

Prospecção de isolados bacterianos para o crescimento e desenvolvimento de missioneira-gigante em sistemas integrados de produção agropecuária⁽¹⁾

Tiago Celso Baldissera⁽²⁾; Cassiano Eduardo Pinto⁽²⁾; Murilo Dalla Costa⁽²⁾; João Frederico Mangrich dos Passos⁽²⁾; Fábio Cervo Garagorry⁽³⁾; Juliana Aparecida Souza⁽⁴⁾

⁽¹⁾Trabalho executado com recursos do Edital MDA/CNPq 2014-8 (Processo CNPq 472977/2014-8)

⁽²⁾Pesquisador; Empresa de Pesquisa e Extensão Rural de Santa Catarina; Estação Experimental de Lages; Lages, SC (tiagobaldissera@epagri.sc.gov.br); ⁽³⁾Pesquisador; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; Centro de Pesquisa Pecuária Sul, Bagé, RS; ⁽⁴⁾Aluna; Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Santa Catarina; Lages, SC.

RESUMO: Os sistemas integrados de produção agropecuária (SIPA) são alternativas viáveis para a produção sustentável. Missioneira-gigante (*Axonopus catharinensis* Valls.) é uma espécie forrageira amplamente utilizada em SIPA onde existe a integração de pastagens e árvores. A inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal podem aumentar a eficiência de produção dessa espécie e de outras forrageiras, garantindo vantagens para o crescimento e desenvolvimento de plantas frente a estresses bióticos e abióticos, como ambientes sombreados ou baixa fertilidade. Foi avaliada a inoculação de 10 isolados bacterianos sobre o crescimento e desenvolvimento da parte aérea e de raízes de missioneira-gigante, além dos tratamentos com inoculante bacteriano comercial de *Azospirillum brasiliense* e um controle sem inoculação. As plantas de missioneira-gigante foram avaliadas em casa de vegetação durante 41 dias. O isolado bacteriano EEL348 teve efeito positivo sobre características de arquitetura de raízes como comprimento e volume. O isolado comercial testado de *Azospirillum brasiliense* e o isolado EEL336 apresentaram efeito negativo em diversas variáveis de crescimento e desenvolvimento avaliadas nas plantas de missioneira-gigante. Avaliações por um período mais prolongado e estudos com condições diferentes de cultivo permitirão analisar a viabilidade de produção de inoculante com base nesse isolado bacteriano.

Termos de indexação: morfogênese, PGPB, sistemas integrados de produção agropecuária

INTRODUÇÃO

Os sistemas integrados de produção agropecuária (SIPA) buscam a produção sustentável utilizando estratégias como a diversificação da produção, aumento do número de espécies no espaço e no tempo e a redução da adubação (Moraes et al., 2014). Um dos modelos de SIPA pode ser definido como integração de pastagens e árvores. Neste sistema, as espécies forrageiras que compõem a pastagem crescem em ambiente com restrição de luminosidade constante, podendo acarretar em alterações na estrutura e produção.

A missioneira-gigante (*Axonopus catharinensis* Valls.) é uma espécie forrageira nativa de Santa Catarina, com boa produção em ambientes sombreados (Pontes et al., 2016). Contudo, comparada a pleno sol, esta espécie apresenta alterações morfológicas em função da sombra (Baldissera et al., 2016). Ainda, em ambientes sombreados, ocorre um maior desenvolvimento da parte aérea, em detrimento ao crescimento de raízes, o que a longo prazo ou ambientes menos férteis, pode reduzir a produção e a persistência da pastagem.

Bactérias promotoras de crescimento vegetal podem estimular o crescimento de plantas associadas e a superação de estresses bióticos e abióticos. A produção de auxinas (ácido indolacético) é comum nessas bactérias do solo, que se associam a plantas, promovendo crescimento do hospedeiro vegetal, sobretudo o desenvolvimento de raízes (Patten & Glick, 2002; Duca et al., 2014). Neste sentido, o uso de inoculantes a base de bactérias produtoras de ácido indolacético (AIA), em plantas em ambiente sombreado, neste caso a missioneira-gigante, pode representar uma boa estratégia para melhorar a produção e a eficiência de sistemas integrados de produção.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento e desenvolvimento de plantas de missioneira-gigante, inoculadas com bactérias produtoras de ácido indolacético, em substrato com baixo nível de fertilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Empresa de Pesquisa e Extensão Rural de Santa Catarina - Estação Experimental de Lages, SC (EEL). As bactérias utilizadas foram provenientes de um banco de 510 isolados pertencentes ao laboratório de biotecnologia da EEL e formados a partir de amostras de solo e raízes em áreas com pastagens de missioneira-gigante sombreadas e a pleno sol. Para a realização do trabalho, foram selecionadas deste banco, 10 bactérias que apresentaram as maiores produções de AIA *in vitro*, determinado de acordo com metodologia descrita por Ambrosini et al. (2012). O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com 12 tratamentos e 6 repetições. Além das bactérias selecionadas para produção de AIA, um tratamento foi estabelecido como controle sem inoculação e em outro foi utilizado o inoculante comercial com as estirpes de *Azospirillum brasiliense* Abv5 e Abv6. A definição dos blocos foi baseada de acordo com a separação visual do tamanho das mudas de missioneira-gigante que apresentavam no mínimo 3 e no máximo 5 folhas.

