

11

Circular
TécnicaSeropédica, RJ
Março, 2005**Autores**

Marta dos Santos Freire Ricci
Eng^a. Agrônoma, Pesquisadora da
Embrapa Agrobiologia, C. Postal
74505, BR 465 km 07,
Seropédica/RJ, Brasil, 23851-970,
e-mail: marta@cnpab.embrapa.br

Janaina Ribeiro Costa
Eng^a. Agrônoma, Pesquisadora da
Embrapa Agrobiologia, C. Postal
74505, BR 465 km 07,
Seropédica/RJ, Brasil, 23851-970,
e-mail: janaina@cnpab.embrapa.br

Verônica Massena Reis
Eng^a. Agrônoma, Pesquisadora da
Embrapa Agrobiologia, C. Postal
74505, BR 465 km 07,
Seropédica/RJ, Brasil, 23851-970,
e-mail:
veronica@cnpab.embrapa.br

Fabio Freire de Oliveira
Eng^o. Agrônomo, Bolsista da Capes
/ UFRRJ, C. Postal 74505, BR 465
km 07, Seropédica/RJ, Brasil,
23851-970, e-mail:
oliveiraff@yahoo.com.br .

Marinete Flores da Silva
Eng^a. Agrônoma, Bolsista da Capes
/ UFRRJ, C. Postal 74505, BR 465
km 07, Seropédica/RJ, Brasil,
23851-970, e-mail:
marineteflores@yahoo.com.br

Luís Felipe da Cruz Rodrigues
Eng^o. Agrônomo, Bolsista da
Embrapa Café, C. Postal 74505,
BR 465 km 07, Seropédica/RJ,
Brasil, 23851-970, e-mail:
lufecr@msn.com



Promoção de Crescimento de Mudanças de Café (*Coffea arabica*) Inoculadas com *Azospirillum brasiliense* Estirpe Cd

Introdução

Considerando-se que o café é uma cultura perene, a obtenção de mudas de boa qualidade é de fundamental importância no estabelecimento da lavoura cafeeira. Mudanças sadias e bem desenvolvidas constitui, sem dúvida, um dos fatores básicos para o sucesso na formação de novas lavouras (GUIMARÃES et al., 1989). As mudanças podem ser formadas em sacolas de polietileno (mudanças em saquinhos) ou em tubos de polipropileno (tubetes) preenchidos com substrato. Quanto ao substrato para preenchimento dos recipientes, no caso de tubetes, pode-se utilizar substratos comerciais constituídos de casca de pínus compostada, vermiculita expandida, perlita, turfa, além de fertilizantes minerais ou preparar substratos alternativos a partir de terra de subsolo peneirada, esterco de curral ou de *cama* de aviário, composto orgânico, húmus de minhoca, casca de arroz ou palha de café carbonizadas e fertilizantes minerais (SILVA et al., 2000). No caso de sacolas, geralmente os substratos são constituídos de materiais como a areia, terra de subsolo, esterco de curral, esterco de *cama* de aviário, composto orgânico, húmus de minhoca e fertilizantes minerais.

Na fase de viveiro, o custo de manutenção das mudanças aumenta conforme o tempo necessário para o plantio das mesmas no campo. A utilização de bactérias promotoras de crescimento e fixadoras de nitrogênio atmosférico pode constituir-se uma alternativa inovadora para reduzir os custos de produção. A espécie *Azospirillum brasiliense*, por exemplo, foi testada numa ampla faixa de hospedeiros, sendo capaz de promover o crescimento do sistema radicular pela produção de hormônios do grupo das auxinas (OKON & LABANDERA-GONZALEZ, 1994).

O objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade de promover o crescimento de mudanças de café pela inoculação da bactéria fixadora de nitrogênio e promotora de crescimento vegetal *Azospirillum brasiliense* estirpe padrão Cd.

