

Avaliação de promotores de crescimento microbianos em plântulas de milho crescidas em solução nutritiva

Claudina Luiz da Conceição², Daniele Luiz Andrade³, Chainheny Carvalho⁴, Vitória Palhares⁵, Natanael Tavares de Oliveira⁶, Fernanda de Cássia Batista⁴, Christiane Abreu de Oliveira Paiva⁷, Ivanildo Evódio Marriel⁷, Eliane Aparecida Gomes⁷, Uiraci Gomes de Paula Lana⁷, Sylvia Morais de Sousa⁷

¹ Trabalho financiado pelo CNPq/Fapemig; ² Estudante da Escola Técnica Municipal de Sete Lagoas (ETMSL), Bolsista BIC Jr. Do Convênio Fapemig/CNPq/EMBRAPA/FAPED; ³ Estudante de Mestrado Profissional do Centro Universitário de Sete Lagoas (UNIFEMM); ⁴ Estudante de Graduação do Centro Universitário de Sete Lagoas (UNIFEMM); ⁵ Estudante de Mestrado da Universidade Federal de São João del Rei (UFSJ); ⁶ Estudante de Doutorado da Universidade Federal de São João del Rei (UFSJ)
⁷ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

Introdução

O milho (*Zea mays*) é cultivado em todo o mundo, sendo os Estados Unidos, a China e o Brasil os três maiores produtores do grão no mundo (RANUM et al., 2014). Esse cereal é um dos mais cultivados no Brasil, sendo que na safra 2015/2016 foram produzidos 66,57 milhões de toneladas que foram cultivadas em 15,92 milhões de hectares (CONAB, 2017). A cultura do milho tem alto potencial produtivo e alto valor nutricional e a maior parte da produção mundial desse grão (70 a 85%) é destinada a fabricação de ração animal e cerca de 15% são utilizados como matéria-prima para alimentação humana, incluindo edulcorantes, óleos, bebidas, dentre outros. Além disso, é utilizado pela indústria de alta tecnologia para produção filmes, embalagens biodegradáveis e biocombustível (PAES, 2006; RANUM et al., 2014). Diante desse cenário, a cada ano, novas tecnologias são desenvolvidas visando o aumento da produtividade do milho, como sementes melhoradas, herbicidas, fungicidas e promotores de crescimento vegetal, também conhecido como bioestimulantes (SANTOS et al., 2014).

Os inoculantes microbianos são considerados bioestimulantes e podem ser aplicados nas sementes, direto na planta ou na rizosfera, dessa forma, estimulam o crescimento do vegetal por diferentes mecanismos, tais como aumento da divisão celular e alongamento das células (CALVO et al., 2014). Os inoculantes microbianos são obtidos a partir de bactérias e fungos, isolados de vários ambientes, como solo, planta, resíduos vegetais, água e adubos orgânicos (BASHAN et al., 2014; CALVO et al., 2014).

A indústria de biofertilizantes é um mercado em expansão com crescimento estimado de 14,8% e que movimentará US\$ 1,88 bilhão até 2020, em razão da uma crescente demanda por insumos mais sustentáveis na produção agrícola, segundo a pesquisa realizada em 2016 pela Thinkstock (marketsandmarkets.com). Atualmente, o mercado de biofertilizantes é dominado por empresas como a Novozymes (Dinamarca), National Fertilizers Limited (Índia), Madras Fertilizers Limited (Índia), Gujarat State Fertilizers & Chemicals Ltda. (Índia) e Rizobacter Argentina SA (Argentina). No Brasil a indústria de biofertilizantes desenvolve novos produtos de valor agregado, em

conjunto com universidades públicas e privadas e consultorias credenciadas pelo Mapa, no entanto multinacionais que atuam no ramo de nutrição e fisiologia de plantas exploram esse mercado trazendo produtos de seus países de origem, sendo nesse contexto fundamental a pesquisa biotecnológica para sermos detentores de produtos com especificidade e qualidade nacionais, adequados ao nosso clima e solo.

A associação com bactérias do gênero *Azospirillum ssp.* têm se mostrado promissora em várias partes do mundo inclusive no Brasil (ALVES, 2007; HUNGRIA et al., 2013). Esse microrganismo é capaz de produzir diversos tipos de fitormônios tais como as auxinas, que estão envolvidas na expansão celular, citocininas, que atuam no processo de divisão das células, giberelinas, substâncias responsáveis por promover germinação, alongamento do caule, floração e frutificação, além dos fitormônios, ácido abscísico e ácido jasmônico que conferem tolerância a vários de tipos estresses bióticos e abióticos, de forma indireta atuando na otimização do crescimento vegetal (CASSÁN et al., 2014).

