entre o tratamento BTHE e a testemunha H<sub>2</sub>O. Utilizou-se a análise de variância e teste de Tukey de médias para a biomassa de raiz e a frequência para eficiência relativa. Observou-se que a biomassa da raiz com BTHE foi em média 7% mais pesada que a testemunha. Houve interação entre variedades e tratamentos, com destaque para CTC9002, RB72454, CTC14, CTC17 e IAC5000 (31, 30, 29, 25 e 10 % mais pesadas que a testemunha). A conversão do vigor de plantas em tolerância a seca foi confirmada após a suspensão total da irrigação, onde sete variedades (40%) com BTHE apresentaram eficiência relativa de 30%. Conclui-se que: há interação entre genótipo e tratamento de mudas de cana-de-açúcar com BTHE. Para interações positivas há incremento no vigor de raízes que se confirma em maior tolerância a seca.

**Palavras-chaves:** déficit hídrico, bactérias, cana-de-açúcar, tolerância a seca.

1 Bolsista Embrapa: graduanda Engenharia Ambiental e Sanitária, PUC, Campinas-SP; ra.sstancatte@gmail.com

2 Eng. Agrônomo – Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP;

3 Co-orientador - Pesquisador Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP;

4 Orientadora - Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP – nilza.ramos@embrapa.br.



**ABSTRACT** - This study aimed to assess the strength and tolerance to water stress of sugarcane seedlings inoculated with *Bacillus* spp. As treatment, combinations of 19 varieties of commercial sugarcane vs. 1 variety isolated with *Bacillus* spp were tested (BTHE – water stress-tolerant bacteria) and 1 control with water (H<sub>2</sub>O). To determine the strength of seedlings the root biomass (g plant-1 on a dry basis) under regular irrigation system was ascertained. The tolerance to water stress was determined by the relative efficiency between BTHE treatment and the H<sub>2</sub>O control. Analysis of variance and Tukey's average test for root biomass and frequency for relative efficiency were used. As a result it was found that the root biomass for plants treated with BTHE were 7% heavier than the control, on average. There was interaction between varieties and treatments, especially for CTC9002, RB72454, CTC14, CTC17 and IAC5000 varieties, which, after treatment with BTHE had roots 31, 30, 29, 25 and 10%, respectively, heavier when compared to control. The change of plants strength in drought tolerance was confirmed after the full suspension of irrigation (severe water stress), where seven varieties (40%) treated with BTHE showed differences to live plants in percentages above 30% when compared to control. In conclusion: there is interaction between genotype and BTHE sugarcane seedlings treatment. For positive interactions there is increase in the force of roots that is confirmed by greater drought tolerance.

**Key-words:** drought, bacteria, sugarcane, drought tolerance.

## 1 INTRODUÇÃO

Em tempos em que o meio ambiente deve ser colocado em primeiro lugar, uma das maiores preocupações é o impacto sobre ele. Lombardo (2009) afirma que as elevadas emissões de Gases de Efeito Estufa podem contribuir com um aumento da temperatura global e interferir na quantidade de precipitação. Essas mudanças climáticas sugerem futuros aumentos de aridez em muitas áreas na Terra e conseqüentemente devem limitar a produtividade agrícola (PINCELLI, 2010).

Neste sentido se faz necessário usar estratégias que auxiliem as plantas na tolerância às mudanças climáticas e entre elas, a seca. A disponibilidade da água para planta é essencial para a maioria dos processos bioquímicos e fisiológicos, pois, desenvolve plântulas e influencia no crescimento de estruturas, nas propriedades das proteínas, nas membranas, nos ácidos nucléicos e nos outros constituintes celulares (BRAY, 1995; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Uma maneira de impedir que a situação de seca seja restrigente quanto à produção, é a utilização de micro-organismos funcionais que desempenham funções ecológicas importantes,



## 9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

como proteção a ação de pragas e doenças, crescimento de material vegetal, fixação de nitrogênio e o auxílio na tolerância a deficiência hídrica. A aplicação destes “ativos biológicos” na agricultura tem mostrado bons resultados, principalmente por possuírem baixo custo e por serem mais sustentáveis. A utilização de bactérias promotoras de tolerância ao estresse hídrico a plantas viabiliza o plantio de cultivares em regiões de clima árido, além de proporcionar uma grande economia de água (KAVAMURA, 2012).