As mudas de missioneira-gigante foram micropropagadas *in vitro* e aclimatizadas em bandejas alveoladas de isopor com células de 35 mL contendo substrato autoclavado a 121°C por 1 h, duas vezes em intervalo de 24 h, sob condições de sala de crescimento (16 h de fotoperíodo). Após 4 semanas, no dia 14/09/2016, as mudas foram transplantadas para potes de 1,7 litros, em um substrato composto de areia e vermiculita (1:1, v/v). Durante o período experimental foi aplicada solução nutritiva completa (Hogland & Arnon, 1950) diluída a 20%. A inoculação das plantas com as bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB) foi realizada duas vezes, nos dias 17 e 21/09/2016, cada aplicação foi de 10 mL de suspensão bacteriana na região do colo da planta.

As avaliações morfogênicas foram realizadas no perfilho principal entre o período de 20/09/2016 e 31/10/2016, totalizando 12 avaliações a cada 3-4 dias. Foram registrados os seguintes parâmetros: filocrono; taxa de alongação foliar; duração da alongação foliar; duração de vida de folha; taxa de alongação de colmo; e taxa de senescência foliar. Essas variáveis são expressas em tempo térmico, graus-dia (C°d). Durante o período experimental a temperatura foi medida a cada 5 minutos com a utilização de dois dataloggers individuais (Hobbo®). O tempo térmico foi calculado utilizando a temperatura média diária menos a temperatura base (10°C).

Nos dias 02 e 03 de novembro de 2016, as plantas foram coletadas e segmentadas em parte aérea e raízes. Foi determinado a área foliar com a utilização do equipamento da LICOR®, modelo LI 3100. Após lavadas, as raízes foram acondicionadas em álcool 50% e mantidas a 4° C para posterior análise. Com a utilização do equipamento WinRhizo™, foi determinado parâmetros de arquitetura das raízes: comprimento (cm); volume (cm³); relação comprimento/volume (cm/cm³); diâmetro médio (mm); e bifurcações.

Após a realização das avaliações de parte aérea e raízes, as amostras foram secas em estufa com circulação de ar forçado a 60° C até atingirem peso constante e então pesadas. Foram calculadas a massa de folhas, de colmos e de raízes, além da área foliar específica.

Foi realizada a análise de variância clássica (teste F). Foram verificadas as pressuposições de homogeneidade de variância (teste de Bartlett), normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk) sendo utilizada a transformação ótima de Box-Cox nos casos em que alguma das pressuposições não ter sido atendida. As médias foram comparadas utilizando o método de menor diferença significativa (LSD). Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software R (R Core Team, 2016) considerando 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os parâmetros avaliados na parte aérea, houve efeito da inoculação de isolados bacterianos na massa seca da parte aérea e massa seca de folhas, taxa de alongação foliar ($\text{cm C}^{\circ}\text{d}^{-1}$) e duração da alongação foliar ($\text{cm C}^{\circ}\text{d}^{-1}$), $p < 0,03$. Contudo, não houve efeito positivo das bactérias sobre essas variáveis, quando comparadas ao controle conforme mostra a análise de Tukey (Tabela 1).

Houve redução da produção de massa seca e taxa de alongação foliar em relação ao controle nas plantas que foram inoculadas com o isolado EEL336 e *Azospirillum brasiliense* (Tabela 1). As PGPBs competem por nutrientes e ocupam e persistem nos nichos ecológicos encontrados nas raízes das plantas, podendo resultar em impacto negativo no hospedeiro (Antoun, 2013).

Neste experimento foi utilizada uma baixa quantidade de nutrientes para avaliar a resposta das plantas inoculadas com bactérias e o potencial dessas como promotoras de crescimento em ambientes de baixa fertilidade. Os resultados indicam que é importante avaliar um número maior de isolados para selecionar combinações específicas de bactérias e missioneira-gigante com maior desempenho agrônômico. Além disso, é importante compreender as rotas metabólicas utilizadas pelas bactérias na produção de AIA e de outros tipos de compostos, que poderiam inibir o desenvolvimento da planta (Patten & Glick, 2002).