Para o desenvolvimento de um inoculante microbiano é necessário encontrar a melhor cepa de bactérias ou um consórcio microbiano que irá conferir o efeito desejado na cultura alvo (BASHAN et al., 2014). Diante dessas informações, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de seis inoculantes microbianos em plântulas de milho crescidas em solução nutritiva.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido na Câmara de Crescimento da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas, Minas Gerais. Foram selecionados microrganismos promotores de crescimento do banco de Microrganismo da Embrapa Milho e Sorgo (Tabela 1) e um genótipo de milho L521236/CMSM036 do programa de melhoramento.

Tabela 1. Microrganismos usados nos tratamentos e sua respectiva concentração.

Tratamento	Tratamento*	Concentração de Células (mL ⁻¹)
1	Controle (solução salina)	0
2	B1 (MSP rizosférica)	10 ⁷
3	AZO1	10 ⁷
4	B2 (MSP endofítica)	10 ⁷
5	AZO2	10 ⁷
6	AZO3	10 ⁷
7	Inoculante comercial @Simbiose MAÍZ	10 ⁷

*MSP = microrganismo solubilizador de fosfato (*Bacillus sp.*), AZO = *Azospirillum*.

Os microrganismos foram crescidos em meio de cultura TSB (*Tryptic Soy Broth*) líquido por três dias a 28 °C, sob agitação. Após o período de incubação, as culturas foram centrifugadas por 10 minutos, a 6000 RPM. As suspensões bacterianas foram ajustadas à absorbância igual ou superior a 1, em comprimento de onda de 550 nm, com a finalidade de obter-se aproximadamente 10⁷ células mL⁻¹. A solução contendo os microrganismos suspensos foram incorporadas a 2,0 L⁻¹ de solução salina a

concentração de 0,85% (OLIVEIRA et al., 2013).

As sementes de milho foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 0,5% por cinco minutos, lavadas e embebidas durante quatro horas em água deionizada e germinadas em papel de germinação em câmara de crescimento. Após a germinação das sementes por quatro dias, plântulas uniformes foram transplantadas para sete bandejas contendo oito litros de solução nutritiva Hoagland meia força pH 5,65 (LIU et al., 1998) cada uma e mantidas para aclimatação por sete dias. Após a aclimatação as plântulas foram deixadas por seis horas a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) na suspensão bacteriana. As plântulas com os inóculos foram agitadas manualmente em intervalos frequentes para facilitar o contato da bactéria com as raízes. Após o período de incubação, o excesso de inóculo foi retirado e as plântulas foram recolocadas em solução nutritiva nas mesmas condições anteriores. A bandeja com as plantas controle foram incubadas apenas em solução salina 0,85%. A solução nutritiva foi trocada a cada três dias e as plantas foram mantidas em câmara de crescimento sob condições controladas de temperatura luminosidade e aeração por mais sete dias.

O sistema radicular foi separado da parte aérea e foi fotografado com uma câmera digital (Nikon D300S SLR). As imagens obtidas foram analisadas com o auxílio dos softwares RootReader2D e WinRhizo v. 4.0 (Régent Systems, Quebec, Canadá), sendo quantificadas diversas características de morfologia radicular, como comprimento radicular total (cm), área de superfície total (cm²), área de superfície de raízes entre 0-1 mm, 1-2 mm e maiores do que 2 mm (cm²) e o peso seco total (g) (SOUSA et al., 2012).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições com cinco plantas cada. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa computacional SISVAR versão 5.4 (FERREIRA, 2011) e as médias, comparadas pelo teste LSD ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