Material e Métodos

O trabalho foi constituído por dois ensaios conduzidos em 2003 e 2004, a seguir descritos:

Ensaio 1

O ensaio foi conduzido na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, RJ, em viveiro telado, no período de outubro de 2002 a agosto de 2003, onde as temperaturas internas, neste período, variaram de 27 a 35°C. Foi constituído por dois tratamentos: mudas de café arábica (*Coffea arabica*), cv. Catuaí vermelho IAC 144, inoculadas e não inoculadas com bactérias diazotróficas. As mudas foram cultivadas em sacolas de polietileno (11 cm de diâmetro por 20 cm de altura), preenchidas com um substrato preparado a partir de composto orgânico, barro e areia (1:1:1), com base em volume enriquecido com 10% de fosfato de rocha, que apresentou as seguintes características: pH = 7,3 (em água); $Al^{+3} = 0,0 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; $Ca^{+2} = 5,99 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; $Mg^{+2} = 3,05 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; P trocável = 3078 mg dm^{-3} ; $K^+ = 49,9 \text{ mg dm}^{-3}$ (EMBRAPA, 1997). O alto teor de P encontrado no substrato foi devido ao uso de fosfato de rocha, não correspondendo o valor encontrado ao P trocável. Os tratamentos foram dispostos atendendo o delineamento inteiramente casualizado, com nove repetições. Cada unidade experimental foi constituída por uma muda de café.

As sementes foram colocadas para germinar em canteiros contendo areia lavada. Após a germinação, em cada sacola foi repicada uma plântula no estágio de palito de fósforo. No tratamento inoculado, as plântulas receberam uma suspensão contendo células da bactéria fixadora de nitrogênio da espécie *Azospirillum brasilense* estirpe Cd^T, cedida pela Coleção de Bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia. As células foram crescidas em meio NFB modificado pela adição de frutose (0,7 %) e cloreto de amônio (0,217 g L⁻¹) por 24 h a 175 rpm. A densidade óptica foi ajustada para 10⁸ células viáveis por mL a 436 nm. Cada sacola recebeu 1,0 mL de suspensão. No tratamento não inoculado, as plântulas receberam 1,0 mL de água estéril.

Após 10 meses o ensaio foi finalizado, avaliando-se a altura das mudas. Em seguida, as mesmas

foram cortadas e separadas em parte aérea (folhas, caule + ramos) e raízes. A área foliar foi estimada pelo método da *fotocópia* (GOMIDE et al., 1977). Em seguida o material vegetal foi colocado separadamente em estufa com circulação forçada de ar, a 65°C, até atingir peso constante, para tomada do peso do material seco. O material seco foi moído e analisado quanto aos teores de N, P, K, Ca e Mg nas folhas, caule + ramos e raízes. A determinação do teor de N foi feita a partir da digestão sulfúrica e destilação (BREMNER & MULVANEY, 1982); de P, K, Ca e Mg por digestão nítrico-perclórica (BATAGLIA et al., 1983), sendo o P determinado em espectrofotômetro na faixa visível a partir da formação da cor azul do complexo fosfato-molibdato na presença de ácido ascórbico como redutor (EMBRAPA, 1997).

O isolamento da bactéria inoculada foi feito inoculando-se 0,1 ml de suspensão das raízes lavadas em meio NFb semi-sólido (DÖBEREINER et al., 1995), incubando-se a 35°C por sete dias. Quando a película fina formada atingiu a superfície, foi transferida para novo meio NFb semi-sólido, e incubado novamente até que um novo véu fosse formado. Nessa fase, as culturas foram riscadas em placas contendo meio NFb sólido (15 g agar/litro) acrescido de 20 mg de extrato de levedura. Após incubação por três a cinco dias, as colônias aparecem pequenas, secas e brancas.