Kavamura (2012) isolou uma espécie de *Bacillus* spp. associada a cacto do bioma Caatinga e observou o diferencial de promover o crescimento de milho sob condições de estresse hídrico. A inoculação da bactéria na rizosfera de milho apresentou incrementos na biomassa da raiz de 28,2% em relação à testemunha. Em base disto, o presente estudo objetivou avaliar o vigor e tolerância ao estresse hídrico de mudas de cana-de-açúcar associadas a um isolado osmotolerante de *Bacillus* spp.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido em casa de vegetação, durante 82 dias entre os meses de setembro e novembro de 2014, na Embrapa Meio Ambiente, situada em Jaguariúna-SP. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 19 x 2, com três repetições; sendo 19 variedades comerciais de cana-de-açúcar (Tabela 1) x 1 tratamento com um isolado de *Bacillus* spp. (BTHE – bactéria tolerante ao estresse hídrico) e 1 testemunha com água (H<sub>2</sub>O).

**Tabela 1.** Variedades comerciais de cana-de-açúcar utilizadas no experimento.

IAC	RIDESA	CTC	
IAC 3396	RB 7515	CTC 02	CTC 20
IAC1099	RB 72454	CTC 04	CTC 25
IAC 5094	RB 935744	CTC 09	CTC 9001
IAC 5000	RB 825211	CTC 14	CTC 9002
	RB 855156	CTC 15	CTC 9003
		CTC 17	

Uma calda bacteriana da linhagem osmotolerante de *Bacillus* spp. previamente isolado a partir de cactos do bioma Caatinga (KAVAMURA et al., 2012) foi preparada no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente. O crescimento bacteriano foi realizado em frascos Erlenmeyer (Figura 1B) com meio de cultivo glicose extrato de levedura (GY) sob agitação constante por três dias. Passado este período, o material foi centrifugado à 25°C a 7000 rpm por 15 min (Figura 1B) para a formação dos pallets (Figura 1C), e a concentração celular foi ajustada em

espectrofotômetro, em densidade ótica de 0,1, com comprimento de onda de 600 nm, utilizando solução salina a 0,85%.



**Figura 1.** Frascos contendo solução nutritiva GY com o *Bacillus* spp (A); centrifugação da solução para formação dos *pellets* (B) e recipiente com o *pellet* (C). (Fotografias da autora Raissa Stancatte – 2014)

Como material vegetal utilizou-se as mudas pré brotadas - MPB (LANDELL et al., 2012), obtidas a partir de mini tolete contendo uma gema viável (Figura 2A), o qual foi cortado, tratado termicamente para evitar raquitismo (água à 50° C por duas horas mantido em estufa à 50° C) e acondicionado em caixas de germinação (40 x 30 x 10 cm) contendo substrato inerte (casca de eucalipto) e estéril (Figura 2B). Após a cobertura das estruturas vegetativas, procedeu-se a irrigação contendo os tratamentos experimentais, ou seja, a BTHE na concentração citada e H<sub>2</sub>O. Feito isto prosseguiu-se com três regas diárias até o transplântio para tubetes de 100 mL (Figura 2C), o qual ocorreu após 16 dias de incubação.

Os tubetes foram preenchidos com o mesmo substrato inerte e estéril e imediatamente após o transplântio das mudas houve nova aplicação dos tratamentos (BTHE e H<sub>2</sub>O) por pulverização, repetida após 5, 7 e 9 dias. Assim como na fase de germinação, continuou-se com as três regas diárias e com uma fertirrigação semanal segundo Landell et al. (2012) para a formação das mudas em seu potencial máximo de vigor. A experimentação em ambiente controlado continuou por mais 67 dias (período ideal para seu transplante para campo), quando parte das mudas foram colhidas para determinação do vigor, e parte (oito plantas de cada tratamento e variedade) foi submetida à suspensão total da irrigação (estresse hídrico rigoroso) por oito dias; suficientes para a morte das plantas sem tolerância a esse estresse.



**Figura 2.** Gema sadia de um mini tolete (A), vista geral das caixas de germinação (B) e da bancada com as mudas brotadas (C), em casa de vegetação da Embrapa Meio Ambiente. (Fotografias da autora Raissa Stancatte - 2014)