A análise de variância mostrou que houve diferença significativa para as características, comprimento radicular total, área de superfície total, área de superfície raízes com diâmetro entre 0 a 1,0 mm e 1,0 a 2,0 mm e peso seco total (Tabela 2). O coeficiente de variação (CV) foi de baixo a médio (Tabela 2), semelhante a outros experimentos realizados com a mesma metodologia (SOUSA et al., 2016), indicando baixa dispersão dos dados. O tratamento 3, contendo uma cepa de *Azospirillum brasilensis* apresentou diferença significativa para comprimento radicular, área de superfície total, área de superfície de 0-1 mm e de 1-2 mm e peso seco total, apresentando o melhor resultado como promotor de crescimento (Figura 1). Os tratamentos 4 e 7, microrganismo solubilizador e inoculante comercial de *A. brasilensis*, respectivamente, apresentaram um aumento significativo da área de superfície total e de raízes com diâmetro entre 1-2 mm (Figura 1). O tratamento 6, também *A. brasilensis*, apresentou uma diferença significativa em relação ao controle para área de superfície de raízes com diâmetro entre 1-2 mm e maiores do que 2 mm. Os tratamentos 2 e 5 não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. Os resultados indicaram que pelo menos três inóculos microbianos, incluindo dois do Banco de Microrganismos e um comercial tem potencial de uso como promotores de crescimento.

Tabela 2. Resumo da análise de variância para características radiculares e peso seco de plântulas de milho avaliadas sob efeito dos inóculos microbianos após 7 dias de tratamento. Comprimento radicular total (CTR) (cm), área de superfície radicular total

(AST) (cm²), área de superfície de raízes com diâmetro entre 0 e 1,0 mm (AS1) (cm²), área de superfície de raízes com diâmetro entre 1,0 e 2,0 mm (AS2) (cm²), área de superfície de raízes com diâmetro entre (AS3) (cm²), peso seco total (PST) (g).

FV	GL	Quadrado Médio					
		CTR	AST	AS1	AS2	AS3	PST
Tratamento	6	15157,33**	1617,48**	255,42*	362,58**	7,99 ^{ns}	0,0012*
erro	14	2276,32	285,36	85,42	76,97	13,2	0,00080
Total	20	127249,62	13700,03	2728,56	3253,23	23	0,0003
CV %		12,82	11,15	21,18	12,87	18,23	9,18
Média Geral		397,35	151,45	44	68	30,63	0,21

ns não significativo, * significativo a 5% e ** significativo a 0,01 % de probabilidade pelo teste F.