Para a análise de variância dos dados foi utilizado o programa estatístico MSTAT e as médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Ensaio 2

Foi conduzido na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, RJ, em casa de vegetação, no período de julho de 2003 a março de 2004, onde as temperaturas internas, neste período, variaram de 20 a 35°C. O ensaio foi constituído por quatro tratamentos, sendo duas cultivares de café

arábica, Tupi IAC 1669-33 e Catuaí vermelho IAC 144, inoculadas e não inoculadas com bactérias fixadoras de nitrogênio da espécie *Azospirillum brasilense* estirpe Cd^T, cedida pela Coleção de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia. As sementes foram colocadas para germinar em canteiros contendo areia lavada e, após a germinação, foram repicadas e inoculadas seguindo a mesma metodologia do primeiro ensaio, tendo sido utilizado o mesmo tamanho de sacolas de polietileno. O substrato para preenchimento das sacolas foi preparado com os mesmos materiais e mesmas proporções utilizadas no preparo do substrato do primeiro ensaio, tendo apresentado as seguintes características: pH = 6,7 (em água); Al⁺³ = 0,0 cmol_c dm⁻³; Ca⁺² = 5,55 cmol_c dm⁻³; Mg⁺² = 3,20 cmol_c dm⁻³; P trocável = 3473 mg dm⁻³; K⁺ = 30,0 mg dm⁻³. Como no primeiro ensaio, o alto teor de P encontrado no substrato foi devido ao uso de fosfato de rocha. Os tratamentos foram dispostos no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2, correspondendo as duas cultivares avaliadas e aos dois níveis de inoculação (com e sem), com cinco repetições. Cada unidade experimental foi constituída por três mudas, sendo o resultado de cada unidade expresso pela média das mudas.

Após oito meses o ensaio foi finalizado, avaliando-se a altura das mudas. Como no primeiro ensaio, a parte aérea foi separada em folhas, caule + ramos e raízes. A área foliar foi avaliada com auxílio de um medidor LI-COR 3100. Em seguida o material vegetal foi colocado separadamente em estufa com circulação forçada de ar, a 65°C, até atingir peso constante, para tomada do peso da matéria seca. O material seco foi moído e analisado quanto aos teores de N, P, K, Ca e Mg nas folhas, caule + ramos e raízes. Para o isolamento da bactéria inoculada procedeu-se da mesma forma descrita no primeiro ensaio.

Para a análise de variância dos dados foi utilizado o programa estatístico SISVAR versão 4.3 e as médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Ensaio 1

As mudas de café quando inoculadas com *A. brasilense* estirpe Cd apresentaram valores significativamente maiores de altura, peso de matéria seca de folhas, de caule + ramos e de raízes, quando comparadas às mudas não inoculadas (Tabela 1; Foto 1). Observou-se também uma maior expansão da área foliar nas mudas inoculadas.

Tabela 1. Altura, peso de matéria seca de folhas, caule + ramos e de raízes e área foliar de mudas de café, cv. Catuaí vermelho, inoculadas ou não com *Azospirillum brasilense*, cultivadas em viveiro telado. Seropédica, RJ, 2003.

Tratamentos	Altura (cm)	Peso de matéria seca (g)			Área Foliar (cm ²)
		Folhas	Caule + ramos	Raízes	
Inoculadas	31,9 A	6,45 A	2,25 A	2,49 A	55.9 A
Não Inoculadas	26,1 B	3,90 B	1,27 B	1,02 B	43.1 B
C.V. (%)	7,3	27,0	54,5	38,0	13,2

^{1/} Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

As análises de nutrientes realizadas nas folhas das mudas de café demonstraram que as mudas inoculadas com a bactéria acumularam maiores teores de N, P, Ca e Mg (Tabela 2). No caule e nos ramos houve maior acúmulo de P e nas raízes, além do P, evidenciou-se também maior acúmulo de Mg nas mudas inoculadas. Estes resultados podem ser atribuídos ao aumento do sistema radicular das plantas inoculadas, já que esta bactéria é excelente produtora de auxinas (RADWAN et al., 2002).