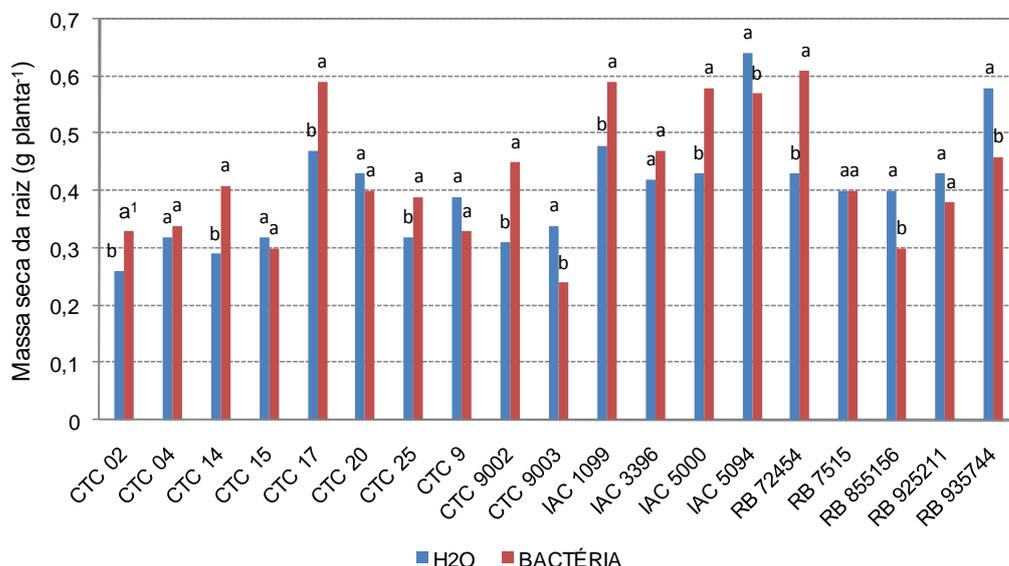
Para a determinação do vigor das mudas foi avaliado a biomassa de raiz ( $\text{g planta}^{-1}$ ), obtida após a separação deste componente da parte aérea da planta individualmente, seguida de lavagem em água corrente, secagem em estufa ( $50^\circ \text{C}$ ) de circulação forçada de ar, até peso constante e pesagem em balança de precisão. Já a tolerância ao estresse hídrico foi quantificada pelo número de plantas vivas após a suspensão da irrigação, utilizado no cálculo da diferença percentual entre plantas vivas tratadas com BTHE e plantas vivas tratadas com  $\text{H}_2\text{O}$ , determinando-se assim a eficiência relativa do BTHE.

Como tratamento estatístico, utilizou-se a análise de variância e o teste de Tukey de médias para a variável biomassa de raiz. A eficiência relativa do BTHE foi analisada por frequência de variedades (estatística descritiva) dentro de cinco classes de resposta ao tratamento ( $<0$ ; 1 a 15; 16 a 30; 31 a 45 e  $> 46\%$ ).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ ) da biomassa de raiz da cana-de-açúcar tanto para os fatores variedade e tratamento analisados individualmente, como para a interação entre eles. Independente da variedade estudada, as plantas tratadas com BTHE apresentaram biomassa de raiz em média 7% mais pesadas que as tratadas com  $\text{H}_2\text{O}$ , indicando um possível efeito promotor de crescimento do isolado de *Bacillus* spp. Já a interação positiva entre fatores (Figura 3) é atribuída às diferenças entre genótipos quanto à rusticidade, precocidade e outras características buscadas no melhoramento genético, que também foi observada por Pereira et al. (2013) ao estudarem genótipos de cana-de-açúcar tratados com bactérias diazotróficas.

O desdobramento da interação entre variedades e tratamento para tolerância a seca (Figura 3) mostrou que sete variedades são indiferentes aos tratamentos (BTHE ou H<sub>2</sub>O), oito respondem positivamente à BTHE e quatro negativamente. As variedades que apresentaram maiores diferenças de biomassa de raiz ao serem tratadas com BTHE foram CTC9002, RB72454, CTC14, CTC17 e IAC5000, com valores 31, 30, 29, 25 e 10 %, respectivamente superiores aos observados na testemunha com H<sub>2</sub>O. Por outro lado, as variedades CTC9003, RB855156, RB935744 e IAC5094 apresentaram resultado inverso, em ordens semelhantes de grandeza, sendo 29, 25, 21 e 11 %, respectivamente, inferiores do BTHE em relação à testemunha. Estes resultados corroboram com a afirmação de Oliveira et al. (2006) de que a inoculação de bactérias responde diferentemente ao genótipo de cana-de-açúcar, mas também ao tipo de solo e ao ambiente.



<sup>1</sup> médias da mesma variedade seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ( $p < 0,01$ )

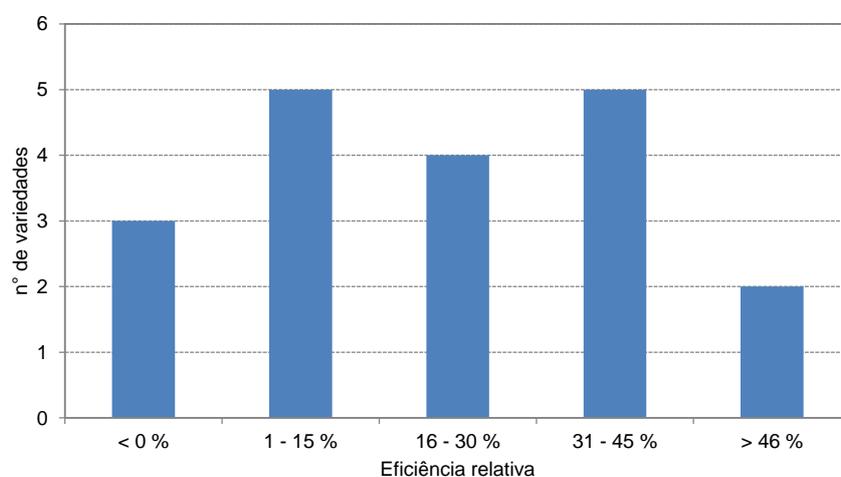
**Figura 3.** Biomassa de raiz de variedades de cana-de-açúcar submetidas ao tratamento com BTHE e testemunha com H<sub>2</sub>O em ensaio sob ambiente controlado, Jaguariúna-SP.