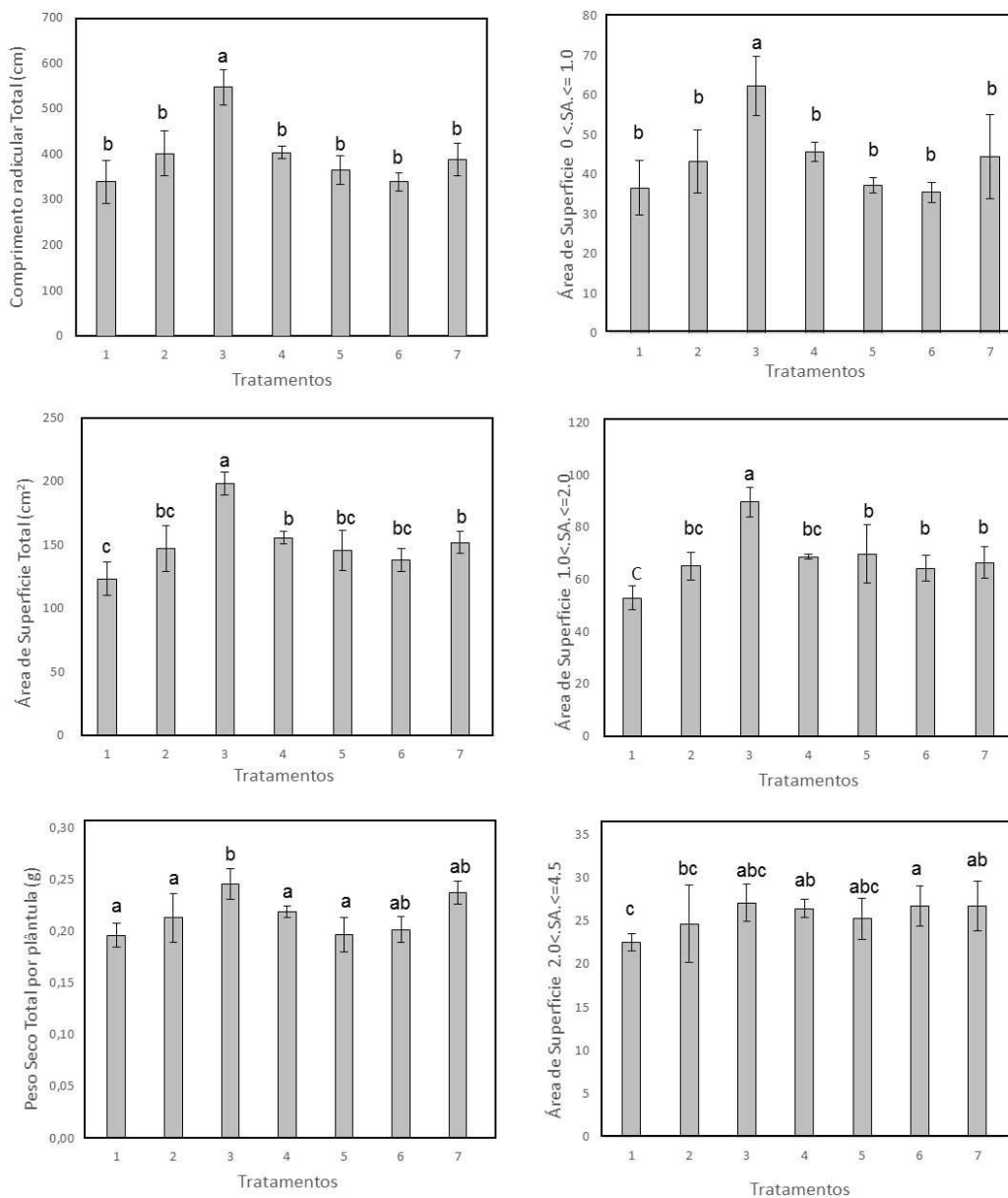


Figura 1. Características radiculares e peso seco total de plântulas de milho após sete dias de tratamento. As barras com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste LSD ($p < 0,05$). 1- Controle (solução salina), 2- B1 (MSP rizosférica), 3- AZO1, 4-

B2 (MSP endofítica), 5- AZO2, 6- AZO3 e 7- Inoculante comercial ®Simbiose MAÍZ.

Conclusão

Inóculos microbianos induziram o aumento da superfície radicular e do peso seco total, especialmente *Azospirillum brasiliensis*, e têm potencial uso como promotores de crescimento.

Referências

ALVES, G. C. **Efeito da inoculação de bactérias dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do milho**. 2007. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ J. P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology-formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant and Soil**, The Hague, v. 378, n. 1/2, p. 1-33, 2014.

CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 383, n. 1/2, p. 3-41, 2014.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 33, n. 2, p. 440-459, 2014.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília, DF, 2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_01_11_11_30_39_boletim_graos_ja_neiro_2017.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2016.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C.; MERCANTE, F. M. **A fixação biológica do nitrogênio como tecnologia de baixa emissão de carbono para as culturas do feijoeiro e soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 24 p. (Embrapa Soja. Documentos, 337).

LIU, C.; MUCHHAL, U. S.; UTHAPPA, M.; KONONOWICZ, A. K.; RAGHOTHAMA, K. G. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissue by phosphorus. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 116, n. 1, p. 91-99, 1998.

OLIVEIRA, C. A.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; MATTOS, B. B.; SANTOS, F. C.; OLIVEIRA, M. C.; ALVES, V. M. C. **Metodologia de aplicação de microrganismos solubilizadores de fósforo em sementes visando melhor aproveitamento deste nutriente pelas plantas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. 29 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 88).

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 6 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 75).

RANUM, P.; PEÑA-ROSAS, J. P.; GARCIA-CASAL, M. N. Global maize production, utilization, and consumption. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1312, n. 1, p. 105-112, 2014.

SANTOS, V. M. dos; MELO, A. V. de; CARDOSO, D. P.; GONÇALVES, A. H.; VARANDA, M. A. F.; TAUBINGER, M. Uso de bioestimulantes no crescimento de plantas de *Zea mays* L. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 12, n. 3, p. 307-318, 2014.

SOUSA, S. M. de; CLARK, R. T.; MENDES, F. F.; OLIVEIRA, A. C. de; VASCONCELOS, M. J. V. de; PARENTONI, S. N.; KOCHIAN, L. V.; GUIMARAES, C. T.; MAGALHAES, J. V. A role for root morphology and related candidate genes in P acquisition efficiency in maize. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 39, n. 11, p. 925-935, 2012.

SOUSA, S. M. de; OLIVEIRA, C. A. de; GOMES, E. A.; LANA, U. G. de P.; SANTOS, N. G.; OLIVEIRA, L. B.; BATISTA, F. de C. Avaliação de plântulas de milho em solução nutritiva sob a ação de bioestimulantes à base de microrganismos. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 31., 2016, Bento Gonçalves. **Milho e sorgo: inovações, mercados e segurança alimentar: anais**. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2016.