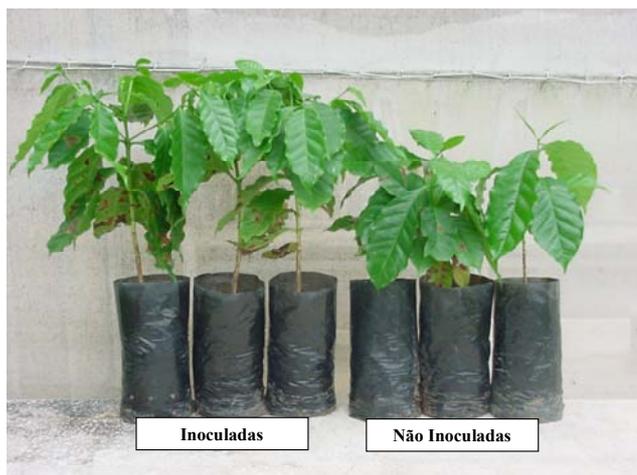


Foto 1. Aspecto das mudas inoculadas e não inoculadas com *Azospirillum brasilense* estirpe Cd, cultivadas em viveiro telado. Seropédica, RJ, 2003.

Tabela 2. Teores médios de N total, P, K, Ca e Mg nas folhas de mudas de café, cv. Catuaí vermelho, inoculadas ou não com *Azospirillum brasilense*, cultivadas em viveiro telado. Seropédica, RJ, 2003.

Tratamentos	Parte da Planta	N	P	K	Ca	Mg
		g kg ⁻¹				
Inoculadas	Folhas	29,0 A	1,51 A	14,7 A	15,2 A	4,58 A
Não Inoculadas		13,0 B	1,14 B	15,1 A	13,7 B	4,13 B
C.V. (%)		32,9	20,0	13,8	8,70	6,0
Inoculadas	Caule + ramos	13,3 A	1,23 A	11,8 A	5,6 A	1,89 A
Não Inoculadas		12,7 A	1,00 B	10,2 A	4,9 A	1,78 A
C.V. (%)		16,4	20,1	16,4	14,4	16,8
Inoculadas	Raízes	20,5 A	2,53 A	15,4 A	11,7 A	6,72 A
Não Inoculadas		20,2 A	1,69 B	12,7 A	9,0 A	4,90 B
C.V. (%)		9,9	21,9	23,5	28,0	25,0

¹⁾ Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

No processo de isolamento da bactéria, a formação do véu característico do gênero *Azospirillum*, foi observada somente nas amostras das mudas inoculadas, assim como a formação de colônias brancas e secas características da espécie *A. brasilense*, o que caracteriza que essa espécie foi mais competitiva em relação a outras bactérias do solo. Portanto, pode-se concluir que a superioridade das mudas inoculadas em relação às não inoculadas, especialmente em relação ao N acumulado nas folhas, foi devido à sua presença.

Ensaio 2

Comparando-se a altura média das cultivares, sem considerar o fator inoculação, a cultivar Catuaí vermelho foi significativamente mais alta que a Tupi. Porém esta diferença deve-se à características genéticas das cultivares, tendo em vista que a Tupi apresenta porte baixo, enquanto a Catuaí vermelho apresenta porte médio a alto (Tabela 3 e Fotos 2 e 3). Contudo, quando inoculadas, nenhuma cultivar respondeu positivamente a este tratamento quanto à altura. Tais resultados são contrários aos obtidos para a cultivar Catuaí no primeiro ensaio, quando essa cultivar respondeu à inoculação (Tabela 1).

Tabela 3. Altura, peso de matéria seca de folhas, caule + ramos e de raízes e área foliar de mudas de café, inoculadas ou não com *Azospirillum brasilense*, cultivadas em casa de vegetação. Seropédica, RJ, 2004.

Tratamentos	Altura (cm)	Peso de matéria seca (g)		
		Folhas	Caule + ramos	Raízes
Cultivar Catuaí vermelho				
Inoculadas	20,9 a	1,98 b	0,644 a	1,11 a
Não Inoculadas	21,0 a	2,35 a	0,647 a	1,18 a
Média	21,0 A	2,18 A	0,646 B	1,14 B
Cultivar Tupi				
Inoculadas	15,8 a	2,27 a	0,994 a	1,41 a
Não Inoculadas	16,0 a	2,37 a	1,025 a	1,67 a
Média	15,9 B	2,32 A	1,010 A	1,54 A
C.V. (%)	6,5	11,3	7,4	18,7

¹⁾ Médias seguidas de letras minúsculas (comparam o fator inoculação) e maiúsculas (cultivares) iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).



