



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA

JOSÉ CLEITON SANTOS DA SILVA

RIZÓBIOS EM RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADA EM  
PERNAMBUCO

Recife

2021

JOSÉ CLEITON SANTOS DA SILVA

RIZÓBIOS EM RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADA EM  
PERNAMBUCO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Curso de bacharelado em agronomia da  
Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
como requisito parcial para obtenção do título  
de engenheiro agrônomo.

Orientador (a): Ana Dolores Santiago de  
Freitas

Recife  
2021

## RESUMO

De extrema importância para a agricultura, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) reduz o uso de adubos nitrogenados, pela associação com bactérias capazes de quebrar a tripla ligação que une os dois átomos de nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ), transformando-o em amônia, que é assimilável pelas plantas. Conhecidas como diazotróficas, essas bactérias podem estar localizadas na região rizosférica ou dentro dos tecidos das raízes, colmos e folhas das plantas (bactérias endofíticas). Os rizóbios são bactérias conhecidas por infectar raízes de leguminosas, formando nódulos onde fixam o N atmosférico de maneira mais eficiente que as bactérias que colonizam as gramíneas. O objetivo deste trabalho foi avaliar aspectos biométricos da cana inoculada com rizóbios em casa de vegetação.

## 1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma Poácea originária do continente asiático. Gramíneas de sistema fotossintético C4 evoluíram primariamente nos trópicos e se adaptaram a elevadas intensidades luminosas e altas temperaturas. A cana é hoje considerada uma planta de uso múltiplo, pois permite a produção de matérias primas não só para a produção de açúcar como também de álcool anidro e hidratado, bagaço para geração de energia, plásticos biodegradáveis, etc. Pelo seu alto valor agregado, movimenta indústrias cada vez mais eficientes no uso de energia e tecnologias, além de gerar subprodutos que podem ser utilizados na fertilização de suas áreas agrícolas, tais como a torta de filtro e a vinhaça. Atualmente, a produtividade média da cultura da cana-de-açúcar no Brasil está por volta de 73,15 toneladas de colmos frescos por hectare e a adição média de fertilizantes nitrogenados é de 60 kg de nitrogênio por hectare (CONAB, 2021).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) reduz o uso de adubos nitrogenados, pela associação com bactérias capazes de quebrar a tripla ligação que une os dois átomos de nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ), transformando-o em amônia, que é assimilável pelas plantas. Conhecidas como diazotróficas, essas bactérias podem estar localizadas na região rizosférica ou dentro dos tecidos das raízes, colmos e folhas das plantas (bactérias endofíticas) (THAWEENUT et al., 2011; FISCHER et al., 2012).

Nos últimos anos, estudos sugeriram que bactérias, principalmente dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (coletivamente chamados de (brady)rizóbios nesta proposta), poderiam ser responsáveis por uma parte importante da FBN associada à cana-de-açúcar, embora membros do gênero *Bradyrhizobium* nunca tenham sido isolados desta cultura (ANDO et al. 2005; THAWEENUT et al., 2011; BURBANO et al., 2011; FISCHER et al., 2012). Um estudo mais recente avaliou o microbioma bacteriano e fúngico associado a plantas de cana-de-açúcar no Brasil e confirmou que a ordem Rhizobiales (que engloba os gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*) representa uma parte considerável da população microbiana associada à cultura (SOUZA et al., 2016).

Os resultados obtidos até o momento sugerem que (brady)rizóbios e outras bactérias não nodulantes filogeneticamente relacionadas com eles representam um grupo de microorganismos com potencial para ser melhor estudado no sentido da sua aplicação para culturas da família Poaceae, como a cana-de-açúcar. Com base nisso, estratégias novas de cultivo para isolamento de (brady)rizóbios de cana-de-açúcar foram aplicadas, o que culminou na obtenção de uma coleção diversa de isolados de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* de raízes de cana-de-açúcar cultivada na área experimental da Embrapa Agrobiologia (ROUWS et al. 2014).

Para que se possa obter uma alta produtividade de cana no campo é necessário um alto volume de mudas e um aumento no uso de máquinas para plantio, manejo e colheita. Na mesma proporção que isso se intensifica no campo, a ocorrência de falhas se torna mais frequente, aumentando o risco de difusão de pragas e doenças e potencializando a competição por água e nutrientes em áreas comerciais (LANDELL et al. 2012). Para que o setor se mantenha produtivo, é necessário inovar e buscar alternativas que aumentem a produtividade e a longevidade dos canaviais, porém que reduza os custos. A partir destas necessidades surgiu um novo sistema de produção de mudas prébrotadas (MPB) de cana-de-açúcar, desenvolvido pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), que consiste em brotar mini-toletes com gemas, extraídos de colmos-semente, provenientes de viveiros base com plantas de 6 a 10 meses de idade. Segundo LANDELL et al. (2013), MPB de cana-de-açúcar é um sistema de multiplicação que contribuirá para a rápida produção de mudas, associando elevado padrão de fitossanidade, vigor e uniformidade de plantio. Esse sistema melhora a uniformidade nas linhas de plantio e, conseqüentemente, a redução de falhas, por conta da padronização das mudas em viveiros comerciais.

## 2. OBJETIVOS

### GERAL

Estudar populações de rizóbios em raízes de cana-de-açúcar cultivada em consórcio com leguminosas, por meio de isolamento utilizando leguminosas como planta isca.

### ESPECÍFICOS

- Isolar rizóbios de raiz de cana, por meio do uso de plantas iscas;
- Avaliar a capacidade de rizóbios de promover o crescimento de mudas de cana-de-açúcar obtidas por meio da utilização de mudas pré-brotadas (MPB).

## 3. METODOLOGIA

### Coleta de cana-de-açúcar cultivada em consórcio com leguminosas

Amostragens de tecido vegetal foram realizadas em região produtora de cana-de-açúcar na Estação Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina (EECAC), localizada no município de Carpina, região da Mata Norte de Pernambuco. O clima de acordo com a classificação de Koppen é do tipo “As” (tropical com estação seca de verão). A cana de variedade RB 92579 foi cultivada em um sistema de consórcio com leguminosas de grãos e utilizando como sementes rebolos com três gemas. O experimento foi conduzido em esquema fatorial 4x2, utilizando um delineamento em blocos casualizados com quatro repetições. O primeiro fator correspondeu aos tratamentos de plantio da cana-de-açúcar após o cultivo de 3 espécies de leguminosas (feijão-caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., variedade IPA 207; amendoim, *Arachis hypogaea* L., variedade BR1 e soja, *Glycine max* (L.) Merr., variedade Monsoy 8349 mais um controle sem cultivo prévio de leguminosa. O segundo fator corresponde à adubação nitrogenada, sendo um com N (adubação padrão) e outro sem N. A parcela experimental corresponde a uma área de 60 m<sup>2</sup> com 6 m de largura e 10 m de comprimento, sendo a área útil delimitada excluindo 1 m de cada extremidade da parcela. O

espaçamento adotado para o cultivo da cana foi de 1 m entre fileiras e as leguminosas foram semeadas utilizando os espaçamentos recomendados para cada cultura.

O corte definitivo das leguminosas foi feito ao fim do ciclo de cada espécie (feijão caupi: 50-55 dias; amendoim: 90-100 dias e soja: 120 dias após o plantio), sendo a palhada deixada sobre o solo e os grãos retirados. Foram coletadas raízes brancas não-lignificadas (ou shoot-roots, (SMITH et al., 2005) de plantas de cana-de-açúcar jovens (5 a 6 meses) da variedade RB 92579. Foram coletadas as raízes de 3 plantas para compor a amostra composta de cada parcela.

Pedaços de raiz não danificados foram cuidadosamente lavados com água corrente para remover todo o solo aderente e depois desinfestados superficialmente por imersão sequencial em etanol a 70% por 30s, seguido de incubação em água sanitária comercial não diluída (2,5% de hipoclorito) sob agitação suave por oito minutos. Depois as raízes foram lavadas seis vezes com água estéril.

Extratos de raiz foram obtidos pela maceração de raízes em pistilo e gral estéreis de uma amostra 1g de massa com um volume de solução salina (0,85% NaCl) de 5 ml. Após a maceração, foram realizados os isolamentos usando feijão caupi, amendoim e soja como planta isca.



Figura 01: Coleta (A) e maceração (B) das raízes de cana-de-açúcar

Antes da semeadura, as sementes foram desinfestadas superficialmente por imersão em etanol (70%) por 30s e depois usando solução de hipoclorito (2,5%) por 3 min. Plântulas de leguminosas sem contaminação aparente foram transferidas para tubos de 50 ml com solução de Norris agarizada (25 mL/tubo) inclinada e inoculadas com alíquotas de 1 ml da suspensão de raiz de cana-de-açúcar. Os controles negativos receberam solução salina estéril

e o positivo foi inoculado com uma suspensão de uma estirpe reconhecidamente eficaz para a nodulação de cada leguminosa. As plantas foram cultivadas em temperatura ambiente com 12 horas de luz natural por dia e após 35 dias foi analisada a nodulação.

Os nódulos foram coletados e desinfestados superficialmente por imersão em etanol (70%) por 2 min, seguido de tratamento com solução de hipoclorito (2,5%) por três minutos. Após lavagem rigorosa com água estéril, os nódulos foram esmagados em placas e a suspensão obtida espalhada em placas de petri com meio YMA (vermelho congo) e então incubadas a 28 ° C. Nódulos obtidos durante o processo foram transferidos e incubados por um período de 10 dias para placas de Petri contendo meio YMA com azul de bromotimol como indicador de Ph, sendo o aparecimento de colônias monitorado diariamente.

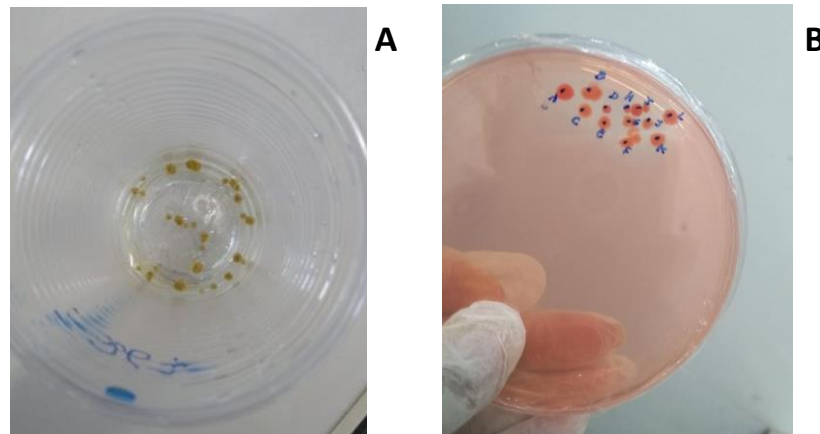


Figura 2: Desinfestação de nódulos (A) e Isolamento de colônias em placas de Petri (B)

Todos os isolados obtidos foram autenticados para confirmação da nodulação. Foi feita uma diluição seriada dos isolados, para garantia de culturas puras de rizóbios.

#### Montagem de experimento em casa de vegetação

Foi montado um experimento em casa de vegetação da Universidade Federal Rural de Pernambuco, utilizando em tubetes de 180 cm<sup>3</sup>, preenchidos com substrato inerte autoclavado (areia e vermiculita na proporção de 2:1). As mudas de cana-de-açúcar foram obtidas pelo sistema de multiplicação de mudas pré-brotadas (MPB), sugerido por Landell et al. (2012). Minirrebolos, extraídos por guilhotina em tamanhos semelhantes para garantir uma melhor padronização das mudas serão acondicionados em caixas de brotação contendo o mesmo substrato inerte autoclavado e colocados em casa de vegetação por, aproximadamente, 15 dias.



Figura 3: Montagem de mini rebolos em caixa de brotação (A); mudas de cana com 17 dias (B)

O experimento teve delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições e 22 tratamentos (inoculação com 20 isolados de rizóbios provenientes da raiz de cana-de-açúcar cultivada em consórcio com feijão-caupi, e dois tratamentos controle sem inoculação, sendo um com adição de N mineral e outro um controle absoluto sem N). Como inoculante serão utilizadas culturas monoxênicas dos isolados, em meio líquido YM. A inoculação será feita no momento da montagem do experimento nos tubetes, adicionando 2 ml do inoculante em cada muda, e repetida após uma semana. A adubação nitrogenada será feita com uréia na dose recomendada para a cana de açúcar no momento da primeira inoculação.

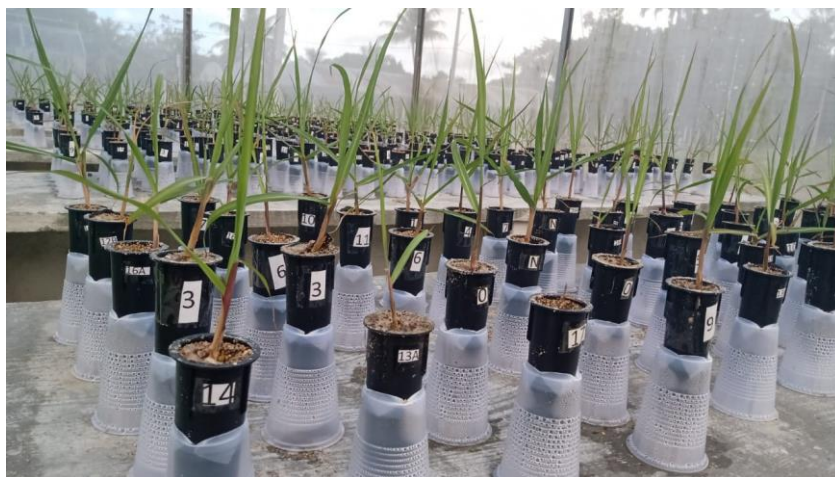


Figura 4: Experimento em casa de vegetação após montagem

Cada parcela será composta por 2 tubetes, que serão mantidos na estufa por 30 dias. O experimento será conduzido sob irrigação, mantendo 80% da capacidade de campo com a utilização de água autoclavada e solução nutritiva de Norris. Ao fim do experimento, foram medidos diâmetro, peso seco da parte aérea e peso seco da raiz. O diâmetro foi medido na base próximo ao rebolo, com a utilização de paquímetro digital (cm); para a determinação da biomassa, as amostras foram secas em estufa de circulação forçada a uma temperatura de 65 °C até atingirem peso constante.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a utilização de feijão-caupi como planta isca, foram obtidos nódulos nos tratamentos. Não foram obtidos nódulos com a utilização do amendoim, nem com a soja, mostrando que ele provavelmente não forma nódulos no meio agarizado ou não forma simbiose com bactérias que ocupam as raízes da cana-de-açúcar.

Ao todo foram obtidos 48 isolados, que após processo de autenticação foram confirmados 17 como sendo rizóbios, pois foram positivos na autenticação formando nódulos novamente no feijão-caupi. Após realização da diluição seriada desses 17 isolados autenticados, observamos em 3 placas (nos tratamentos 12, 13 e 16) o crescimento de duas colônias distintas, foram então considerados isolados A (menor) e B (maior colônia), totalizando assim 20 isolados.

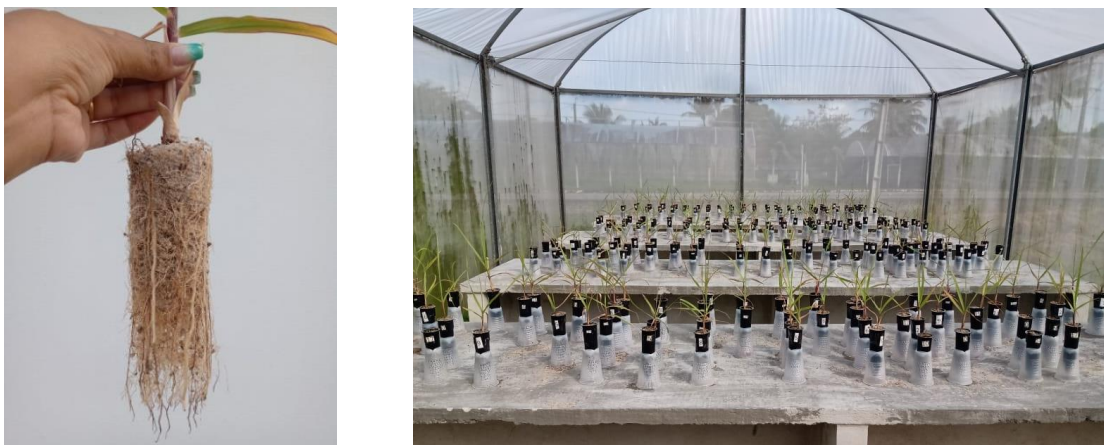


Figura 5: Sistema radicular (A) e plantas em casa de vegetação (B) no momento da coleta

Aos 30 dias após a inoculação, as plantas apresentaram diâmetro variando entre 5,11cm e 6,75cm, não apresentando diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 01).

A utilização do fertilizante nitrogenado apresentou média de 5,53 enquanto o controle teve média superior com 6,11 cm de diâmetro. Em relação ao peso seco da parte aérea, também não houve diferença significativa entre os tratamentos variando entre 0,61 e 1,01 g.

Tabela 01: Diâmetro (DI), Peso Seco da Parte Aérea (PSPA), Peso Seco da Raiz (PSRA) e Peso Seco do Rebolo (PSRE)

TRATAMENTO	DI (cm)	PSPA (g)	PSRA (g)	PSRE (g)
1	5,45 a	0.778750 a	2,09 ab	3,33
2	5,49 a	0.963750 a	1,17 ab	3,39
3	5.547500 a	0.778750 a	0.96 ab	3,48
4	5.558571 a	0.803750 a	1.29 ab	3,24
5	5.796250 a	0.875000 a	1.54 ab	3,57
6	5.346250 a	0.955714 a	1.44 ab	3,21
7	5.925714 a	0.687500 a	1.25 ab	3,77
8	6.486250 a	0.973750 a	1.03 ab	3,89
9	5.981667 a	0.898750 a	0.98 ab	3,51
10	6.735000 a	0.771250 a	1.58 ab	3,12
11	5.760000 a	0.761250 a	0.88 b	3,63
12A	6.410000 a	0.930000 a	1.76 ab	3,62
12B	6.041429 a	0.884286 a	1.88 ab	3,43
13A	5.27 a	0.700000 a	0.64 b	3,3
13B	5.50 a	0.750000 a	1.10 ab	3,27
14	6.35 a	1.016250 a	1.82 ab	3,07
15	5.11 a	0.695714 a	2.01 ab	3,11
16A	6.60 a	0.910000 a	1.30 ab	3,14
16B	5.52 a	0.643750 a	1.11 ab	3,14
17	6.05 a	0.616250 a	1.28 ab	2,92
N	5.53 a	0.967500 a	2.40 a	2,96
CONTROLE	6.11 a	0.858571 a	1.94 ab	2,87

\*Letras minúsculas comparam médias na mesma coluna pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Em relação ao peso seco da raiz as médias variaram entre 0,64g e 2,40g. O controle apresentou média de 1,94g não diferindo do controle nitrogenado (2,40g) e nem dos demais tratamentos com os isolados. A menor média foi do isolado 13A, com 0,64g e diferindo estatisticamente do tratamento nitrogenado.

Já era esperado que o controle nitrogenado apresentasse maior incremento à cultura, porém não se esperava que o controle absoluto (sem adição de N fertilizante nem de inoculante) fosse uma das maiores médias, então pensamos que poderia haver correlação

entre o peso seco rebolo e o peso seco da raiz, já que um maior rebolo poderia fornecer mais nutrientes e assim contribuir mais para o crescimento da planta.

Realizamos então a correlação de Pearson, para avaliar se há alguma relação entre o tamanho dos rebolos e a raiz; o tamanho dos rebolos e a parte aérea e entre o peso da raiz e o peso da parte aérea. Todos os coeficientes de correlação de Pearson (r) das variáveis analisadas apresentaram valores tendendo a zero, mostrando que não há relação entre as variáveis (Tabela 2).

Tabela 2: Coeficiente de Correlação de Pearson (r)

	P. AÉREA	RAÍZ
REBOLO	0,12	-0,33
P. AÉREA	-	0,27

Dessa forma os resultados obtidos com o presente trabalho indicam que o tempo de 30 dias de avaliação das variáveis para a cultura da cana é curto já que nos primeiros dias após o plantio, o suprimento de água e nutrientes é fornecido pelo próprio rebolo e pelas raízes aí originadas (BARNES, 1964), então não pudemos avaliar o efeito dos tratamentos aplicados.

No preparo das mudas pré-brotadas, os rebolos foram padronizados em relação ao tamanho, mas não em relação ao local de coleta na planta (terço superior, médio ou inferior). A parte mais jovem da cana (terço superior) tem gemas de melhor qualidade que impacta na germinação e desenvolvimento das mudas, por serem mais ativas metabolicamente. Indo mais pra base da planta (terço inferior) as gemas podem estar mais senescentes possuindo menor vigor (ARNT, et AL., 2017). Assim, o desenvolvimento das plantas neste trabalho em casa de vegetação está relacionado mais com essas características da muda utilizada (local de origem da gema) e o curto tempo de avaliação não permitiu que o efeito da inoculação com os rizóbios fosse observado.

## 5. CRONOGRAMA

Atividades	2020					2021								
	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S
Revisão de literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Coleta de raiz de cana em consórcio com leguminosas			X											
Desinfestação e maceração de raízes			X											
Experimento de captura com leguminosas				X	X									
Isolamento de bactérias do nódulo						X								
Purificação dos isolados							X							
Obtenção de mudas pré-brotadas										X				
Montagem do experimento de MPB									X	X				
Coleta e obtenção dos dados											X			
Análise estatística dos dados												X	X	
Entrega do relatório final														X

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Raízes de cana-de-açúcar, quando em consórcio com o feijão-caupi, abrigam populações de rizóbios capazes de nodular esta leguminosa.
- A cana de açúcar necessita de tempo de avaliação superior a 30 dias para que possamos identificar o efeito dos inoculantes bacterianos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDO, S.; GOTO, M.; MEUNCHANG, S.; THONGRA-AR, P.; PUJIWARA, T.; HAYASHI, H.; YONEYAMA, T. Detection of *nifH* sequences in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) and pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.). **Soil Science Plant Nutrition**, v. 51, p. 303-308, 2005.

ARNT, W. R.; NASCIMENTO, J. M. do; CARDEAL, A. dos S.; SOUZA, P. S.; SHIROTA, L. Y. Desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar em função da origem da gema e promotores na replicação. **Revista Agrarian**, v.11, n.42, p.380-386, Dourados, 2018.

BARNES, A. C. **The sugar cane** London: Hill Ed., 1964. 456 p

BURBANO, C. S., LIU, Y., ROSNER, K. L., REIS, V. M., CABALLERO-MELLADO, J., REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Predominant *nifH* transcript phylotypes related to *Rhizobium rosettiformans* in fieldgrown sugarcane plants and in Norway spruce. **Environmental MicrobiologyReports**, v. 3, p. 383–389, 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB- Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar: Safra 2020/21. Brasília, v. 8, n. 2, p.17, 2021

EMBRAPA. **Manual de Métodos de Análises de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 2011, 230 p.

FISCHER, D., PFITZNER, B., SCHMID, M., SIMÕES-ARAÚJO, J., REIS, V.M., PEREIRA, W., ORMEÑO-ORRILLO, E.; HAI, B.; HOFMANN, A.; SCHLOTTER, M.; MARTINEZ-ROMERO, E.; BALDANI, J. I. ; HARTMANN, A. Molecular characterization of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). **Plant and Soil**, v. 356, p. 83–99, 2012

LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A.; DINARDO-MIRANDA, L. L.; SCARPARI, M. S.; GARCIA, J. C.; BIDÓIA, M. A. P.; SILVA, D. N.; MENDONÇA, J. R.; KANTHACK, R. A. D.; CAMPOS, M. F.; BRANCALÃO, S. R.; PETRI, R. H.; MIGUEL, P. E. M. Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas. Documentos, IAC, Campinas, 109, 16 p. 2012.

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. 2. ed. rev. Campinas: Instituto Agrônômico, 2013. 16p. (Documentos IAC, 109)

SMITH, D.M., INMAN-BAMBER, N.G., THORBURN, P.J. Growth and function of the sugarcane root system. **Field Crops Research**, v. 92, p.169–183, 2005

SOUZA, R. S. C. de; OKURA, V. K.; ARMANHI, J. S. L.; JORRÍN, B.; LOZANO, N.; SILVA, M. J. da; GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; ARAÚJO, L. M. de; VERZA, N. C.; BAGHERI, H. C.; IMPERIAL, J; ARRUDA, P.Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Scientific Reports**, v.6, p. 28774, 2016

ROUWS, L. F. M.; LEITE, J.; MATOS, G. F. de; ZILLI, J. E.; COELHO, M. R. R.; XAVIER, G. R.; FISCHER, D.; HARTMANN, A.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Endophytic Bradyrhizobium spp. isolates from sugarcane obtained through different culture

strategies. **Environmental Microbiology Reports**, v. 6, n. 4, p.354–363, 2014  
doi:10.1111/1758-2229.12122

THAWEENUT, N.; HACHISUKA, Y.; ANDO, S.; YANAGISAWA, S.; YONEYAMA, T.  
Two seasons' study of *nifH* gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes  
in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids): expression of *nifH* genes similar to those of rhizobia.  
**Plant and Soil**, v. 338, p. 435–449, 2011

## **8. ATIVIDADES RELEVANTES DESENVOLVIDAS PELO BOLSISTA**

Discente do 5º período do curso de Agronomia, participou de coletas em campo, montagem de experimento e análises em laboratório.

## **9. DIFICULDADES ENCONTRADAS**

Não houve dificuldades durante o período de estágio, além das restrições impostas pela situação da pandemia de COVID-19.