Na Figura 4A, é possível visualizar as raízes da variedade CTC 17 ocupando maior área do substrato no tratamento BTHE em relação à H<sub>2</sub>O, que se reverteu em 25% mais biomassa e conseqüente maior vigor. Também a IAC 5000 apresentou raízes mais vigorosas e espessas (Figura 4B) no tratamento BTHE, por outro lado a Figura 4C, mostra as raízes da variedade RB855156 mais vigorosas e organizadas na testemunha com H<sub>2</sub>O. Urquiaga et al. (1992) afirma que a interação bactéria-planta é totalmente dependente do genótipo utilizado, pois existem genótipos mais rústicos que apresentam associação natural com bactérias dos solos cultivados o que pode dificultar a associação com isolados específicos (BODDEY et al., 2001; SCHUTLZ et al., 2012).



**Figura 4.** Comparação entre raízes dos dois tratamentos em algumas variedades sendo (A) Variedade CTC 17, melhor resultado com bactéria, (B) Variedade IAC 5000, melhor resultado com bactéria e (C) Variedade RB 855156, melhor resultado sem bactéria. (Fotografias de Rebeca Ramos - 2014)

Os resultados da biomassa de raiz até então apresentados comprovam que a BTHE promove o crescimento e conseqüente vigor em oito das 19 variedades estudadas (42%). A conversão deste vigor em tolerância a seca foi confirmada após a suspensão total da irrigação (estresse hídrico rigoroso), onde sete variedades (40%) tratadas com BTHE apresentaram diferenças de plantas vivas em porcentagens acima de 30% em relação à testemunha (Figura 5).



**Figura 5.** Frequência de variedades de cana-de-açúcar distribuídas em cinco classes de eficiência relativa ao tratamento BTHE. Jaguariúna-SP.

A literatura é escassa a respeito de uso de micro-organismos para tolerância a seca em cana-de-açúcar, porém há relatos positivos para outras culturas, como milho (KAVAMURA, 2012) onde houve incrementos na biomassa de raiz na ordem de 28,2% para o tratamento com BTHE em relação à testemunha. Por outro lado também houve efeito deletério de outros isolados corroborando com os resultados deste trabalho e indicando haver alta interação entre genótipo e micro-organismo.



#### 4 CONCLUSÃO

Há interação entre genótipo e tratamento de mudas de cana-de-açúcar com BTHE. Para interações positivas há incremento no vigor de raízes que se confirma em maior tolerância a seca.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 N<sub>2</sub> fixation to grasses and cereals. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, p. 889-895, 2001.

BRAY, C. F. **Biochemical processes during the osmopriming of seeds**. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). Seed development and germination. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 767-789.

KAVAMURA, V. N. **Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga: promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico**. 2012. 246 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2012.

KAVAMURA, V.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L. da; PARMA, M. M.; AVILA, L. A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T. D.; TAKETANI, R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO, I. S. de. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, Jena, v. 168, n. 4, p. 183-191, 2013.

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 Agrônomo, IAC, 2012.

LOMBARDO, M. A. **Análise das mudanças climáticas nas metrópoles: o exemplo de São Paulo e Lisboa**. 2009. 146 f. Tese (Doutorado) - Curso de Geografia Física, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

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 diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 284, n. 1-2, p. 23-32, 2006.

PEREIRA, W.; LEITE, J. M.; HIPÓLITO, G. de S.; SANTOS, C. L. R. dos; REIS, V. M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Revista Ciência Agrônoma**, Fortaleza, v. 44, n. 2, p. 363-370, abr-jun, 2013.

PINCELLI, R. P. **Tolerância à deficiência hídrica em cultivares de cana-de-açúcar avaliada por meio de variáveis morfofisiológicas**. 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2010.

SCHULTZ, N.; MORAIS, R. F. DE; SILVA, J. A. DA; BAPTISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P.; LEITE, J. M.; PEREIRA, W.; JÚNIOR, J. DE B. C.; ALVES, B. J. R.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; CABALLERO, S. S. U.; REIS, V. M. Avaliação agrônoma de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 47, n. 2, p. 261-268, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 56, n. 1, p.105-114, 1992.