Tabela 1 – Comprimento de raízes (cm), volume de raízes (cm^3), bifurcações de raízes, massa seca da parte aérea (g) e taxa de alongação foliar ($\text{cm C}^{\circ}\text{d}^{-1}$) de *Axonopus catharinensis* Valls. inoculadas com bactérias produtoras de ácido indolacético e *Azospirillum brasiliense*.

Bactéria	Comprimento Raízes (cm)	Volume Raízes (cm^3)	Bifurcações de raízes	Massa seca parte aérea (g)	Taxa de Alongação o Foliar ($\text{cm C}^{\circ}\text{d}^{-1}$)
EEL348	4111,2 a	4367,4 a	21651,7 a	1,08 a	0,028 ab
EEL114	3457,3 ab	4003,5 ab	18446,7 ab	1,07 a	0,028 ab
EEL237	3423,4 ab	3427,3 abcd	18503,7 ab	1,02 a	0,029 a
EEL335	3108,7 bc	3633,1 abc	16868,0 abc	0,97 ab	0,025 abc
EEL320	3077,4 bc	3042,6 bcd	16367,0 abc	0,87 ab	0,025 abc
EEL238	3069,1 bc	3474,0 abcd	16005,3 bc	0,91 ab	0,028 ab
EEL242	2969,0 bc	3026,8 bcd	15030,0 bcd	0,81 ab	0,025 abc
EEL249	2924,8 bc	3028,6 bcd	16038,7 bc	0,75 ab	0,023 abc
EEL333	2868,8 bc	2875,5 cd	14451,0 bcd	0,87 ab	0,025 abc
Controle	2821,8 bc	3274,8 bcd	15036,8 bcd	1,05 a	0,027 ab
EEL336	2381,7 cd	2539,3 de	12311,6 cd	0,62 b	0,021 c
<i>Azospirillum</i>	1908,8 d	1870,1 e	10234,0 d	0,63 b	0,021 c

Médias seguidas da mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de menor diferença significativa ($p < 0,05$)

O isolado bacteriano EEL348 não apresentou efeito na produção de massa seca da parte aérea (Tabela 1) e de raízes ($p=0,23$), mas teve impacto na arquitetura radicular, alterando a estrutura de raízes, aumentando o comprimento, volume e bifurcações (Tabela 1). Este resultado pode ser importante para plantas em situações de estresse, como por exemplo em condições de restrição hídrica, possibilitando a planta a explorar zonas mais profundas do solo (Carlesso, 1995).

A longo pra, esses resultados podem significar maior produção e persistência da pastagem. Deste modo, são necessários outros experimentos, por período mais prolongado, para testar a eficiência do isolado EEL348 sobre o crescimento e desenvolvimento de missioneira-gigante, assim como o sequenciamento genético para identificação dessa espécie bacteriana. Essas informações auxiliarão no desenvolvimento de um possível inoculante.

CONCLUSÕES

Dentre os isolados bacterianos selecionadas com alta produção *in vitro* de ácido indolacético, o isolado EEL348 apresentou efeito benéfico sobre parâmetros de arquitetura de raízes, como comprimento, volume e bifurcações. O isolado comercial testado de *Azospirillum brasiliense* e o isolado EEL336 apresentaram efeito negativo em diversas variáveis de crescimento e desenvolvimento avaliadas nas plantas de missioneira-gigante.

REFERÊNCIAS

AMBROSINI, A., BENEDUZI, A., STEFANSKI T., PINHEIRO, F. G., VARGAS, L. K. and PASSAGLIA, L. M. P. Screening of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Soil*, 356:245-264, 2012.

ANTOUN, H. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, v.3, p.1477-1480, 2013.

BALDISSERA, T.C.; PONTES, L.S.; GIOSTRI, A.F. et al. Sward structure and relationship between canopy height and light interception for tropical C4 grasses growing under trees. *Crop & Pasture Science*, v. 67, n. 11, p. 1199-1207, 2016.

CARLESSO, R. Absorção de água pelas plantas: água disponível versus extraível e a produtividade das culturas. *Ciência Rural*, v.25, n.1, p.183-188, 1995.

DUCA, D.; LORV, J.; PATTEN, C.L.; ROSE, D.; Glick, B.R. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 106, n. 1, p. 85-125, 2014.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p., 1950.

MORAES, A.; CARVALHO, P.C.F.; LUSTOSA, S.B.C.; LANG, C.R.; DEISS, L. Research on integrated crop-livestock systems in Brazil. *Revista Ciências Agronômica*, v.45, p.1024-1031, 2014.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant System. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.8, p.3795-3801, 2002.

PONTES, L.S.; GIOSTRI, A.F.; BALDISSERA, T.C. et al. Interactive effects of trees and nitrogen supply on the agronomic characteristics of warm-climate grasses. *Agronomy Journal*, v. 108, n. 4, p.1-11, 2016.