Foto 2. Aspecto das mudas de café arábica, cv. Tupi, inoculadas e não inoculadas com *Azospirillum brasilense* estirpe Cd, cultivadas em casa de vegetação. Seropédica, RJ, 2004.

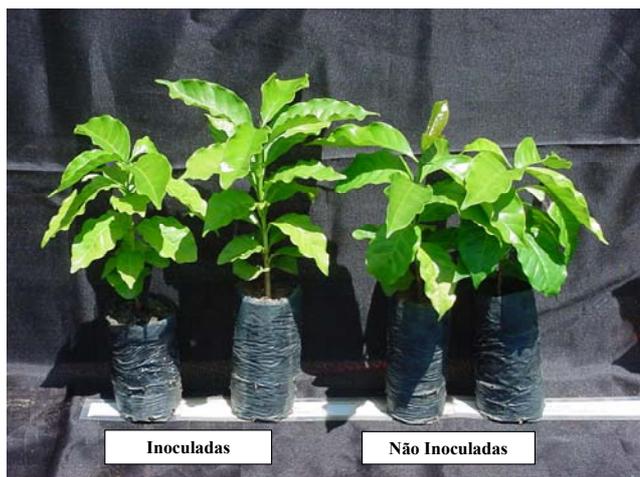


Foto 3. Aspecto das mudas de café arábica, cv. Catuaí vermelho, inoculadas e não inoculadas com *Azospirillum brasilense* estirpe Cd, cultivadas em casa de vegetação. Seropédica, RJ, 2004.

Em relação ao peso de matéria seca, a cultivar Catuaí respondeu negativamente à inoculação para peso de folhas secas (Tabela 3), não havendo resposta para as demais partes da planta. Não houve resposta da cultivar Tupi à inoculação para nenhuma das variáveis avaliadas. Duas hipóteses podem explicar os resultados obtidos. A primeira é que as cultivares respondem diferentemente à inoculação com bactérias promotoras de crescimento. A segunda hipótese leva em consideração os resultados positivos obtidos no primeiro ensaio para a cultivar Catuaí em relação a todas as variáveis avaliadas (Tabelas 1 e 2). Considera-se que a falta de resposta das cultivares observada no segundo ensaio, especialmente a Catuaí, pode estar associada às altas temperaturas ocorridas no interior da casa de vegetação (> 40°C), onde as mudas foram cultivadas, que podem ter prejudicado o desenvolvimento da bactéria, anulando o seu efeito sobre as mudas.

Os teores de N total, P, K, Ca e Mg encontrados nas folhas, ramos + caule e raízes, demonstram a falta de resposta da cultivar Catuaí à inoculação (Tabela 4), reforçando a hipótese do não desenvolvimento da bactéria devido às elevadas temperaturas na casa de vegetação. Com relação à cultivar Tupi, os resultados foram semelhantes (Tabela 5), exceto para o teor de N nas folhas, o

qual foi significativamente menor quando as mudas foram inoculadas.

Tabela 4. Teores médios de N total, P, K, Ca e Mg nas folhas de mudas da cultivar Catuaí vermelho, em função da inoculação ou não com *A. brasilense*, cultivadas em casa de vegetação. Seropédica, RJ, 2004.

Parte da Planta	Tratamento	g kg ⁻¹				
		N	P	K	Ca	Mg
Folhas	Inoculadas	1,69 A	2,64 A	13,1 A	17,3 A	5,52 A
	Não Inoculadas	1,66 A	2,56 A	12,1 A	18,0 A	5,74 A
	C.V. (%)	18,5	18,8	7,7	13,5	13,4
Caule + ramos	Inoculadas	0,80 A	1,86 A	4,39 A	3,35 A	2,34 A
	Não Inoculadas	0,82 A	1,87 A	5,13 A	3,71 A	1,75 A
	C.V. (%)	9,7	30,8	84,8	26,4	33,7
Raízes	Inoculadas	1,26 A	2,07 A	14,0 A	7,89 A	12,2 A
	Não Inoculadas	1,26 A	1,97 A	14,8 A	8,18 A	11,9 A
	C.V. (%)	6,9	27,0	6,2	5,7	2,9

^{1/} Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 5. Teores médios de N total, P, K, Ca e Mg nas folhas de mudas da cultivar Tupi, em função da inoculação ou não com *Azospirillum brasilense*, cultivadas em casa de vegetação. Seropédica, RJ, 2004.

Parte da Planta	Tratamento	g kg ⁻¹				
		N	P	K	Ca	Mg
Folhas	Inoculadas	1,77 B	2,16 A	13,1A	15,6 A	5,02 A
	Não Inoculadas	2,07 A	2,12 A	12,2 A	14,9 A	4,86 A
	C.V. (%)	18,5	18,8	7,7	13,5	13,4
Caule + ramos	Inoculadas	0,87 A	2,17 A	4,15 A	5,25 A	2,45 A
	Não Inoculadas	0,92 A	1,94 A	6,19 A	4,96 A	2,79 A
	C.V. (%)	9,7	30,8	84,8	26,4	33,7
Raízes	Inoculadas	1,38 A	2,08 A	15,7 A	8,74 A	13,3 A
	Não Inoculadas	1,42 A	2,20 A	15,4 A	8,18 A	13,0 A
	C.V. (%)	6,9	27,0	6,2	5,7	2,9

^{1/} Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Pelos resultados obtidos nos dois ensaios, especialmente em relação à cultivar Catuaí, torna-se necessário a realização de um novo ensaio em local com temperatura adequada, como o viveiro telado, utilizando as mesmas cultivares utilizadas no segundo ensaio.

Conclusões

1. No primeiro ensaio a inoculação de *Azospirillum brasilense* estirpe Cd^T promoveu o crescimento e maior acúmulo de nutrientes em mudas de café arábica, cv. Catuaí.
2. No segundo ensaio não houve resposta das cultivares à inoculação, possivelmente devido às altas temperaturas ocorridas no interior da casa de vegetação.

Referências Bibliográficas

BATAGLIA, O. C.; FURLANI, A. M. C; TEIXEIRA, J. P. F.; FURLANI, P. R.; GALLO, J. R. **Métodos de análise química de plantas**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1983. 48 p. (Instituto Agrônomo. Boletim Técnico, 78).

BREMNER, J. M.; MULVANEY, C. S. Nitrogen-total. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. A.; KEENEY, D. R. (Ed). **Methods of soil analysis**. 2. ed. Madison: American Society of Agronomy, 1982. Part. 2. p. 595-624. (Agronomy, 9).

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAOA-SPI: Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60 p.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Manual de métodos de análise de solo**. 2.ed. rev. e atual. Rio de Janeiro, 1997. 212 p. (EMBRAPA-CNPS. Documentos; 1).

GOMIDE, M. B.; LEMOS, O. V.; CARVALHO, M. M. de; CARVALHO, J. G. de.; DUARTE, C. de S. Comparação entre métodos de determinação de área foliar em cafeeiros Mundo Novo e Catuaí. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 1, n. 1, p. 118-123, 1977.

GUIMARÃES, P. T. G.; CARVALHO, M. M. de; MENDES, A. N. G.; BARTHOLO, G. F. Produção de mudas de café: coeficientes técnicos da fase de viveiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 14, n. 162, p. 5-10, 1989.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, A. C. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 1591-1601, 1994.

RADWAN, T.; EL-S. EL-D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, Rehovot, v. 32, p. 39-54, 2002.

SILVA, E. M. da; CARVALHO, G. R.; ROMANIELLO, M. M. **Mudas de cafeeiro: tecnologias da produção**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2000. 56 p. (EPAMIG. Boletim Técnico, 60).

Circular Técnica, 11



Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

Embrapa Agrobiologia
BR465 – km 7
Caixa Postal 74505
23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil
Telefone: (0xx21) 2682-1500
Fax: (0xx21) 2682-1230
Home page: www.cnpab.embrapa.br
e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

1ª impressão (2005): 50 exemplares

Comitê de publicações

Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Verônica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente

Revisor e/ou ad hoc: Segundo Urquiaga e Eliane Maria Ribeiro da Silva
Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix.
Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia.