

UFRRJ

INSTITUTO DE AGRONOMIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

DISSERTAÇÃO

**Desenvolvimento Inicial e Acúmulo de Nutrientes em
Três Variedades de Cana-de-açúcar Inoculadas com
Bactérias Diazotróficas**

Valfredo Almeida Chaves

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**DESENVOLVIMENTO INICIAL E ACÚMULO DE NUTRIENTES EM
TRÊS VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADAS COM
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS**

VALFREDO ALMEIDA CHAVES

Sob a Orientação da Professora

Veronica Massena Reis

e Co-orientação do Professor

Segundo Urquiaga

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ

Março de 2014

Ficha Catalográfica

633.61

C512d

T

Chaves, Valfredo Almeida, 1987-

Desenvolvimento inicial e acúmulo de nutrientes em três variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas / Valfredo Almeida Chaves. - 2014.

76 f.: il.

Orientador: Verônica Massena Reis.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo.

Bibliografia: f.48-59.

1. Cana-de-açúcar – Cultivo - Teses. 2. Cana-de-açúcar - Nutrição - Teses. 3. Cana-de-açúcar – Inoculação – Teses. 4. Cana-de-açúcar – Crescimento – Teses. 5. Acetobacter diazotrophicus – Teses. I. Reis, Verônica Massena, 1961-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO**

VALFREDO ALMEIDA CHAVES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/03/2014

Veronica Massena Reis. Dr. UFRRJ
(Orientadora)

Leandro Azevedo Santos. Dr. UFRRJ

José Carlos Polidoro. Dr. UFRRJ

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, avós e irmãos. Agradeço pelo exemplo e amor que sempre recebi.

Aos amigos, presentes de Deus,

A minha esposa Dyene, por dar um sentido novo a minha vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me concedeu todas as oportunidades necessárias para realização desse sonho, mesmo nos momentos em que não fui perseverante em confiar.

Aos meus pais, Raimundo Sales Chaves e Deilma Almeida Chaves e a minha segunda mãe Telma Lopes Bispo. Ser filho de vocês é um grande privilégio.

Aos meus irmãos Danilon, Rômulo, Yasmim, Tayla, Adnajara, Murilo e Caroline. Ficar longe de vocês durante 10 anos foi um alto preço a ser pago.

Aos meus avós Valfredo Martins Chaves e Enedina Gomes de Sales. Se eu não tivesse herdado parte da teimosia de vocês jamais teria chegado tão longe. Amo muito vocês.

A minha esposa Dyene P. Gomes, a pessoa certa no momento certo. Sou grato a Deus por cada momento que passamos juntos e por tudo o que aprendemos um com o outro. Você é o presente mais especial que eu já recebi.

A toda galera da Aliança Bíblica Universitária (ABU). Caminhar com vocês me fez amadurecer e desfrutar de momentos que levarei comigo pra sempre.

Aos amigos que trago desde o Pará, Ronaldo Amaral e Silvana Gomes. Foi um grande prazer conviver com vocês ao longo de 10 anos. Desejo a vocês toda a felicidade do mundo.

A equipe do Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio em Gramíneas: Jailson Sousa, Danilo Machado, Rafael Cassador, Willian Pereira, Nivaldo e demais colaboradores. Trabalhar ao lado de vocês durante esse tempo foi muito gratificante.

A minha orientadora Veronica Massena Reis e meu co-orientador Segundo S. Urquiaga pela confiança, atenção e paciência. Acima de tudo agradeço pela ética e seriedade dedicada à pesquisa científica.

Aos docentes do Curso de Pós-graduação em Agronomia - Ciência do Solo - UFRRJ.

À Escola Agrotécnica Federal de Castanhal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e Embrapa Agrobiologia pela formação.

A CAPES pela bolsa de estudo e auxílio financeiro.

RESUMO

CHAVES, Valfredo Almeida. **Desenvolvimento inicial e acúmulo de nutrientes em três variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas.** 2014. 63f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande destaque na economia nacional e internacional devido sua importância estratégica para a produção de açúcar e etanol. Tecnologias que contribuam para o aumento da produtividade e qualidade da cultura, com danos mínimos ao meio ambiente são cada vez mais necessárias. Sendo assim, a inoculação com bactérias promotoras de crescimento pode ajudar a alcançar este objetivo, uma vez que a FBN e promoção de crescimento possibilitam ganhos econômicos, com diminuição de impactos ambientais. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas nas variedades de cana-de-açúcar RB92579, RB867515 e IACSP95-5000. Foram conduzidos experimentos em casa de vegetação para avaliar a brotação utilizando-se delineamento experimental inteiramente ao acaso com 48 repetições para a variedade RB92579 e blocos ao acaso com 4 repetições para as variedades RB867515 e IACSP95-5000. Posteriormente foram conduzidos experimentos ao ar livre em vasos com terra enriquecida com ^{15}N utilizando delineamento inteiramente ao acaso com 19 repetições para a variedade RB92579 e 8 repetições para as variedades RB867515 e IACSP95-5000. Em ambos os experimentos os tratamentos utilizados para a variedade RB92579 foram: Testemunha e inoculação mista com *G. diazotrophicus*; *H. rubrisubalbicans*; *H. seropedicae*; *A. amazonense* e *B. tropica*. Já para as variedades RB867515 e IACSP95-5000 os tratamentos foram: Testemunha; inoculação mista com as cinco estirpes e inoculação individual com *G. diazotrophicus*; *H. rubrisubalbicans*; *H. seropedicae*; *A. amazonense* e *B. tropica*. A inoculação aumentou significativamente a velocidade de brotação da variedade RB92579 em casa de vegetação. No cultivo dessa variedade em vasos com terra não houve diferença na proporção de átomos de ^{15}N entre os tratamentos, porém houve incrementos significativos de matéria seca de parte aérea e matéria seca total, além de acúmulo significativo de P e N nas plantas inoculadas. Para a variedade IACSP95-5000 a inoculação com Gd, Hr, Aa e Bt aumentaram significativamente a velocidade de brotação em casa de vegetação. No cultivo dessa variedade ao ar livre a inoculação aumentou significativamente o conteúdo de K (inoculação individual com Gd, Hr, Hs e Bt) e P (inoculação mista e inoculação individual com Gd, Hr, Hs e Bt). Porém, a inoculação com Aa reduziu significativamente a produção de biomassa e o conteúdo de N, P e K. Na variedade RB867515 a velocidade de brotação aumentou significativamente com a inoculação mista e inoculação individual com Hr, Aa e Bt em casa de vegetação, porém ao fim de 44 dias a produção de biomassa reduziu significativamente no tratamento inoculado com Bt. No cultivo ao ar livre a inoculação mista e inoculação individual com Hs, Aa e Bt aumentaram significativamente o conteúdo total de N na variedade RB867515. O efeito da inoculação variou de acordo com os genótipos de cana-de-açúcar utilizados, porém a inoculação individual nas variedades IACSP95-5000 e RB867515 mostrou-se promissora especialmente para as estirpes Gd, Hr e Hs.

Palavras-chave: Inoculante. Cana-de-açúcar. Promoção de crescimento.

ABSTRACT

CHAVES, Valfredo Almeida. **Initial growth and accumulation of nutrients in three varieties of sugar cane inoculated with diazotrophic bacteria.** 2014. 63p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Sugar cane is one of the most important cultures to national and international economy due to duction of sugar and ethanol. New technologies are necessary to increase its productivity and quality with minimum damage to the environment. In this context, the inoculation with plant growth-promoting bacteria could be one of the tools used to reach those objectives, since the activity of atmospheric nitrogen fixation and growth promoting allow economic profits, with decreasing of environmental impacts. The aim of this work is to evaluate the effects of inoculating diazotrophic bacteria in the sugar cane RB92579, RB867515 and IACSP95-5000 varieties. The first experiment consisted in a pre-germination phase in a greenhouse, were used a completely randomized experimental design with 48 replications to RB92579 and randomized block experimental design with 4 replications to RB867515 and IACSP95-5000. Other experiments also were conducted out greenhouse in vases containing soil enriched with ^{15}N , were used a completely randomized experimental design with 19 replications to RB92579 and 8 replications to RB867515 and IACSP95-5000. In both experiments, the treatments used for the RB92579 variety were: inoculated with five strains and uninoculated. To RB867515 and IACSP95-5000 were used seven treatments: uninoculated; inoculated with five strains; inoculated with *G. diazotrophicus*; inoculated with *H. rubrisubalbicans*; inoculated with *H. seropedicae*; inoculated with *A. amazonense* and inoculated with *B. tropica*. Were observed significant differences to the macronutrients accumulation (N and P) and modified germination slope of RB92579 variety, but significant differences were not observed to the amount of ^{15}N atoms between treatments. In the variety IACSP95-5000 the inoculation with Gd, Hr, Aa e Bt improved germination in greenhouse and out greenhouse the inoculation increased K accumulation (inoculation with Gd, Hr, Hs e Bt) and P (inoculation with five strains and inoculation with Gd, Hr, Hs e Bt). However, the inoculation with Aa decreased the biomass accumulation and macronutrients accumulation (N, P e K). For the variety RB867515 in greenhouse the inoculation with Hr, Aa e Bt improved germination, but after 44 days the inoculation with Bt decreased the biomass accumulation. In the cultivation out of greenhouse the inoculation with five strains and inoculation with Hs, Aa e Bt improved nitrogen accumulation of variety RB867515. There are not results about the amount of ^{15}N atoms to RB867515 an IACSP95-5000 yet. The effect of inoculation was different between varieties, but the inoculation with Gd, Hr e Hs showed better results to RB867515 and IACSP95-5000 varieties.

Keywords: Inoculant. Sugar cane. Growth promotion.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Bactérias que compõe o inoculante para cana-de-açúcar – espécie, estirpe e origem do isolamento.....	11
Tabela 2. Teor e conteúdo de N, P e K de minitoletes das variedades RB92579, RB867515 e IACSP95-5000 antes do plantio.....	12
Tabela 3. Análise química de areia e vermiculita 2:1 (v/v).	13
Tabela 4. Análise química de amostra de terra.	14
Tabela 5. Avaliação da brotação de minitoletes da variedade de cana-de-açúcar RB92579 inoculada com bactérias diazotróficas.....	19
Tabela 6. Altura de parte aérea (ALT), diâmetro de colmo (DC) e área foliar (AF) nas variedades RB867515 e IACSP95-5000 após inoculação mista e individual com bactérias diazotróficas.....	24
Tabela 7. Teor de nitrogênio na parte aérea e raiz das variedades RB867515 e IACSP95-5000 após inoculação mista e individual de bactérias diazotróficas.	26
Tabela 8. Medida indireta da clorofila (MIC), altura de parte aérea (ALT), diâmetro de colmo (DC) e área foliar (AF) nas variedades RB867515 (50 dias de cultivo) e IACSP95-5000 (56 dias de cultivo) após inoculação mista e individual com bactérias diazotróficas.....	29
Tabela 9. Altura de planta (ALT) e medida indireta da clorofila (MIC) na variedade RB92579 (58 dias de cultivo) inoculada com bactérias diazotróficas.....	29
Tabela 10. Efeito da inoculação mista e individual de bactérias diazotróficas sobre o teor de N nas variedades RB867515 (50 dias de cultivo) e IACSP95-5000 (56 dias de cultivo).	33
Tabela 11. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas sobre o teor de nitrogênio e % ¹⁵ N na variedade RB92579.....	33
Tabela 12. Efeito da inoculação mista e individual de bactérias diazotróficas sobre o teor de K nas variedades RB867515 (50 dias de cultivo) e IACSP95-5000 (56 dias de cultivo).	37
Tabela 13. Teor de potássio na raiz e parte aérea da variedade RB92579 (58 dias de cultivo) inoculada com bactérias diazotróficas.	37
Tabela 14. Efeito da inoculação mista e individual de bactérias diazotróficas sobre o teor de P nas variedades RB867515 (50 dias de cultivo) e IACSP95-5000 (56 dias de cultivo).	41
Tabela 15. Teor de P na raiz e parte aérea da variedade RB92579 (58 dias de cultivo) inoculada com bactérias diazotróficas.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Variedade RB92579 após 45 dias de cultivo.....15
- Figura 2.** Experimento com a var. RB867515, conduzido na área da Embrapa Agrobiologia.....16
- Figura 3.** Experimento com a var. IACSP95-5000, conduzido na área da Embrapa Agrobiologia.....17
- Figura 4.** Brotação de minitoletes da variedade RB92579 inoculada com bactérias diazotróficas.....18
- Figura 5.** Variedade RB92579 inoculada com bactérias diazotróficas. As imagens **a**, **b** e **c** correspondem respectivamente ao 6º, 7º e 8º dia após o plantio.....19
- Figura 6.** Índice de velocidade de brotação (IVB). A) variedade RB867515; B) variedade IACSP95-5000. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 26,45%; b) 40,2%.....20
- Figura 7.** Variedade RB867515 inoculada com bactérias diazotróficas (14º dia após o plantio). Utilizou-se uma régua de 15 cm como objeto de referência nas imagens.....21
- Figura 8.** Variedade IACSP95-5000 inoculada com bactérias diazotróficas (14º dia após o plantio). Utilizou-se uma régua de 15 cm como objeto de referência nas imagens.....21
- Figura 9.** Variedades RB867515 e IACSP95-5000 no 14º dia após o plantio. a) Massa seca de raiz (MSR); b) Massa seca de parte aérea (MSPA); c) Relação raiz/parte aérea (R/PA); d) Altura de parte aérea (ALT). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. RB867515 (CV%): a) 65,83; b) 19,72; c) 62,92; d) 38,69. IACSP95-000 (CV%): a) 27,56; b) 31,11; c) 59,69; d) 46,42.....22
- Figura 10.** Variedades RB867515 e IACSP95-5000 inoculadas com *B. tropica* (8º dia após o plantio).....23
- Figura 11.** Variedade RB867515 após 44 dias de cultivo. a) Matéria seca de raiz (MSR); b) Matéria seca de parte aérea (MSPA); c) Matéria seca total (MST); d) Relação raiz/parte aérea (R/PA). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 26,45; b) 10,08; c) 9,12; d) 31,36.....24
- Figura 12.** Variedade IACSP95-5000 após 44 dias de cultivo. a) Matéria seca de raiz (MSR); b) Matéria seca de parte aérea (MSPA); c) Matéria seca total (MST); d) Relação raiz/parte aérea (R/PA). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 23,52; b) 12,5; c) 11,36; d) 25,91.....25
- Figura 13.** Variedade RB867515 após 44 dias de cultivo. a) Conteúdo de N na raiz; b) Conteúdo de N na parte aérea; c) Conteúdo total de N. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 22,9; b) 11,89; c) 10,82.....27
- Figura 14.** Variedade IACSP95-5000 após 44 dias de cultivo. a) Conteúdo de N na raiz; b) Conteúdo de N na parte aérea; c) Conteúdo total de N. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas

diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 26,35; b) 15,89; c) 14,74.....	28
Figura 15. Variedade RB867515 após 50 dias de cultivo. a) Matéria seca de raiz; b) Matéria seca de parte aérea; c) Matéria seca total. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 16,13; b) 12,66; c) 13,06.....	30
Figura 16. Variedade IACSP95-5000 após 56 dias de cultivo. a) Matéria seca de raiz; b) Matéria seca de parte aérea; c) Matéria seca total. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 15,88; b) 12,85; c) 12,63.....	31
Figura 17. Variedade RB92579 após 58 dias de cultivo. a) Matéria seca de raiz; b) Matéria seca de parte aérea; c) Matéria seca total. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 9,14; b) 7,41; c) 6,34.....	32
Figura 18. Comparação entre o tratamento inoculado (inoc. Mista) e não inoculado (controle) da variedade RB92579 após 58 dias de cultivo.....	32
Figura 19. Variedade RB867515 após 50 dias de cultivo. a) Conteúdo de N na raiz; b) Conteúdo de N na parte aérea; c) Conteúdo total de N. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 14,48; b) 18,46; c) 14,3.....	34
Figura 20. Variedade IACSP95-5000 após 56 dias de cultivo. a) Conteúdo de N na raiz; b) Conteúdo de N na parte aérea; c) Conteúdo total de N. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. Coeficiente de variação: a) 25,68; b) 18,18; c) 15,94.....	35
Figura 21. Variedade RB92579 após 58 dias de cultivo. a) Conteúdo de N na raiz; b) Conteúdo de N na parte aérea; c) Conteúdo total de N. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 14,38; b) 8,99; c) 9,38.....	36
Figura 22. Variedade RB867515 após 50 dias de cultivo. a) Conteúdo de K na raiz; b) Conteúdo de K na parte aérea; c) Conteúdo total de K. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 17,54; b) 15,05; c) 13,35.....	38
Figura 23. Variedade IACSP95-5000 após 56 dias de cultivo. a) Conteúdo de K na raiz; b) Conteúdo de K na parte aérea; c) Conteúdo total de K. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 13,73; b) 14,66; c) 11,68.....	39
Figura 24. Variedade RB92579 após 58 dias de cultivo. a) Conteúdo de K na raiz; b) Conteúdo de K na parte aérea; c) Conteúdo total de K. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 11,63; b) 9,67; c) 8,99.....	40
Figura 25. Variedade RB867515 após 50 dias de cultivo. a) Conteúdo de P na raiz; b) Conteúdo de P na parte aérea; c) Conteúdo total de P. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 17,37; b) 16,35; c) 13,26.....	42

Figura 26. Variedade IACSP95-5000 após 56 dias de cultivo. a) Conteúdo de P na raiz; b) Conteúdo de P na parte aérea; c) Conteúdo total de P. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 14,11; b) 16,33; c) 11,68.....	43
Figura 27. Variedade RB92579 após 58 dias de cultivo. a) Conteúdo de P na raiz; b) Conteúdo de P na parte aérea; c) Conteúdo total de P. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 18,95; b) 7,19; c) 8,29.....	44
Figura 28. Brotação da variedade RB92579 inoculada com bactérias diazotróficas. a) 3° dia após o plantio. b) 4° dia após o plantio. c) 5° dia após o plantio. d) 6° dia após o plantio. e) 7° dia após o plantio. f) 8° dia após o plantio.....	60
Figura 29. Variedade RB867515 inoculada com bactérias diazotróficas (2° dia após o plantio).....	60
Figura 30. Variedade RB867515 inoculada com bactérias diazotróficas (5° dia após o plantio).....	61
Figura 31. Variedade RB867515 inoculada com bactérias diazotróficas (8° dia após o plantio).....	61
Figura 32. Variedade RB867515 inoculada com bactérias diazotróficas (11° dia após o plantio).....	61
Figura 33. Variedade RB867515 inoculada com bactérias diazotróficas (14° dia após o plantio).....	62
Figura 34. Variedade IACSP95-5000 inoculada com bactérias diazotróficas (2° dia após o plantio).....	62
Figura 35. Variedade IACSP95-5000 inoculada com bactérias diazotróficas (5° dia após o plantio).....	62
Figura 36. Variedade IACSP95-5000 inoculada com bactérias diazotróficas (8° dia após o plantio).....	63
Figura 37. Variedade IACSP95-5000 inoculada com bactérias diazotróficas (11° dia após o plantio).....	63
Figura 38. Variedade IACSP95-5000 inoculada com bactérias diazotróficas (14° dia após o plantio).....	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Cultivo de Cana-de-açúcar no Brasil – Panorama Atual	3
2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio em Cana-de-açúcar	5
2.3 Bactérias Promotoras de Crescimento Associadas a Cana-de-açúcar.....	6
2.3.1 Gênero <i>Gluconacetobacter</i>	7
2.3.2 Gênero <i>Herbaspirillum</i>	8
2.3.3 Gênero <i>Azospirillum</i>	9
2.3.4 Gênero <i>Burkholderia</i>	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Preparo do Inoculante.....	11
3.1.1 Bactérias diazotróficas.....	11
3.1.2 Inoculante polimérico.....	11
3.1.3 Inoculante turfoso.....	11
3.2 Variedades de Cana-de-açúcar Utilizadas	11
3.3 Cultivo das Variedades RB92579, RB867515 e IACSP95-5000 em Casa de Vegetação	12
3.3.1 Inoculação mista de bactérias diazotróficas na variedade RB92579	12
3.3.2 Inoculação mista e individual de bactérias diazotróficas nas variedades RB867515 e IACSP95-5000	13
3.4 Cultivo das Variedades RB92579, RB867515 e IACSP95-5000 ao Ar livre	14
3.4.1 Inoculação mista de bactérias diazotróficas na variedade RB92579	14
3.4.2 Inoculação mista e individual de bactérias diazotróficas nas variedades RB867515 e IACSP95-5000	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1 Brotação das Variedades RB92579, RB867515 e IACSP95-5000 em Casa de Vegetação.....	18
4.2 Acúmulo de Biomassa e N nas Variedades RB867515 e IACSP95-5000 em Casa de Vegetação.....	23
4.3 Cultivo das Variedades RB92579, RB867515 e IACSP95-5000 ao Ar Livre.....	29
4.3.1 Crescimento e acúmulo de biomassa.....	29
4.3.2 Acúmulo de nitrogênio.....	33
4.3.3 Acúmulo de potássio.....	37
4.3.4 Acúmulo de fósforo.....	40
4.3.5 Considerações quanto ao acúmulo de N, P e K nas três variedades	45
5 CONCLUSÕES	47
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
7 ANEXO	60

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar desde o período colonial tem se mostrado uma cultura de grande importância para a economia brasileira, ocupando atualmente a terceira posição na balança comercial do agronegócio, principalmente devido à exportação de açúcar para a China e outros países. O Brasil se destaca no cenário atual como o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, onde a área ocupada por esta cultura no território nacional tem sofrido grande expansão nos últimos anos, passando de 4,8 milhões de hectares no ano 2000 para 9,5 milhões em 2013 (UNICA 2014; IBGE 2013).

Inicialmente os investimentos nesta cultura consideravam apenas a produção de açúcar, porém nos últimos anos a cana-de-açúcar passou a ser também considerada uma alternativa para produção de biocombustível. Embora a produção de cana-de-açúcar seja dependente da utilização de combustíveis fósseis para alimentar máquinas agrícolas e fabricar adubos nitrogenados, esta cultura absorve grande quantidade de CO₂ da atmosfera durante os processos fotossintéticos, reduzindo as emissões de CO₂ no cultivo da cana quando comparada a exploração do petróleo. A qualidade e os índices de produtividade do etanol indicam que essa cultura é uma das alternativas de maior viabilidade econômica e ecológica para substituição dos combustíveis fósseis, contudo a falta de uma política que defina regras claras quanto ao papel do etanol na matriz energética brasileira diminui a competitividade desse combustível frente à gasolina.

As projeções para o setor sucroalcooleiro consideram que o mesmo permanecerá em expansão nos próximos anos, entretanto, a sustentabilidade desses cultivos irá depender da utilização de técnicas de manejo que minimizem os impactos causados ao ambiente e adoção de novas tecnologias que favoreçam aumento de produtividade e sejam ambientalmente viáveis.

Dentro desse contexto a inoculação com bactérias promotoras de crescimento em cana-de-açúcar pode ser considerada uma alternativa capaz de contribuir para sustentabilidade deste setor, uma vez que a atuação de mecanismos de promoção de crescimento e o suprimento do N via fixação biológica de nitrogênio (FBN) permitem ganhos de produtividade e reduzem a utilização de insumos de alto custo, desonerando o sistema de produção da cana. Pesquisas realizadas utilizando a técnica da diluição isotópica de ¹⁵N estimaram que mais de 60% do nitrogênio acumulado em algumas variedades de cana-de-açúcar foram provenientes da fixação biológica de nitrogênio (URQUIAGA et al., 1992), entretanto, outros estudos estimaram que a contribuição da FBN para a nutrição nitrogenada da cana-de-açúcar no Brasil variou de 0 a 60%, com média de 32% (POLIDORO et al., 2001; BODDEY et al., 2003). A variação na FBN entre as diferentes lavouras pode estar relacionada com o genótipo das variedades e principalmente com as condições da fertilidade do solo, porém, em se tratando de uma cultura que ocupa atualmente milhões de hectares, o suprimento de 32% da demanda de nitrogênio pela FBN certamente representa um impacto positivo do ponto de vista ambiental e econômico para esta cultura.

Além da FBN, a produção de reguladores de crescimento por bactérias diazotróficas também são fatores que influenciam no desenvolvimento das plantas (SPAEPEN & VANDERLEYDEN, 2011; BASHAN & HOLGUIM, 1997), levando ao maior desenvolvimento do sistema radicular que torna a absorção de água e nutrientes mais eficiente. A inoculação com bactérias diazotróficas também pode aumentar a velocidade de brotação das gemas e emissão de raízes em colmos de cana-de-açúcar utilizados para o plantio, o que também é desejável especialmente considerando o sistema atual de mudas pré-brotadas (MPB).

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar o efeito da inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal no início do crescimento de três variedades de cana-de-açúcar.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar os efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas na brotação de minitoletes das variedades de cana-de-açúcar RB92579, RB867515 e IACSP95-5000.

- Avaliar o crescimento e acúmulo de biomassa e macronutrientes (N, P e K) nas variedades de cana-de-açúcar RB92579 submetida à inoculação mista, e RB867515 e IACSP95-5000 submetidas à inoculação mista e individual com bactérias diazotróficas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultivo de Cana-de-açúcar no Brasil – Panorama Atual

A cana-de-açúcar é uma planta originária da Nova-Guiné no continente africano, cuja domesticação ocorreu no sul da Ásia, difundindo-se para outros continentes. Esta planta pertence à família Poaceae e tem como principais representantes as espécies *Saccharum officinarum* L, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense* e *S. barberi* (SILVA, 2009).

De acordo com TAUCONNIER & BASSEREAU (1975), a cana-de-açúcar apresenta crescimento lento em temperaturas abaixo de 25 °C ou acima de 35 °C, e crescimento máximo em temperaturas entre 30 e 34 °C. Nas regiões tradicionais de cultivo a precipitação anual situa-se em uma faixa de 1000 a 1600 mm ano⁻¹, e clima quente com duas estações definidas: uma estação quente e úmida que proporciona germinação, perfilhamento e desenvolvimento vegetativo, e uma estação fria e seca que promove maturação e acúmulo de sacarose na planta.

O cultivo da cana-de-açúcar ocorre tradicionalmente desde a latitude 35 °N a 35 °S. O Brasil oferece condições adequadas ao seu cultivo, sendo atualmente o país que se destaca como maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido de países como Índia, China e Tailândia que também apresentam extensas áreas de cultivo (CONAB, 2011; FAO, 2010). A área ocupada pela cultura da cana-de-açúcar no território brasileiro está estimada em cerca de 9,5 milhões de hectares, onde o melhoramento genético para adaptação da cultura a diferentes condições de solo, clima e características de maior produtividade levou ao aumento de variedades de cana-de-açúcar utilizadas nas diversas regiões produtoras do país (NOBREGA & DORNELAS, 2006; IBGE, 2013).

O setor sucroalcooleiro ocupa atualmente o 3º lugar no ranque de exportações na balança comercial do agronegócio (MAPA, 2013). De acordo com a União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA), a produção nacional na safra 2012/2013 foi de 588 milhões de toneladas de colmos, sendo 532,7 milhões na região Centro-Sul e 55,7 milhões na Região Norte-Nordeste. Neste período a produção nacional de etanol foi de 23,2 milhões de m³, e de açúcar 38,2 milhões de toneladas. O Estado de São Paulo permanece como o maior produtor (51,66% da área plantada), seguido por Goiás (9,3%), Minas Gerais (8,8%), Paraná (6,6%), Mato Grosso do Sul (7,08%), Alagoas (5,02%) e Pernambuco (3,25%). Estima-se que a produtividade nacional é de 74,8 t ha⁻¹, representando um aumento de 7,9% em relação à safra 2012/2013. A colheita prevista para a safra 2013/2014 é de 659,85 milhões toneladas com aumento de 12,0% em relação à safra 2012/2013. A produção de açúcar deverá ser de 38,81 milhões de toneladas e a de etanol em torno de 27,66 bilhões litros (CONAB, 2013).

Além da produção de açúcar e etanol, o beneficiamento da cana-de-açúcar também tem como vantagem o aproveitamento de subprodutos, que além de diminuir a quantidade de resíduos que causam danos ao ambiente, tornam-se fontes adicionais de receita para as usinas devido à produção de bioeletricidade a partir do bagaço de cana-de-açúcar e a produção de ração animal a partir do reaproveitamento de leveduras utilizadas na fermentação do caldo da cana (MEURER et al., 2000; SILVA et al., 2010)

O plantio da cana-de-açúcar no Brasil é feito utilizando-se sistema convencional em solos com revolvimento de 20 a 30 centímetros de profundidade, sendo recomendado realizar a sulcação de forma a não levantar torrões (solo seco) e nem vitrificar as paredes do sulco (solo molhado). A distribuição da muda, picação e cobrição devem ser feitas preferencialmente no mesmo dia da sulcação, o que garante melhores índices de germinação à cultura (VITTI & MAZZA, 2002; CONAB, 2011). Os colmos utilizados para o plantio devem ser provenientes de canaviais de 12 a 16 meses, livres de pragas e doenças e que após recebimento de tratamento preventivo com fungicida e inseticida sejam colocadas em sulcos com trinta centímetros de profundidade e cobertos com 5 a 10 centímetros de terra. A

densidade usada é de 12 a 18 gemas por metro linear com distância mínima entre sulcos de 1,2 metros para facilitar a operação de colheita (CONAB, 2011). A quantidade de mudas por hectare é de 15 toneladas em média, porém quando o plantio é mecanizado o consumo de mudas pode ultrapassar 20 toneladas. O ciclo de cultivo comercial da cana-de-açúcar necessita de um tempo médio de 14 a 16 meses para o primeiro corte (cana planta), e os demais cortes da mesma touceira são feitos após 12 meses de cultivo (cana soca), com renovação da lavoura preferencialmente após 4 ou 5 cortes (CONAB, 2011).

A adubação nitrogenada recomendada para a cana planta pode variar de 40 até 90 kg de N ha⁻¹ (VITTI et al., 2010). Já para cana soca recomenda-se 60 kg de N ha⁻¹ para produtividades esperadas abaixo de 60 t ha⁻¹, podendo chegar a 120 kg de N ha⁻¹ para produtividades acima de 100 t ha⁻¹. As aplicações médias de potássio e fósforo em cultivos de cana-de-açúcar no Brasil são de 109 kg de K₂O ha⁻¹ e 123 kg de P₂O₅ ha⁻¹ para cana planta, e 114 kg de K₂O ha⁻¹ e 34 kg de P₂O₅ ha⁻¹ para cana soca (ROSSETO et al., 2010). Contudo, em condições de baixa fertilidade e que visam altas produtividades as adubações podem chegar a 170 kg de K₂O e P₂O₅ ha⁻¹ (VITTI & MAZZA, 2002).

Um dos fatores de maior impacto ambiental no cultivo da cana-de-açúcar é a queima dos canaviais por ocasião da colheita, ocorrendo nesse processo desperdício de nutrientes para as culturas posteriores (socas), danos à estrutura física e atributos químicos do solo e liberação de CO₂ para a atmosfera (CANELLAS et al., 2003; CEDDIA et al., 1999). O governo do Estado de São Paulo, por meio da Lei Estadual n.º 11.241/02, instituiu a eliminação gradativa da queima da palha da cana-de-açúcar, determinando o fim desta prática até 2021 nas áreas consideradas mecanizáveis, entretanto, o setor sucroenergético e a UNICA em parceria com as Secretarias do Meio Ambiente e da Agricultura do Estado de São Paulo e várias entidades, celebraram em 2007 o protocolo agro-ambiental do setor sucroalcooleiro Paulista pelo qual as unidades agroindustriais se comprometeram a antecipar o fim da queima da palha para 2014 nas áreas mecanizáveis (UNICA, 2013). Essas mudanças no sistema de produção da cana-de-açúcar afetam aspectos ambientais e socioeconômicos relacionados a esta cultura, como: substituição da colheita manual pela mecanizada, aumento do conteúdo de palha sobre o solo após a colheita e surgimento de variedades de cana-de-açúcar aptas a romper a camada de palha após o corte das soqueiras (SCOPINHO et al., 1999; CANELLAS et al., 2003; IAC, 2012). De acordo com MENDONZA et al. (2000), o teor de carbono na profundidade de 0-10 cm aumenta no sistema Cana-Crua. Tal comportamento pode ser atribuído ao maior aporte de matéria orgânica na colheita da Cana-Crua (16,7 Mg ha⁻¹ de folha + ponta), sendo porém reduzido a praticamente zero quando se efetua a queima do canavial.

A cana-de-açúcar é uma planta que tem como característica fisiológica um expressivo acúmulo de açúcar durante a fase de repouso vegetativo. A cultura é considerada semi-perene e apresenta elevada produção de biomassa que se torna matéria-prima para produção de açúcar e etanol. O elevado rendimento da cultura (em termos de biomassa) associados a um baixo consumo de fertilizantes nitrogenados (URQUIAGA et al., 1992), são fatores que agregam vantagens no cultivo da cana-de-açúcar, devido o balanço energético positivo que a mesma apresenta, conforme observado também por BODDEY (1995). Considerando-se uma produtividade média de 85 t ha⁻¹, os custos energéticos totais considerando o consumo nas etapas de produção e processamento somam 21,8 MJ L⁻¹. Sabendo que a energia de um litro de etanol corresponde 23,7 MJ, tem-se que a eficiência energética da cana-de-açúcar equivale a 1,1. Dessa forma, a cadeia da cana-de-açúcar é potencialmente sustentável, porém são necessárias pesquisas nas áreas fitotécnicas e industrial que desonerem energeticamente as respectivas operações, especialmente o suprimento de nitrogênio que eleva o custo energético na etapa produtiva e pode tornar a cultura energeticamente insustentável ao longo dos anos (SALLA et al., 2009)

2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio em Cana-de-açúcar

O nitrogênio é importante na nutrição da cana-de-açúcar pelo importante papel fisiológico que desempenha quanto à composição de aminoácidos, proteínas, enzimas e ácidos nucleicos (MALAVOLTA et al., 1989). Alguns levantamentos apontam que a cana-de-açúcar acumula entre 100 e 200 kg ha⁻¹ de nitrogênio por estação de crescimento. Parte do nitrogênio incorporado pela planta é exportada na colheita e parte é perdida pela queima das folhas, portanto, essas extrações contínuas causariam uma exaustão deste nutriente no solo caso não houvesse a reposição do nitrogênio. Na colheita mecanizada da cana-de-açúcar onde não se pratica a queima dos canaviais, grande quantidade deste nutriente retorna ao sistema através da manutenção e incorporação da palhada (PRADO, 2008).

Diversos estudos realizados com cana-de-açúcar com intuito de avaliar respostas da cultura a adubação nitrogenada no primeiro ano de cultivo (cana planta) apresentaram resultados contraditórios, sendo observada ausência de resposta à adubação nitrogenada em muitos casos (AZEREDO et al., 1986; ROSSIELO, 1987; VITTI et al., 2010). De acordo com VITTI et al. (2010) a maior dose de N atualmente recomendada para a cana planta no Estado de São Paulo é de 90 kg de N ha⁻¹, inferior à quantidade exportada pelo colmo. Alguns fatores podem explicar as baixas respostas da cana planta à adubação nitrogenada, tais como: mineralização do nitrogênio devido ao preparo do solo, onde a decomposição de folhas, bainhas, ponteiro e pedaços de colmo podem ser responsáveis pelo fornecimento de 40 a 80 kg de N ha⁻¹ (TRIVELIN, 2000). De acordo com este autor, outro fator que pode explicar a ausência de respostas à adubação nitrogenada no ciclo da cana planta é a fixação biológica de nitrogênio.

A fixação biológica de nitrogênio é um dos processos mais importantes na natureza, realizado apenas por algumas classes de microrganismos. A incorporação de nitrogênio via FBN aos diferentes ecossistemas do nosso planeta é bastante elevada, representando uma economia substancial de energia fóssil empregada na produção de fertilizantes nitrogenados necessários para atender à demanda da agricultura mundial (BALDANI et al., 2002). Os estudos de fixação biológica de nitrogênio em gramíneas tiveram início a partir de trabalhos realizados pela Dr. Johanna Döbereiner e colaboradores no fim da década de 50. A primeira bactéria caracterizada com a capacidade de fixar nitrogênio em cana-de-açúcar foi nomeada *Beijerinckia fluminensis* (DÖBEREINER e RUCHEL, 1958). Depois de alguns anos com a introdução do meio de cultivo semi-sólido para isolamento de bactérias, houve a possibilidade de descoberta de novos gêneros de bactérias diazotróficas (DÖBEREINER, 1992), não só em cana-de-açúcar, como em várias outras gramíneas. As bactérias diazotróficas que se associam a cana-de-açúcar possuem características favoráveis, que levam a acreditar que sejam as principais responsáveis pelas taxas de FBN associadas à cultura (BALDANI et al., 1997).

Atualmente a técnica disponível mais aceita para quantificar a FBN numa determinada cultura agrícola é a diluição isotópica de ¹⁵N. A técnica baseia-se na alteração da proporção natural entre os isótopos ¹⁵N e ¹⁴N, acrescentando-se ao substrato das plantas adubos nitrogenados artificialmente enriquecidos (át.% ¹⁵N >0,3663) em proporção conhecida, ou seja, adubos marcados. Plantas que só obtenham nitrogênio do solo marcado possuirão um enriquecimento em ¹⁵N semelhante ao do solo marcado. Por outro lado, plantas que obtenham além do N marcado proveniente do solo, N atmosférico (não marcado), sofrem uma diluição no seu enriquecimento em ¹⁵N. Quanto maior a magnitude da diluição, maior a contribuição da FBN (RESENDE et al., 2003).

Estudos de quantificação da FBN em cana-de-açúcar realizados por URQUIAGA et al. (1992) mostraram uma contribuição de cerca de 60% do N acumulado nas plantas, demonstrada através da técnica de diluição isotópica do ¹⁵N. Recentemente o uso dessa técnica permitiu avaliar a FBN em cultivos de cana-de-açúcar nos Estados de São Paulo, Rio

de Janeiro, Minas Gerais e Pernambuco (POLIDORO et al., 2001; BODDEY et al., 2003). A partir dos valores médios de ^{15}N das plantas de cana-de-açúcar e das testemunhas estimou-se que a contribuição da FBN para a nutrição nitrogenada da cana no Brasil variou nas condições de estudo de 0 a 60%, com média de 32%. Esta variação entre as diferentes lavouras pode estar relacionada com o genótipo das variedades e principalmente a fertilidade do solo, uma vez que a grande discrepância na estimativa da FBN para a var. SP 80-1842 no estado de São Paulo e Minas Gerais indicam que o manejo cultural, como a adubação nitrogenada, irrigação e a variedade cultivada, pode afetar de forma expressiva o processo de FBN nesta cultura.

Experimentos conduzidos por OLIVEIRA et al. (2002, 2006) resultaram em aumentos na ordem de 30% no acúmulo de N em plantas de cana-de-açúcar via FBN após inoculação combinada de bactérias diazotróficas, demonstrando que esta tecnologia apresenta viabilidade para o suprimento de parte do nitrogênio que a cultura demanda. Além da inoculação outras tecnologias também podem favorecer a FBN como por exemplo a adubação com molibdênio. Diversos estudos realizados no Brasil têm mostrado que há incremento de produtividade em canaviais quando se faz adubação com este micronutriente que pode ser aproveitado pela enzima nitrogenase, potencializando a FBN e contribuindo para o aumento da produtividade (BODDEY et al., 2003).

Embora os estudos sobre FBN na cultura da cana-de-açúcar tenham aumentado nas últimas décadas, as pesquisas voltados à ecologia, à fisiologia, e à genética tiveram prioridades devido essas bactérias terem sido descobertas recentemente (BALDANI et al., 2000). Sendo assim, nos últimos anos diversos experimentos em campo e em casa de vegetação vem sendo realizados para avaliação da resposta da cana-de-açúcar à inoculação com bactérias diazotróficas. Estes experimentos tem gerado evidências da contribuição da FBN para cana-de-açúcar, como os resultados divulgados recentemente por URQUIAGA et al. (2012), que avaliaram a FBN em nove variedades de cana-de-açúcar e concluíram que a fixação biológica de nitrogênio foi responsável por um ganho aproximado de $40 \text{ kg de N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$, demonstrando mais uma vez a importância da FBN no sistema de produção da cana-de-açúcar. Estudos realizados por OLIVEIRA et al. (2002, 2006) permitiram a seleção de estirpes com elevada eficiência de fixação biológica de nitrogênio dentre as bactérias diazotróficas que se associam a cana-de-açúcar. As estirpes selecionadas ao longo desses trabalhos compõem atualmente o inoculante para FBN em cana-de-açúcar lançado pela Embrapa em 2008: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR11281); *Azospirillum amazonense* (BR11145); *Herbaspirillum seropedicae* (BR11335); *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR11504) e *Burkholderia tropica* (BR11366).

2.3 Bactérias Promotoras de Crescimento Associadas a Cana-de-açúcar

No Brasil o cultivo contínuo de cana-de-açúcar com pouca utilização de fertilizantes nitrogenados e sem aparente esgotamento das reservas de nitrogênio do solo, levou a hipótese de que bactérias fixadoras de N_2 associadas com essas plantas pode ser a fonte de entradas significativas de N neste sistema, havendo muitas evidências de que a cana-de-açúcar seja beneficiada pela interação com bactérias diazotróficas (BODDEY et al., 2003). Além da FBN acredita-se que estas bactérias também estejam relacionadas com a produção de fitormônios (SARAVANAN et al., 2008; RADWAN et al., 2004; GOVINDARAJAN et al., 2008; ZIMMER et al., 1988), podendo interferir na morfologia radicular e crescimento de plantas, sendo consideradas como promotoras de crescimento vegetal (SPAEPEN & VANDERLEYDEN, 2011; BASHAN & HOLGUIM, 1997).

A habilidade destas bactérias em colonizar todo o interior de plantas, localizando-se em nichos protegidos do oxigênio juntamente com outros fatores, as tornam os mais promissores grupos de diazotróficos associados com plantas não-leguminosas, e como

resultado dessa endossimbiose a planta recebe benefícios ecológicos da presença do simbiote como controle de fitopatógenos ou promoção do crescimento vegetal (RYAN et al., 2008; QUISPÉL, 1992; BALDANI et al., 1997). O processo de infecção e colonização de plantas por bactérias caracteriza-se como um evento dinâmico envolvendo o reconhecimento de sinais moleculares seguido do movimento da bactéria em direção a planta hospedeira, e por fim sua adesão a superfície vegetal e posterior penetração e multiplicação no interior da planta. As vias de penetração e infecção utilizadas por bactérias podem ser aberturas naturais (estômatos, hidatódios, nectários e lenticélas) e injúrias e feridas (tricomas quebrados, emergência de raízes laterais e feridas) (REIS & OLIVARES, 2006).

A interação entre plantas e microrganismos é determinada em parte pelo genótipo da planta, sendo observado que a mesma serve como abrigo proporcionando ambiente com umidade favorável e proteção contra dessecação, temperatura e estresse luminoso (REIS, 2005). A planta também disponibiliza compostos de carbono como glicose, frutose e sacarose que servem como alimento para estes microrganismos. Acredita-se que a cana-de-açúcar deve ter uma participação ativa na interação, respondendo a diversos processos metabólicos durante a associação (NOGUEIRA et al., 2001). Estes microrganismos também interagem uns com os outros comunicando-se de célula a célula por meio da produção de moléculas que atuam como sinalizadores, onde após atingirem determinada concentração no ambiente são percebidos pela população de microrganismos levando a uma resposta a este sinal. Para que ocorra a indução desses sinais é necessário que se atinja uma determinada densidade populacional, razão pela qual este mecanismo é chamado de “quorum sensing” (VISICK & FUQUA, 2005; REIS, 2005)

A inoculação de bactérias promotoras de crescimento na cana-de-açúcar em condições controladas e em condições de campo tem resultado em incrementos de biomassa que em alguns casos pode se equiparar à adição de 120 kg de N ha⁻¹ (SCHULTZ et al., 2012; SILVA et al., 2012). Em 2008 a Embrapa Agrobiologia lançou o inoculante para FBN em cana-de-açúcar, composto pelas bactérias diazotróficas *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR11281); *Azospirillum amazonense* (BR11145); *Herbaspirillum seropedicae* (BR11335); *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR11504) e *Burkholderia tropica* (BR11366), selecionadas por OLIVEIRA et al. (2002, 2006).

2.3.1 Gênero *Gluconacetobacter*

A bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus*, é uma bactéria diazotrófica endofítica, que inicialmente foi isolada de raízes e colmos de cana-de-açúcar, sendo considerada uma espécie capaz de fixar nitrogênio atmosférico (CALVALCANTE & DÖBEREINER, 1988). Essa espécie é isolada em meio LGI-P semi-sólido com alta concentração de sacarose, onde alíquotas de diluições seriadas oriundas de material vegetal (folhas, raízes e colmos), após inoculadas no meio LGI-P são incubadas a 30 °C por sete dias para formação de uma película alaranjada. Além disso, esta espécie possui alta tolerância osmótica e cresce em ambientes ácidos (até pH 3) (DOBEREINER et al., 1995).

De acordo com SARAVANAN et al. (2008), *G. diazotrophicus* é uma espécie com comprovada capacidade de fixar nitrogênio atmosférico podendo ainda atuar na produção de fito-hormônios como o ácido indol-acético e ácido giberélico, observado também por FUENTES-RAMÍREZ et al. (1993) e BASTIÁN et al. (1998). Esta espécie também apresenta potencial para o controle biológico sobre determinados fitopatógenos como, por exemplo, *Xanthomonas albilineans* (BLANCO et al., 2005).

A população de *Gluconacetobacter diazotrophicus* é maior no sistema radicular e em variedades brasileiras de cana-de-açúcar (BARBOSA et al., 2006). Esta espécie utiliza poucas fontes de carbono, sendo a principal a glicose. Contudo, o tamanho populacional é reduzido

quando as plantas são submetidas a altas doses de N, ocorrendo inclusive inibição da atividade de redução de acetileno dessas bactérias (PERIN et al., 2004; SUMAN et al., 2008; MEDEIROS et al., 2006). Além da inibição por altas doses de N, observou-se *in vitro* que a adição de inseticidas, herbicidas ou fungicidas ao meio de cultura podem inibir o crescimento populacional de *G. diazotrophicus*, sendo importante a confirmação desses resultados em experimentos de campo (MADHAIYAN et al., 2006).

O sequenciamento do genoma da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (estirpe selvagem PAL 5), abriu novas oportunidades de estudo no campo da biotecnologia para identificação de rotas metabólicas e compostos envolvidos na sinalização molecular e na promoção de crescimento da cana-de-açúcar (RODRIGUES et al., 2007).

2.3.2 Gênero *Herbaspirillum*

As duas espécies desse gênero que fazem parte do inoculante para FBN em cana-de-açúcar são: *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. O gênero *Herbaspirillum* foi descrito em conjunto com a espécie *Herbaspirillum seropedicae* por BALDANI et al. (1986), a partir de isolamentos feitos de raízes de arroz e outros cereais.

De acordo com DOBEREINER et al. (1995), as duas espécies de *Herbaspirillum* são melhor isoladas através da inoculação em meio semi-sólido JNFb, com diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-6} de amostras de raízes, colmos ou folhas de cereais de gramíneas forrageiras. As duas espécies são semelhantes e podem ser diferenciadas através do uso das fontes de carbono N-acetil-glucosamina e meso-eritritol. A espécie *H. seropedicae* é capaz de usar N-acetil-glucosamina como única fonte de C, sob condições de fixação de N (em meio JNFb semi-sólido sem ácido málico), enquanto *H. rubrisubalbicans* usa meso-eritritol somente em meio com N mineral. Sendo as duas espécies capazes de produzir compostos indólicos (RADWAN et al., 2002; BASTIÁN et al., 1998)

Herbaspirillum seropedicae tem a capacidade de se associar com diversas culturas agrícolas da família das gramíneas, como: cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), sorgo (*Sorghum bicolor*), milho (*Zea mays*) e arroz (*Oryza sativa*), ou mesmo outras famílias como abacaxi (*Ananas comosus*) e banana (*Musa* spp.) (TADRA-SFEIR et al., 2011). De acordo com CANUTO et al. (2003), *H. seropedicae* apresenta potencial para utilização na cultura da cana-de-açúcar devido à fixação biológica de nitrogênio e mecanismos de promoção de crescimento. Contribuições variáveis da FBN e promoção de crescimento têm sido observadas na cultura do arroz com a inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* (ZACRIA et al., 2007; BALDANI et al., 2000), sendo esta variação atribuída à estirpe utilizada, as condições ambientais e genótipo e idade da planta (ZACRIA et al., 2007).

SUMAN et al. (2008), ao avaliar oito variedades de cana-de-açúcar adubadas com até 150 kg de N ha⁻¹, observou que não houve declínio da população de *Herbaspirillum seropedicae* com o aumento da adubação, demonstrando um comportamento diferente da espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* que é inibida quando se utiliza altas doses de N (PERIN et al., 2004; SUMAN et al., 2008; MEDEIROS et al., 2006). Populações de *H. seropedicae* têm sido observadas em folhas e em maior quantidade nas raízes, colonizando os espaços intercelulares da epiderme radicular, espaços existentes nas junções de raízes laterais com a raiz principal e vasos do xilema (ZACRIA et al., 2007; CANUTO et al., 2003; DOBEREINER et al., 1995; BALDANI & BALDANI, 2005; NJOLOMA et al., 2006; ZACRIA et al., 2008).

A espécie *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, anteriormente classificada como "*Pseudomonas rubrisubalbicans*", foi reclassificada na década de 90 devido a muitas semelhanças ao gênero *Herbaspirillum* como, por exemplo, a habilidade de fixar nitrogênio atmosférico e ser reisolada de tecidos vegetais 60 dias após a inoculação, sendo inclusive

isolada de diversas espécies de cana-de-açúcar no Brasil. Acredita-se que esta espécie seja o patógeno causador da Estria Mosqueada em algumas variedades de cana-de-açúcar plantadas nos EUA (BALDANI & BALDANI, 2005; GILLIS et al., 1991; BODDEY et al., 1995; DOBEREINER et al., 1995)

2.3.3 Gênero *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* é representado por bactérias diazotróficas associativas endofíticas gram-negativas, mas que podem sobreviver no solo na forma de cistos e apresentam baixa especificidade quanto à planta hospedeira, sendo já observado por diversos autores a sua associação com cereais, forrageiras e pupunheira (MOREIRA et al., 2010).

Durante a década de 70 com o desenvolvimento de meios de cultivo semi-sólido e a técnica de redução de acetileno foi possível à obtenção de maiores avanços na pesquisa de FBN em gramíneas, especialmente com a descoberta de duas novas espécies: *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasiliense* (BALDANI & BALDANI, 2005). Posteriormente na década de 80 a espécie *Azospirillum amazonense* foi isolada de gramíneas forrageiras e pupunha na região amazônica por MAGALHÃES et al. (1983), sendo esta a espécie do gênero *Azospirillum* que faz parte da composição do inoculante para FBN lançado para cana-de-açúcar (SILVA, et al., 2012).

Azospirillum amazonense é isolada em meio LGI semi-sólido, inoculado com diluições seriadas de raízes e solo da rizosfera das mais diferentes gramíneas. Películas finas formam-se na superfície do meio LGI semi-sólido, cinco a sete dias após a incubação a 32 °C. Esta espécie é caracterizada por usar sacarose como única fonte de carbono (DOBEREINER et al., 1995). Esta bactéria é capaz de produzir compostos indólicos como auxinas, sendo já observado que a produção de auxinas pelo gênero *Azospirillum* pode inclusive ser superior ao gênero *Herbaspirillum* (RADWAN et al., 2004; REIS JUNIOR et al., 2004). De acordo com BASHAN et al. (2004), em inúmeros casos a inoculação com bactérias do gênero *Azospirillum* foi capaz de reduzir a adubação nitrogenada entre 20% - 50%, indicando o potencial de utilização dessas bactérias na agricultura.

REIS JÚNIOR et al. (2000), ao avaliar a diversidade populacional de bactérias diazotróficas em quatro variedades de cana-de-açúcar, verificou que nesta cultura a população do gênero *Azospirillum* encontra-se em maior quantidade nas raízes e em seguida nos colmos, podendo-se obter isolados também das folhas, exceto para a espécie *Azospirillum amazonense* que não pôde ser isolada de folhas. A presença dessa espécie também já foi detectada em *Brachiaria brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola* e milho promovendo maior produção de matéria seca e acúmulo de N nas raízes para esta cultura (REIS JUNIOR et al., 2004; REIS JÚNIOR et al., 2008). Embora o gênero *Azospirillum* seja encontrado em diversas culturas agrícolas, este pode ser afetado negativamente por defensivos agrícolas, inclusive herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar (PROCÓPIO et al., 2011; BASHAN et al., 2004), o que pode ser um fator limitante na utilização desses microrganismos.

2.3.4 Gênero *Burkholderia*

A espécie desse gênero que participa da composição do inoculante para FBN em cana-de-açúcar é *Burkholderia tropica*. Esta espécie foi descrita por REIS et al. (2004), utilizando no Brasil os meios de cultivo LGI-P e JMV semi-sólido, para isolamento dos microrganismos. Neste trabalho os isolados foram obtidos de plantas de cana-de-açúcar, milho e teosinto cultivados em diferentes regiões geográficas e climáticas do Brasil, México e África do Sul (clima subúmido temperado até quente e úmido), havendo posteriormente isolamento do gênero *Burkholderia* também na Índia oriunda de plantas de cana-de-açúcar e arroz (GOVINDARAJAN et al., 2006, 2008).

A espécie *Burkholderia tropica* tem a forma de bastão ligeiramente curvado e sua mobilidade é possível devido a existência de 1 a 4 flagelos, sendo uma bactéria Gram negativa que em meio LGI-P forma pequenas colônias com centro amarelo e margens brancas. Essas bactérias tem a capacidade de reduzir o acetileno a etileno em meio semi-sólido sem nitrogênio, e são portanto consideradas capazes de fixar nitrogênio atmosférico (REIS et al., 2004). Estas estirpes tem metabolismo aeróbico mas fixam nitrogênio em ambiente microaerófilo. A temperatura ótima de crescimento é 30 °C, sendo possível a utilização de diversas fontes de carbono para esta bactéria incluindo açúcares e ácidos orgânicos. Também foi observado no gênero *Burkholderia* a capacidade de produzir auxina, sideróforos e solubilizar fosfato (CABALLERO-MELLADO et al., 2007; GOVINDARAJAN et al., 2008), indicando que além da FBN diversos benefícios podem ser obtidos com a inoculação desses microrganismos em culturas agrícolas.

As bactérias desse gênero primeiro colonizam a superfície das raízes e depois colonizam os espaços intercelulares abrindo caminho através da membrana danificada, podendo também colonizar as plantas através dos pontos de crescimento de raízes laterais (BALDANI et al., 1997; BALDANI et al., 1995). No Brasil, os melhores resultados com a inoculação do gênero *Burkholderia* em cana-de-açúcar, tem sido obtidos quando esta espécie foi inoculada em conjunto com *Gluconacetobacter diazotrophicus*; *Azospirillum amazonense*; *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (OLIVEIRA et al., 2002, 2003; SCHULTZ et al., 2012; SILVA et al., 2012; PEREIRA et al., 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo do Inoculante

3.1.1 Bactérias diazotróficas

O inoculante utilizado neste estudo foi composto por um coquetel de bactérias diazotróficas inicialmente selecionado por OLIVEIRA et al. (2002, 2006) (Tabela 1).

Tabela 1. Bactérias que compõe o inoculante para cana-de-açúcar – espécie, estirpe e origem do isolamento.

Espécie	Estirpe	Origem do isolamento
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (Gd)	BR11281 ^T	Raízes – <i>Saccharum</i> sp.
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (Hs)	BR11335	Raízes – <i>Saccharum</i> sp.
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> (Hr)	BR11504	Colmos – <i>Saccharum</i> sp.
<i>Burkholderia tropica</i> (Bt)	BR11366 ^T	Gemas – <i>Saccharum</i> sp.
<i>Azospirillum amazonense</i> (Aa)	BR11145	Colmos – <i>Saccharum</i> sp.

3.1.2 Inoculante polimérico

A população de bactérias presentes no inoculante para implantação desse experimento foi estimada em aproximadamente 10^8 - 10^9 células mL⁻¹. Uma mistura polimérica composta por polímeros carboximetilcelulose e amido na proporção 60% e 40% foi utilizada como veículo para as bactérias diazotróficas presentes no inoculante. A partir da proporção 60/40 (CMC e amido) foi preparada uma mistura polimérica sem qualquer agente compatibilizante na concentração 0,8 (g L⁻¹) em água destilada (forma líquida). As misturas poliméricas foram preparadas na Embrapa Agrobiologia, protegidas por patente no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual, sob o título “Composições poliméricas contendo inoculante rizobiano, uso das mesmas e sementes tratadas com as composições” – nº da patente (PI0506338-8^a).

3.1.3 Inoculante turfoso

Foi utilizado 1 mL de suspensões celulares do pré-inóculo para a inoculação em 200 mL de meio líquido NFb modificado (BURDMAN et al., 1998), com: 5 g L⁻¹ de sacarose e pH 6–6,2 – (*Azospirillum*); 100 g L⁻¹ de sacarose e pH 5,5 – (*Gluconacetobacter*); 5 g L⁻¹ de manitol, pH 5–5,4 – (*Burkholderia*); 5 g L⁻¹ de ácido málico, pH 5,8 – (*Herbaspirillum*). Foi adicionado 1 mL de frutose a 0,7% (1:10) em tampão fosfato 0,5 mol L⁻¹ esterilizado em filtro Millipore 0,2 µm. Os meios inoculados ficaram sob agitação a 175 rpm, a 30 °C por 24 horas.

A população de bactérias presentes no inoculante para implantação desse experimento foi estimada em aproximadamente 10^8 - 10^9 células mL⁻¹. Posteriormente foram adicionados 75 mL do inóculo em 175 g do veículo (turfa moída, neutralizada e esterilizada) embalado em sacos de polietileno. Os sacos plásticos foram mantidos a 30 °C por sete dias. O produto final foi composto por cinco pacotes (250 g) contendo as cinco estirpes individualizadas, somaram 1.250 g de inoculante turfoso.

3.2 Variedades de Cana-de-açúcar

RB92579 – Atualmente esta variedade ocupa mais de 50 % da área plantada com cana-de-açúcar no nordeste do país e cerca de 10% da área plantada de cana-de-açúcar no Brasil. A variedade RB92579 possui as seguintes características: maturação média; alto teor de sacarose; boa brotação; alto perfilhamento em cana-planta e soca; bom fechamento de

entrelinhas; alta produtividade agrícola e não apresenta restrição a ambiente de produção (BARBOSA et al., 2003).

RB867515 – É a variedade de cana-de-açúcar mais cultivada no Brasil. Apresenta maturação média, alto teor de sacarose, alta velocidade de crescimento, porte alto, hábito de crescimento ereto, alta densidade de colmo, alta produtividade agrícola e boa brotação na cana-planta e na soca, perfilhamento médio e bom fechamento de entrelinhas (HOFFMANN et al., 2008; ESALQ, 2011).

IACSP95-5000 – Lançada em 2007 esta variedade apresenta boa adaptação à colheita mecânica crua. Apresenta maturação média-tardia, alta produtividade, alto teor de sacarose, porte ereto, ótima brotação de soqueiras, ótimo perfilhamento e ótimo fechamento das entrelinhas. Não apresenta tombamento e é resistente a ferrugens, escaldadura, carvão e mosaico (IAC, 2012).

A Tabela 2 apresenta a análise química dos minitoletes das variedades RB92579, RB867515 e IACSP95-5000 quanto ao teor e conteúdo de nitrogênio, fósforo e potássio. Os dados apresentados referem-se aos valores médios obtidos de 16 minitoletes de cada variedade, antes da implantação dos experimentos ao ar livre. Os valores médios da matéria seca dos minitoletes utilizados foram: RB92579 (4,5 g); RB867515 (11,9 g) e IACSP95-5000 (11,0 g).

Tabela 2. Teor e conteúdo de N, P e K de minitoletes das variedades RB92579, RB867515 e IACSP95-5000 antes do plantio.

Variedade	Teor do nutriente (g kg ⁻¹)			Conteúdo total do nutriente (mg)		
	N	P	K	N	P	K
RB92579	2,12	0,49	7,33	11,58	2,25	33,64
RB867515	5,60	0,43	1,50	67,24	5,15	18,23
IACSP95-5000	5,08	0,73	7,73	56,35	8,14	85,35

ALVES et al. (1999), SARRUGE & HAAG (1974).

3.3 Cultivo das Variedades RB92579, RB867515 e IACSP95-5000 em Casa de Vegetação

3.3.1 Inoculação mista de bactérias diazotróficas na variedade RB92579

Minitoletes de tamanho e diâmetro similares contendo uma gema foram retirados do terço superior de colmos da variedade RB92579 com 12 meses de idade. Antes do plantio fez-se uma amostragem aleatória de 16 minitoletes para secagem em estufa e posterior análise de N, P e K (Tabela 2).

As plantas receberam uma inoculação mista com cinco estirpes de bactérias diazotróficas: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd); *Azospirillum amazonense* (Aa); *Herbaspirillum seropedicae* (Hs); *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Hr) e *Burkholderia tropica* (Bt), selecionadas por OLIVEIRA et al (2002, 2006). Foi utilizado o inoculante polimérico descrito no item 3.1.2, obtendo-se os tratamentos: inoculação mista e controle (não inoculado). O inoculante foi diluído em água destilada na proporção 1:100 (v/v), onde os minitoletes inoculados permaneceram imersos por 30 minutos enquanto o tratamento controle permaneceu imerso em água destilada. Em seguida foram montados dois bancos de germinação com objetivos distintos. Ambos foram montados em casa de vegetação utilizando como substrato uma mistura de areia e vermiculita 2:1 (v/v) esterilizada e submetida à análise química (Tabela 3).

Tabela 3. Análise química de areia e vermiculita 2:1 (v/v).

Al	Ca	H +Al	Mg	K	P	pH
.....cmol _c dm ⁻³mg dm ⁻³			
0,04	0,16	0,17	1,64	14	8,3	7,7

Embrapa (1997).

O primeiro banco de germinação teve como objetivo a contagem diária do número de plantas germinadas e para tal foram plantados aleatoriamente 48 minitoletes inoculados e 48 minitoletes não inoculados (controle), utilizando-se um minitolete/ kg de substrato. Realizou-se a contagem diária da emergência de plântulas e ao fim de nove dias as plantas germinadas foram transplantadas para vasos contendo amostras de terra enriquecida com ¹⁵N.

No segundo banco de germinação utilizaram-se trinta e seis repetições para cada tratamento, sendo cada repetição constituída de um vaso de plástico contendo um minitolete em 1,5 kg de substrato. Realizou-se diariamente o sorteio de três repetições de cada tratamento para acompanhamento da brotação das gemas e emissão de raízes por meio de fotografias (Anexo). Nos dois bancos de germinação a profundidade de plantio foi de 4 cm e a distribuição dos tratamentos obedeceu a um delineamento inteiramente ao acaso.

O experimento foi instalado em casa de vegetação automatizada com controle de umidade e temperatura na Embrapa Agrobiologia, localizada no Município de Seropédica - RJ em fevereiro de 2011. A fase de germinação teve duração de nove dias, onde as primeiras avaliações tiveram início 36 horas após o plantio. As frequências das brotações entre os tratamentos foram comparadas utilizando-se o teste de Fisher no programa Excel 2007.

3.3.2 Inoculação mista e individual de bactérias diazotróficas nas variedades RB867515 e IACSP95-5000

Foram utilizadas as variedades de cana-de-açúcar RB867515 (responsiva a inoculação com bactérias diazotróficas) e IACSP95-5000 lançada em 2007. A variedade IACSP95-5000 apresenta alto potencial de produtividade para a colheita da cana crua, porém ainda é pouco estudada quanto aos efeitos da inoculação com bactérias diazotróficas. Minitoletes de tamanho e diâmetro similares contendo uma gema foram retirados do terço superior de colmos das variedades RB867515 e IACSP95-5000 com 12 meses de idade.

A inoculação foi realizada com inoculante turfoso (Item 3.1.3), obtendo-se os seguintes tratamentos para cada variedade: Controle; Inoculação mista com as cinco estirpes; Inoculação com *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd); Inoculação com *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Hr); Inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* (Hs); Inoculação com *Azospirillum amazonense* (Aa) e Inoculação com *Burkholderia tropica* (Bt). Utilizou-se um delineamento experimental em blocos ao acaso com quatro repetições. O inoculante foi diluído em água destilada (1:100 v/v) padronizando a população das estirpes em 10⁷ células/ml. Os minitoletes inoculados permaneceram imersos por 30 minutos na solução inoculante enquanto o tratamento controle permaneceu imerso em água destilada. Utilizou-se como substrato uma mistura de areia e vermiculita proporção 1:1 (v/v) previamente esterilizada.

O plantio foi realizado em caixas plásticas de 12 kg contendo 10 kg de substrato. As caixas foram distribuídas em blocos ao acaso com quatro repetições. Cada repetição foi constituída de oito minitoletes plantados a uma profundidade de 4 cm em cada caixa plástica. A partir do plantio e a cada dois dias foram sorteadas três repetições de cada tratamento, colhendo-se uma planta de cada repetição para ser fotografada (Anexo) e posteriormente descartada, prosseguindo-se até o 14° dia após o plantio. No 14° dia as mudas foram colhidas e secas em estufa a 65 °C para determinação da massa seca de raiz e parte aérea. Quatro

minitoletes de cada repetição foram mantidos intactos para contagem diária do número de brotos (durante 20 dias) e avaliação da biomassa produzida após 44 dias. A brotação foi avaliada pelo índice de velocidade de germinação conforme descrito por MAGUIRE (1962) e aqui chamado de índice de velocidade de brotação (IVB), onde: $IVB = (b1/n + b2/n + b3/n...Bn/n)$; B_n é o número de brotações computadas nas “n” contagens e N_n é o número de dias do plantio das gemas às “n” contagem.

O experimento foi instalado em casa de vegetação automatizada com controle de umidade e temperatura na Embrapa Agrobiologia, localizada no Município de Seropédica - RJ, tendo duração de 44 dias. Ao fim do experimento foram colhidas duas plantas de cada repetição, avaliando-se a altura da parte aérea, diâmetro de colmo e área foliar (AF), onde: $AF=C \times L \times 0,75 \times (N+2)$; AF (área foliar por colmo); C (comprimento da folha +3); L (largura da folha +3); 0,75 (fator de forma); N (número de folhas abertas com pelo menos 20% de área verde da folha 0 a +7) (HERMANN & CÂMARA, 1999). Em seguida essas plantas foram armazenadas em estufa por 10 dias a 65 °C para secagem. Após a secagem determinou-se a massa seca de raiz, parte aérea e total, o material foi triturado para determinação do teor de nitrogênio pelo método de Kjeldahl (ALVES et al., 1999).

Depois de verificado a validade da análise de variância quanto às pressuposições de normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variâncias dos erros (teste de Cochran), as médias das variáveis foram submetidas à análise de variância, recorrendo-se ao teste de Scott-Knott, com p 0,05 para comparação entre médias. As análises foram realizadas nos programas estatísticos SAEG®, da Universidade Federal de Viçosa e SISVAR®, da Universidade Federal de Lavras.

3.4 Cultivo das Variedades RB92579, RB867515 e IACSP95-5000 ao Ar Livre

3.4.1 Inoculação mista de bactérias diazotróficas na variedade RB92579

Utilizou-se neste experimento 220 kg de terra oriunda de um solo enriquecido com átomos de ^{15}N (0,1% $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) classificado como Argissolo Vermelho, utilizado para cultivo de cana-de-açúcar e feijão e um lisímetro localizado da cidade de Piracicaba-SP. A terra foi homogeneizada em uma betoneira e de acordo com a análise química de terra (Tabela 4) recebeu a seguinte adubação: 55,6 mg de P_2O_5 kg^{-1} de terra; 125 mg de K_2O kg^{-1} de terra e 50 mg de FTE BR12 kg^{-1} de terra.

Tabela 4. Análise química de amostra de terra.

Al	Ca	Mg	P	K	C	M.O.	N	pH
.....cmol _c dm ⁻³mg dm ⁻³mg dm ⁻³mg dm ⁻³g kg ⁻¹			
0,00	3,74	0,70	21,20	67,40	6,0	10,00	0,8	5,2

Embrapa (1997).

Após um período de germinação de nove dias em casa de vegetação, os minitoletes foram transplantados para vasos contendo 6 kg de terra enriquecida com ^{15}N (uma muda/vaso) a uma profundidade de 4 cm, sendo irrigados diariamente com uma lâmina de 30 mm dia^{-1} , exceto nos dias chuvosos. Nesta etapa o experimento foi conduzido ao ar livre na Embrapa Agrobiologia (Figura 1) durante o período de 25 de fevereiro a 15 de abril de 2011, totalizando 49 dias. Adotou-se um delineamento experimental inteiramente ao acaso com dezoito repetições para cada tratamento (inoculação mista e controle).

Como parâmetro para o cálculo de FBN neste período também foram cultivadas as plantas Sorgo (*Sorghum bicolor*), Painço (*Panicum mileaceum*) e pé-de-galinha (*Cynodon dactylon*) que não fixam nitrogênio. Quatro repetições de cada espécie foram cultivadas em recipientes contendo 400g da mesma terra utilizada para cultivar a variedade RB92579 e

adubada com 100 mg de P_2O_5 na forma de super fosfato simples kg^{-1} de terra; 87 mg de K_2O na forma de sulfato de potássio kg^{-1} de terra; 50 mg de FTE BR12 kg^{-1} de terra e 50 mg de sulfato de magnésio kg^{-1} de terra. Após 33 dias de cultivo as plantas testemunhas foram colhidas e armazenadas em estufa a 60 °C por oito dias. Após determinação da massa seca dessas plantas as mesmas foram trituradas para determinação do teor de ^{15}N .

No 48º dia de cultivo da variedade RB92579 (dia anterior à colheita), efetuaram-se as seguintes avaliações: altura de planta e determinação indireta dos valores de clorofila através de um clorofilômetro marca ClorofiLOG® modelo CFL 1030, operado conforme as instruções do fabricante (FALKER, 2008). Neste aparelho, as unidades de mensuração, denominadas Índice de Clorofila Falker (ICF), são produto de fotodiodos que emitem em 635, 660 e 880 nm. As leituras foram realizadas nas folhas +1, efetuando-se 10 medições no terço médio da folha.

Ao fim de 49 dias de cultivo ao ar livre, as plantas foram colhidas. As repetições foram armazenadas em estufa por 10 dias a 65 °C para secagem. Após a secagem determinou-se a massa seca de raiz, parte aérea e massa seca total. Em seguida o material foi triturado para determinação do teor de nitrogênio pelo método de Kjeldahl (ALVES et al., 1999), quantificação percentual da FBN pela técnica de diluição isotópica de ^{15}N (UNKOVICH et al., 2008), e teor de fósforo e potássio pelo método de digestão nitro-perclórica (SARRUGE & HAAG, 1974).

As duas fases do experimento tiveram uma duração total de 58 dias (9 dias de germinação em casa de vegetação e 49 dias de cultivo ao ar livre). Depois de verificado a validade da análise de variância quanto às pressuposições de normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variâncias dos erros (teste de Cochran), as médias das variáveis foram submetidas à análise de variância escolhendo-se aleatoriamente 10 repetições de cada tratamento, recorrendo-se ao teste Scott-Knott com p 0,05 para comparação entre médias. As análises foram realizadas nos programas estatísticos SAEG®, da Universidade Federal de Viçosa e SISVAR®, da Universidade Federal de Lavras.



Figura 1 - Variedade RB92579 após 45 dias de cultivo.

3.4.2 Inoculação mista e individual de bactérias diazotróficas nas variedades RB867515 e IACSP95-5000

Minitoletes contendo uma gema foram retirados do terço superior de plantas com 12 meses de idade. O inoculante polimérico (Item 3.1.2) foi diluído em água na proporção 1:100 (v/v), onde os minitoletes inoculados permaneceram imersos por 30 minutos enquanto o tratamento controle permaneceu imerso em água destilada. Foram utilizados sete tratamentos

para cada variedade: Controle; Inoculação mista com as cinco estirpes; Inoculação com *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd); Inoculação com *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Hr); Inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* (Hs); Inoculação com *Azospirillum amazonense* (Aa) e Inoculação com *Burkholderia tropica* (Bt).

Após a inoculação foi plantado um minitolete/vaso a uma profundidade de 4 cm, utilizando como substrato terra enriquecida com N¹⁵ (item 3.4.1), porém diferente do experimento conduzido com a variedade RB92579 (Item 3.4.1), aqui a terra foi misturada com areia na proporção 1:1 (kg/kg) para evitar compactação, totalizando 6 kg de substrato/vaso. Antes do plantio foi efetuada uma amostragem aleatória de 16 minitoletes de cada variedade para análise do teor de N, P e K (Tabela 2).

Ao fim dos experimentos foram realizadas as seguintes avaliações: altura de planta, diâmetro médio da base dos colmos e determinação indireta do teor de clorofila através do uso do clorofilômetro (FALKER, 2008) (Item 3.4.1), e área foliar (HERMANN & CÂMARA, 1999) (Item 3.3.2). Para as avaliações de acúmulo de biomassa e macronutrientes foram utilizadas quatro repetições por tratamento. Essas plantas foram secas em estufa por 10 dias a 65 °C, e após a secagem foi determinada a massa seca de raiz, parte aérea e massa seca total. Em seguida o material foi triturado para determinação do teor de N pelo método de Kjeldahl (ALVES et al., 1999), e teor de P e K pelo método de digestão nitro-perclórica (SARRUGE & HAAG, 1974).

O experimento com a variedade RB867515 (Figura 2) foi implantado no início de outubro de 2012 e teve duração de 50 dias, o experimento com a variedade IACSP95-5000 (Figura 3) foi implantado no fim de setembro de 2012 e teve duração de 56 dias. Os experimentos foram conduzidos ao ar livre na Embrapa Agrobiologia, sendo irrigados diariamente com uma lâmina de 30 mm dia⁻¹, exceto nos dias chuvosos. Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente ao acaso com 4 repetições, onde cada repetição foi constituída de uma planta de cana-de-açúcar cultivada em 6 kg de substrato.

Depois de verificado a validade da análise de variância quanto às pressuposições de normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variâncias dos erros (teste de Cochran), as médias das variáveis foram submetidas à análise de variância recorrendo-se ao teste Scott-Knott com p 0,05 para comparação entre médias. As análises foram realizadas nos programas estatísticos SAEG®, da Universidade Federal de Viçosa e SISVAR®, da Universidade Federal de Lavras.



Figura 2. Experimento com a var. RB867515, conduzido na área da Embrapa Agrobiologia.



Figura 3. Experimento com a var. IACSP95-5000, conduzido na área da Embrapa Agrobiologia.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Brotação das Variedades RB92579, RB867515 e IACSP95-5000 em Casa de Vegetação

As observações da brotação das gemas e emissão de raízes nas variedades de cana-de-açúcar RB92579, RB867515 e IACSP95-5000, foram realizadas por meio da coleta de amostras conforme descrito nos itens 3.3.1 e 3.3.2. As fotografias obtidas diariamente dos tratamentos estão disponíveis em anexo. As imagens das três variedades mostraram que há diferença entre elas na fase de brotação. Observando apenas o tratamento controle para as três variedades, percebe-se que nos primeiros dias de plantio, ocorreu um maior desenvolvimento das raízes em relação à parte aérea nas variedades RB92579 e IACSP95-5000 (Anexo). Na variedade RB867515 houve predominância do desenvolvimento da parte aérea. De acordo com CASAGRANDE & VASCONSELOS (2010), se as condições ambientais estiverem favoráveis para que ocorra a brotação, tais reações serão predominantemente regidas pelo genótipo de cada variedade de cana-de-açúcar. Cada uma tem um comportamento diferente quanto à capacidade de brotação.

As Figuras 4 e 5 apresentam o comportamento da variedade RB92579 durante a fase de germinação.

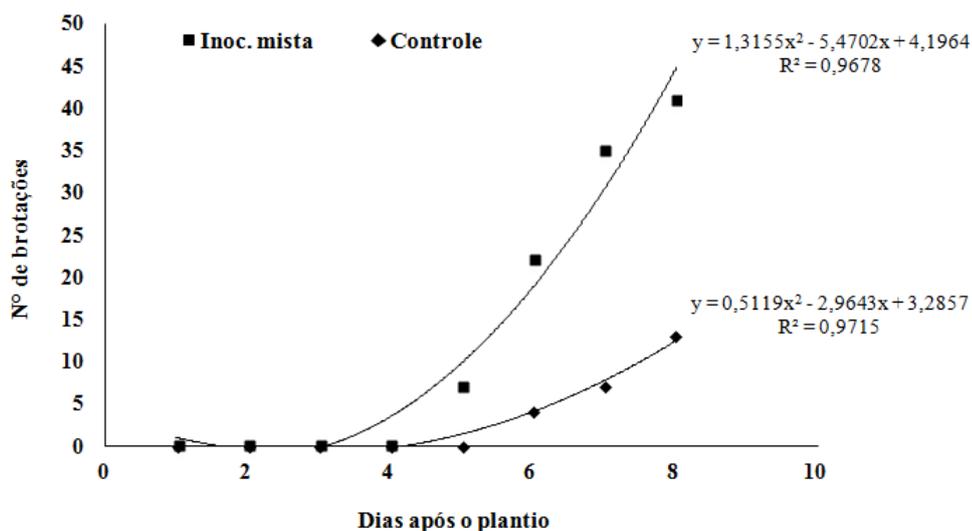


Figura 4. Brotação de minitoletes da variedade RB92579 inoculada com bactérias diazotróficas.

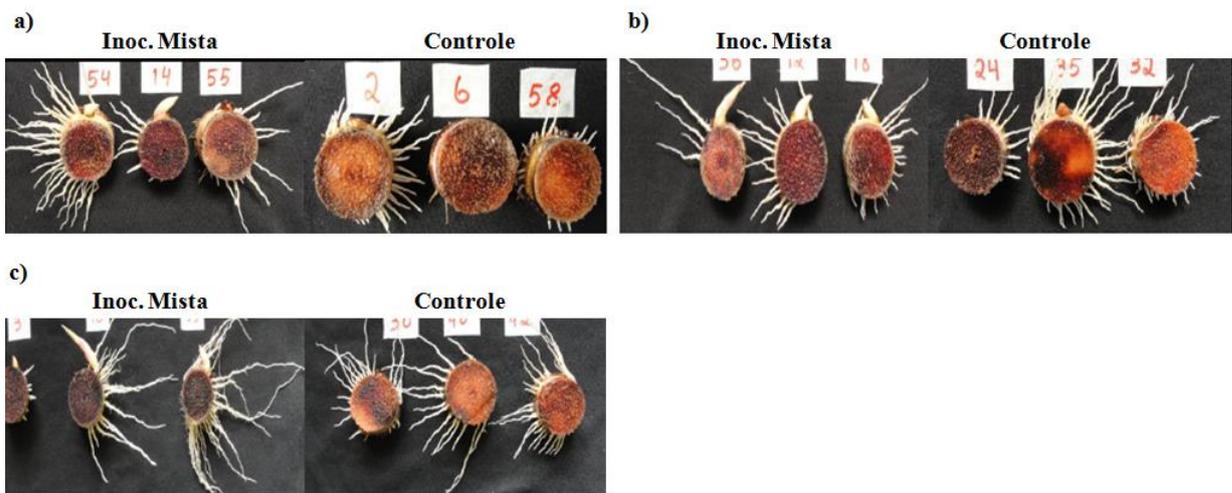


Figura 5. Variedade RB92579 inoculada com bactérias diazotróficas. As imagens **a**, **b** e **c** correspondem respectivamente ao 6º, 7º e 8º dia após o plantio.

A inoculação aumentou significativamente a velocidade de brotação da variedade RB92579 (Tabela 5). Ao final da avaliação 85% das plantas inoculadas já haviam emergido do substrato, em contrapartida apenas 27% das plantas não inoculadas (controle) haviam emergido. O teste do Qui-quadrado aplicado às frequências de germinação observadas entre o 6º e o 8º dia após o plantio mostrou que o efeito da inoculação foi altamente significativo no aumento da velocidade de brotação da variedade RB92579 (Tabela 5), justificando as diferenças observadas entre os tratamentos nas Figuras 4 e 5.

Tabela 5. Avaliação da brotação de minitoletes da variedade de cana-de-açúcar RB92579 inoculada com as bactérias diazotróficas.

6º dia		7º dia		8º dia	
X ²	P***	X ²	P***	X ²	P***
33,666	6,54x10 ⁻⁹	34,166	5,06x10 ⁻⁹	34,166	5,06x10 ⁻⁹

X² = resultado do teste do Qui quadrado; P = probabilidade de que as frequências observadas tenham ocorrido por acaso; *** = o valor de P tende a zero, portanto o resultado observado é altamente significativo.

Para a variedade RB867515 (Figura 6a) o índice de velocidade de brotação (IVB) foi significativamente superior com a inoculação mista das cinco estirpes e inoculação individual com *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *B. tropica*. Já para a variedade IACSP95-5000 (Figura 6b) o IVB foi significativamente superior com a inoculação individual de *G. diazotrophicus*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *B. tropica*.

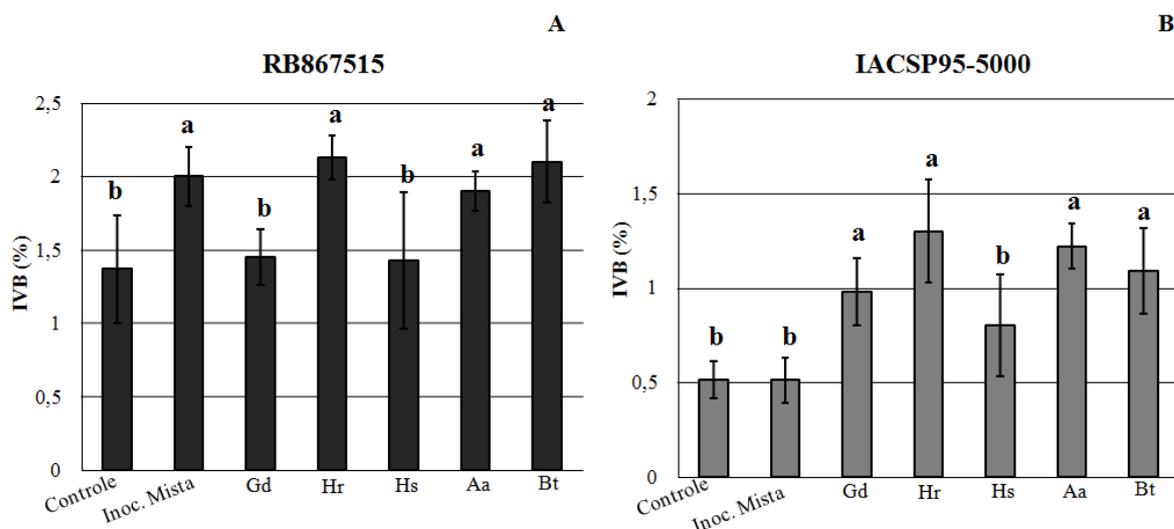


Figura 6. Índice de velocidade de brotação (IVB). A) variedade RB867515; B) variedade IACSP95-5000. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 26,45%; b) 40,2%.

Embora os minitoletes tenham sido extraídos de colmos jovens, houve variabilidade de brotação demonstrada pelo elevado coeficiente de variação (Figura 6). Neste ensaio procurou-se uniformizar os minitoletes separando-os em classes de acordo com o tamanho e diâmetro, a maior variabilidade na brotação foi observada na variedade IACSP95-5000.

A velocidade de brotação foi significativamente superior em resposta à inoculação individual com *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *B. tropica* nas variedades RB867515 e IACSP95-5000. Resultados promissores com a inoculação de uma única espécie diazotrófica já foram observados por SUMAN et al. (2005), estes autores inocularam isolados de *G. diazotrophicus* na variedade de cana-de-açúcar CoSe92423 cultivada na Índia e também obtiveram aumentos significativos da % de germinação para esta variedade. Para as variedades RB867515 e IACSP95-5000 tomando-se como exemplo a espécie *H. rubrisubalbicans*, percebe-se que a velocidade de brotação foi 55% superior ao controle quando se aplicou *H. rubrisubalbicans* na variedade RB867515 e 154% na variedade IACSP95-5000. Como o plantio de cana-de-açúcar hoje preconiza a utilização de mudas pré-brotadas (MPB) (LANDELL et al., 2013), esta modificação na velocidade de obtenção de mudas é desejável, e uma única estirpe foi capaz de acelerar este processo independente do genótipo da planta, quando comparada as outras estirpes, o que é desejável para se recomendar um novo processo biotecnológico ao setor.

Neste experimento a inoculação mista e inoculação individual com *G. diazotrophicus* influenciaram de maneira diferente a velocidade de brotação nas variedades RB867515 e IACSP95-5000. Tendo em vista que a interação entre plantas e microrganismos é determinada em parte pelo genótipo da planta (OLIVEIRA et al., 2006), é provável que diferenças genéticas entre as variedades tenham modificado a resposta das plantas para estes tratamentos, uma vez que a inoculação e cultivo das mesmas deu-se em condições idênticas.

As Figuras 7 e 8 demonstram a diferença na brotação entre os tratamentos aplicados as variedades RB867515 e IACSP95-5000 no 14º dia após o plantio.

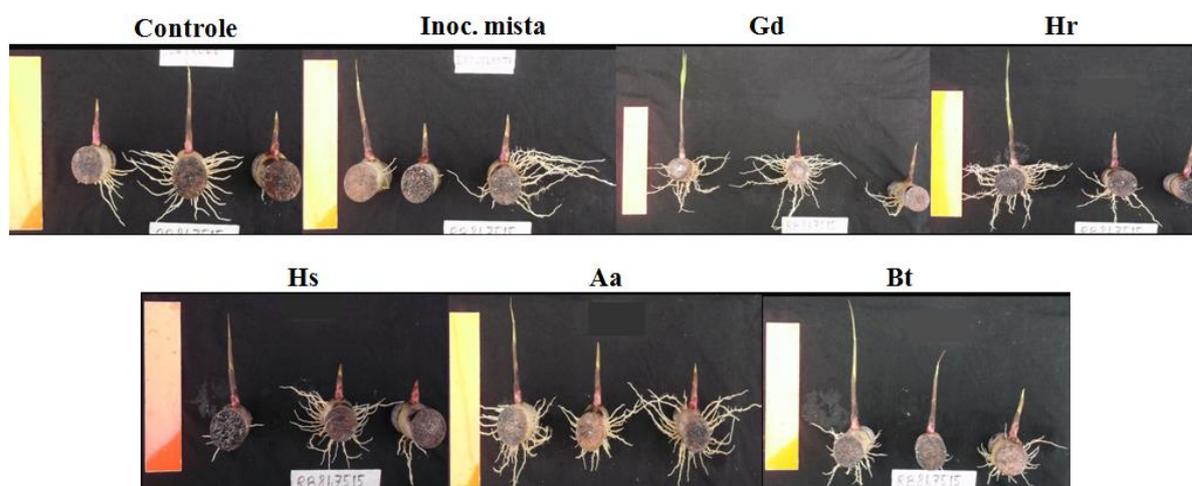


Figura 7. Variedade RB867515 inoculada com bactérias diazotróficas (14° dia após o plantio). Utilizou-se uma régua de 15 cm como objeto de referência nas imagens.

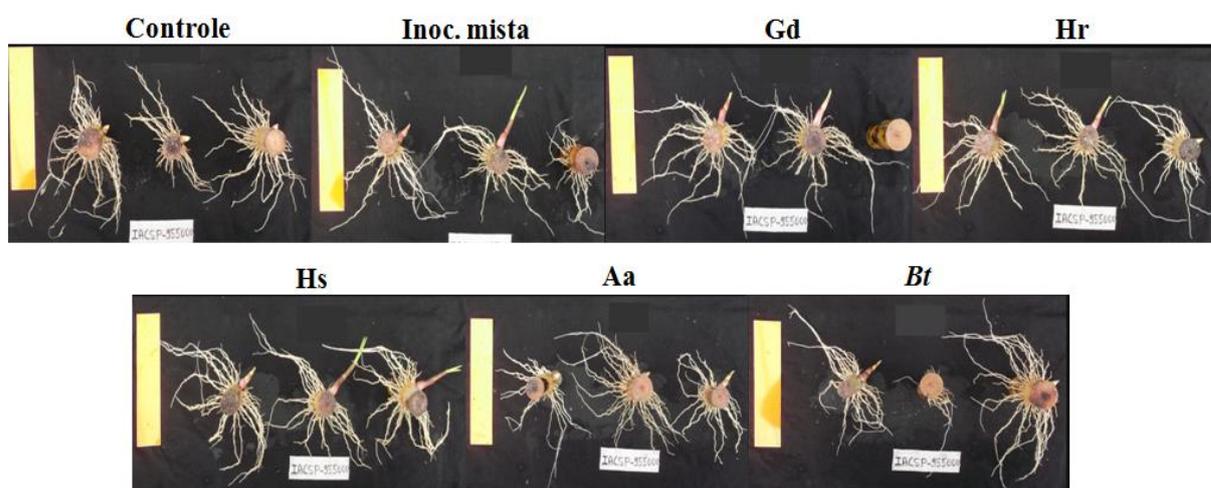


Figura 8. Variedade IACSP95-5000 inoculada com bactérias diazotróficas (14° dia após o plantio). Utilizou-se uma régua de 15 cm como objeto de referência nas imagens.

Nos minitoletes fotografados (14° dia após o plantio) realizou-se a medição da altura dos brotos, e após a secagem foi determinada a massa seca de raiz e parte aérea. Para a variedade RB867515 (Figura 9), não houve diferença estatística para nenhuma das variáveis analisadas. Os altos valores de coeficiente de variação obtido principalmente na massa seca de raiz (65,83%) indicam que nesta fase as plantas apresentam maior variabilidade no seu desenvolvimento. Na variedade IACSP95-5000 (Figura 9), a produção de massa seca de parte aérea foi significativamente superior em resposta à inoculação mista e inoculação individual de *G. diazotrophicus*, *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*.

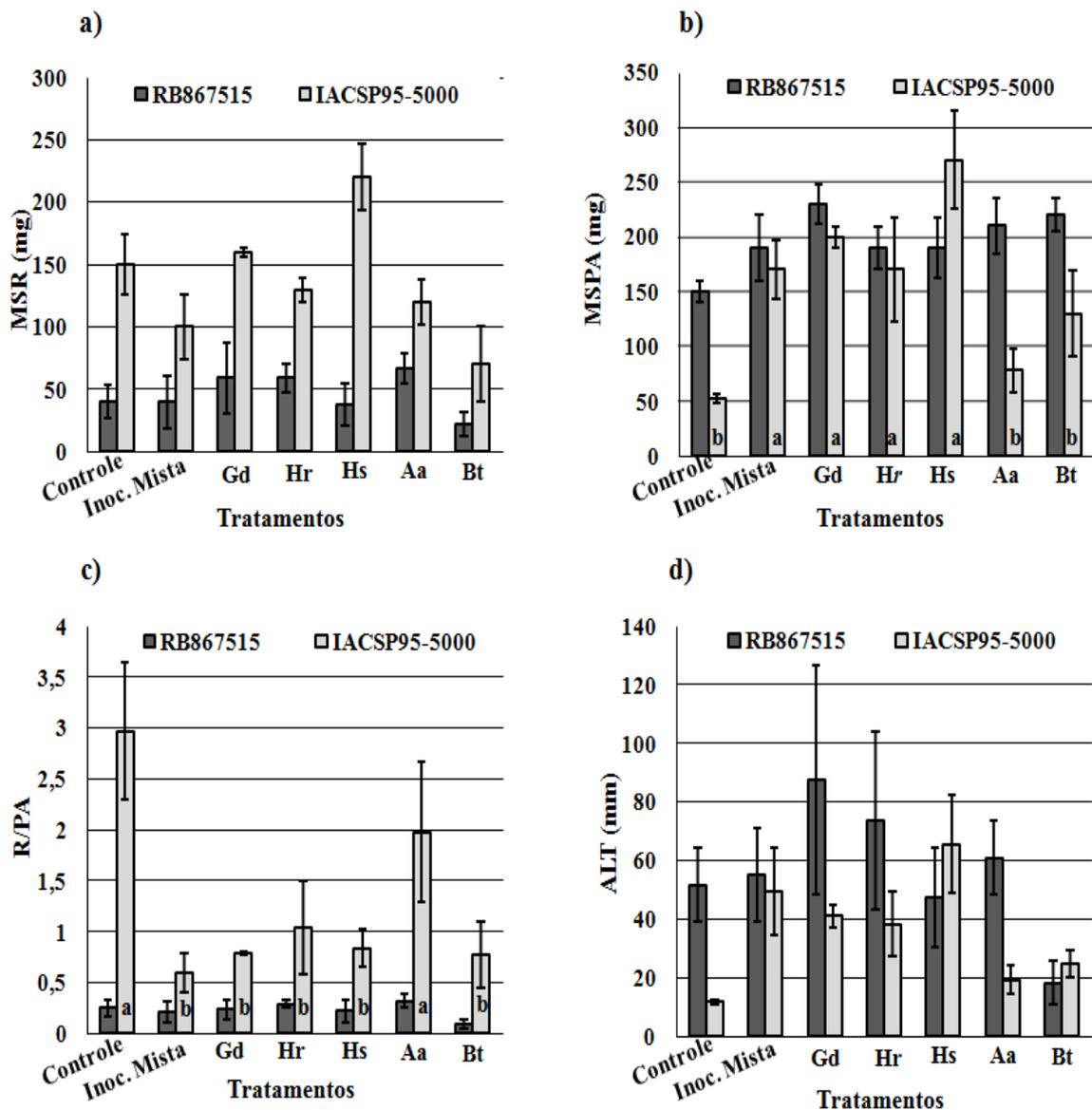


Figura 9. Variedades RB867515 e IACSP95-5000 no 14º dia após o plantio. a) Massa seca de raiz (MSR); b) Massa seca de parte aérea (MSPA); c) Relação raiz/parte aérea (R/PA); d) Altura de parte aérea (ALT). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. RB867515 (%CV): a) 65,83; b) 19,72; c) 62,92; d) 38,69. IACSP95-000 (%CV): a) 27,56; b) 31,11; c) 59,69; d) 46,42.

A relação raiz/parte aérea na variedade IACSP95-5000 foi significativamente superior no tratamento controle e inoculação com *A. amazonense*, devido à produção de biomassa de parte aérea significativamente inferior nesses tratamentos. Avaliando-se os dois genótipos testados, o acúmulo de massa durante 14 dias de ensaio mostrou que a variedade RB867515 mantém uma proporção de massa seca de parte aérea e raiz equilibrada enquanto que a variedade IACSP95-5000 emite mais raízes (Figura 9). Esse fenômeno pode ser potencializado com a inoculação de bactérias promotoras de crescimento conforme observado na Figura 10, onde a variedade RB867515 inoculada com *B. tropica* apresentou maior desenvolvimento da parte aérea contrastando com a variedade IACSP95-5000 que submetida ao mesmo tratamento apresentou maior desenvolvimento do sistema radicular.

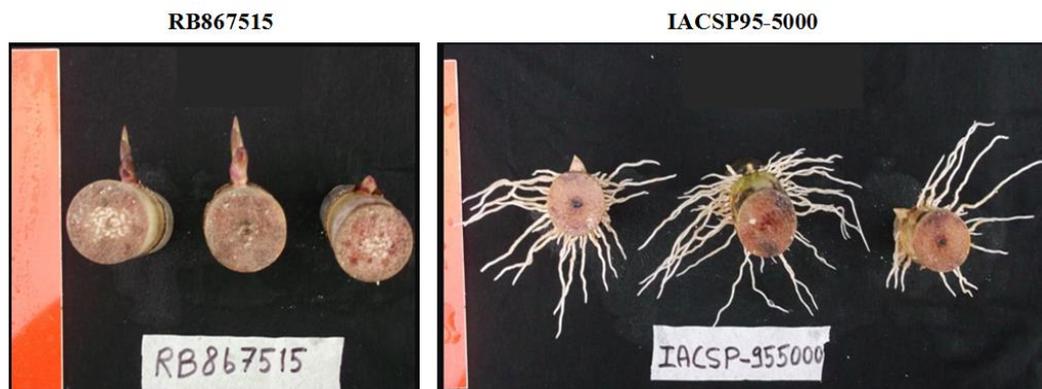


Figura 10. Variedades RB867515 e IACSP95-5000 inoculadas com *B. tropica* (8º dia após o plantio).

Nos toletes de cana-de-açúcar os órgãos da gema e primórdios radiculares passam do estado latente para o estado ativo de crescimento e desenvolvimento devido às mudanças das reservas nutritivas pela atividade de enzimas e reguladores de crescimento (DILLEWIJN 1952 apud CASAGRANDE & VASCONSELOS, 2010). Uma vez que a brotação das gemas e emissão de raízes na cana é dependente da atuação de reguladores de crescimento, o fato dos minitoletes utilizados neste experimento terem sido inoculados com bactérias amplamente reconhecidas como produtoras de fitormônios (SPAEPEN et al., 2007; FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993; BASTIÁN et al., 1998; RADWAN et al., 2002), explica as diferenças no crescimento das plantas entre os tratamentos devido a contribuição hormonal desses microrganismos, pois a produção de auxinas, citocininas, giberelinas e etileno por bactérias associadas aos vegetais, são considerados agentes causais da alteração do crescimento e transformação vegetal (CASSÁN et al., 2014). A interação entre fitormônios microbianos e plantas pode ocorrer por meio de liberação de auxina no interior da planta quando a mesma se associa a bactérias endofíticas, observando-se entre os muitos efeitos de promoção de crescimento vegetal, estímulos ao desenvolvimento de raízes laterais e alongamento de raízes primárias (PATTEN & GLICK, 1996).

Efeitos no desenvolvimento inicial de plantas de cana-de-açúcar também têm sido observados por outros autores em virtude da ação de microrganismos promotores de crescimento, substâncias húmicas e reguladores de crescimento sintéticos (MARQUES JÚNIOR et al., 2008; SILVA et al., 2009; SERNA-COCK et al., 2011).

4.2 Acúmulo de Biomassa e N nas Variedades RB867515 e IACSP95-5000 em Casa de Vegetação

Os resultados da coleta final dos experimentos com as variedades RB867515 e IACSP95-5000 em casa de vegetação são apresentados a seguir. Não houve diferença significativa nas variedades RB867515 e IACSP95-5000 para as variáveis altura de planta, diâmetro de colmo e área foliar (Tabela 6).

Na variedade RB867515 (Figura 11) os únicos tratamentos que mantiveram respostas significativamente superiores ao controle foram à inoculação com *H. rubrisubalbicans* e inoculação com *A. amazonense*, que apresentaram incrementos significativos de matéria seca de parte aérea e matéria seca total. Porém, observou-se que a inoculação com *B. tropica* condicionou uma produção de biomassa significativamente inferior ao controle após 44 dias de cultivo (matéria seca de parte aérea e matéria seca total), sendo este resultado diferente do esperado, uma vez que a espécie *B. tropica* elevou significativamente a velocidade de brotação das plantas na fase de germinação, indicando que o crescimento inicial não necessariamente representa a resposta final da planta à inoculação. Não houve diferença

estatística entre os tratamentos na produção de raiz e na relação raiz/parte aérea (Figura 11), porém para estas variáveis a maior média foi observada no tratamento controle.

Tabela 6. Altura de parte aérea (ALT), diâmetro de colmo (DC) e área foliar (AF) nas variedades RB867515 e IACSP95-5000 após inoculação mista e individual com bactérias diazotróficas.

Tratamentos	RB867515			IACSP95-5000		
	ALT (cm)	DC (cm)	AF (cm ²)	ALT (cm)	DC (cm)	AF (cm ²)
Controle	11,73	0,90	106,30	8,92	0,84	61,07
Inoc. Mista	11,12	0,93	98,62	9,45	0,81	73,51
Gd	11,46	0,88	136,24	9,90	0,90	72,97
Hr	12,26	0,82	95,19	10,41	0,95	71,26
Hs	12,26	0,78	63,66	10,67	0,82	115,38
Aa	12,66	0,90	113,27	11,25	0,93	79,27
Bt	10,63	0,77	80,58	10,58	0,93	85,66
CV%	9,48	10,08	34,93	9,61	15,66	38,55

Inoculação Mista (mistura das cinco estirpes); Gd (*G. diazotrophicus*); Hs (*H. seropedicae*); Hr (*H. rubrisubalbicans*); Aa (*A. amazonense*) e Bt (*Burkholderia tropica*). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

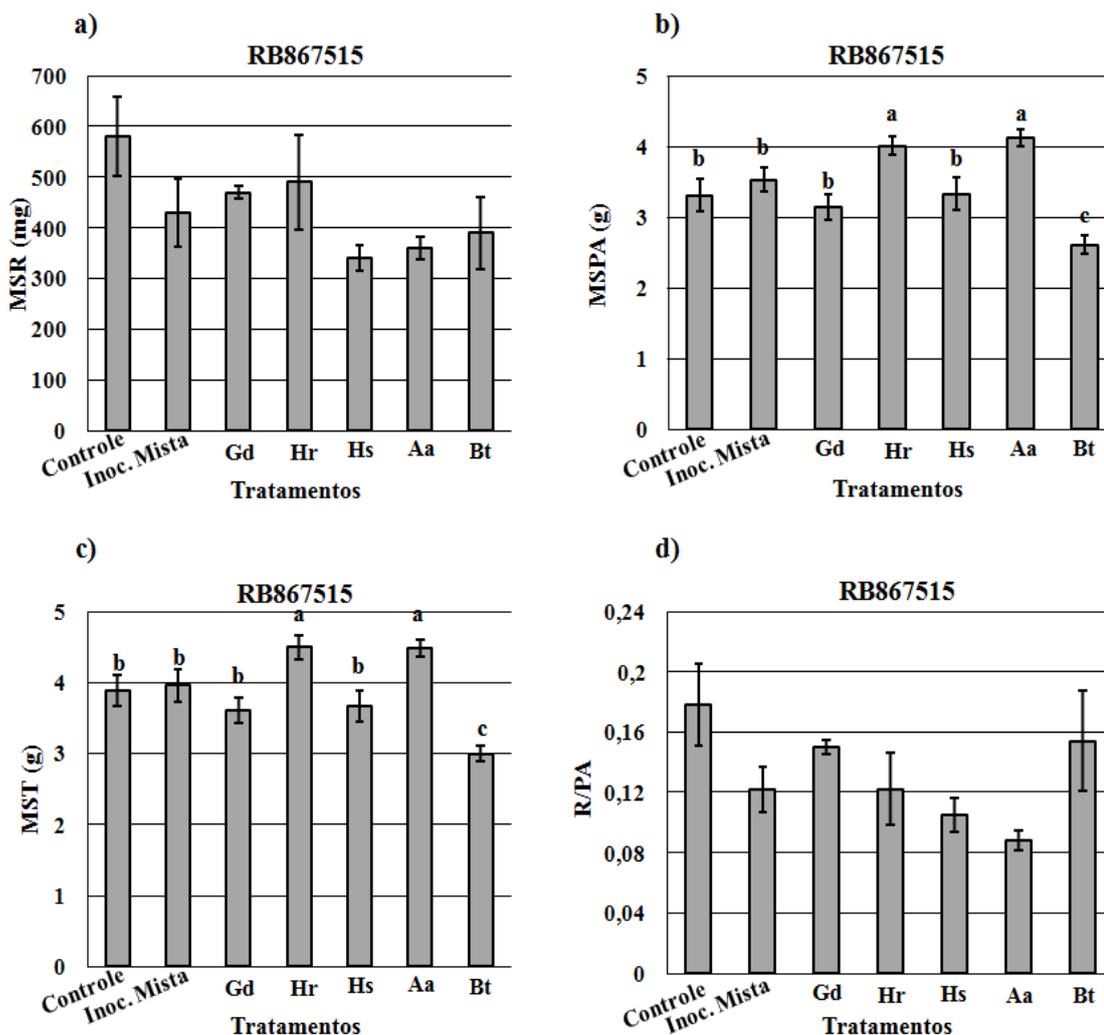


Figura 11. Variedade RB867515 após 44 dias de cultivo. a) Matéria seca de raiz (MSR); b) Matéria seca de parte aérea (MSPA); c) Matéria seca total (MST); d) Relação raiz/parte aérea (R/PA). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 26,45; b) 10,08; c) 9,12; d) 31,36.

A inibição da produção de biomassa pelo gênero *Burkholderia* já foi observada por OLIVEIRA et al. (2002), quando *Burkholderia sp* e *A. amazonense* foram inoculadas em plantas micropropagadas da variedade de cana-de-açúcar SP70-1143, levando a redução significativa de biomassa em relação ao controle. O excesso de reguladores de crescimento produzidos por bactérias diazotróficas pode inibir o crescimento de plantas (SPAEPEN et al., 2007), dessa forma em ambos os casos a inoculação com o gênero *Burkholderia* pode ter provocado um estresse hormonal que ao longo do tempo prejudicou o crescimento da planta. A redução na produção de biomassa de cana-de-açúcar já foi observada não apenas com a inoculação individual das bactérias utilizadas neste estudo, mas também com a inoculação conjunta das mesmas, inclusive quando inoculadas na variedade RB867515 (CHAVES et al., 2012, 2013; MARQUES JUNIOR et al., 2008; OLIVEIRA, et al., 2002), indicando que existe uma interação complexa entre essas bactérias e a planta, podendo em alguns casos levar a resultados indesejados.

Os resultados da coleta aos 44 dias para variedade IACSP95-5000 (Figura 12) mostram que a inoculação com *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* aumentaram significativamente a produção de massa seca de raiz em relação aos demais tratamentos.

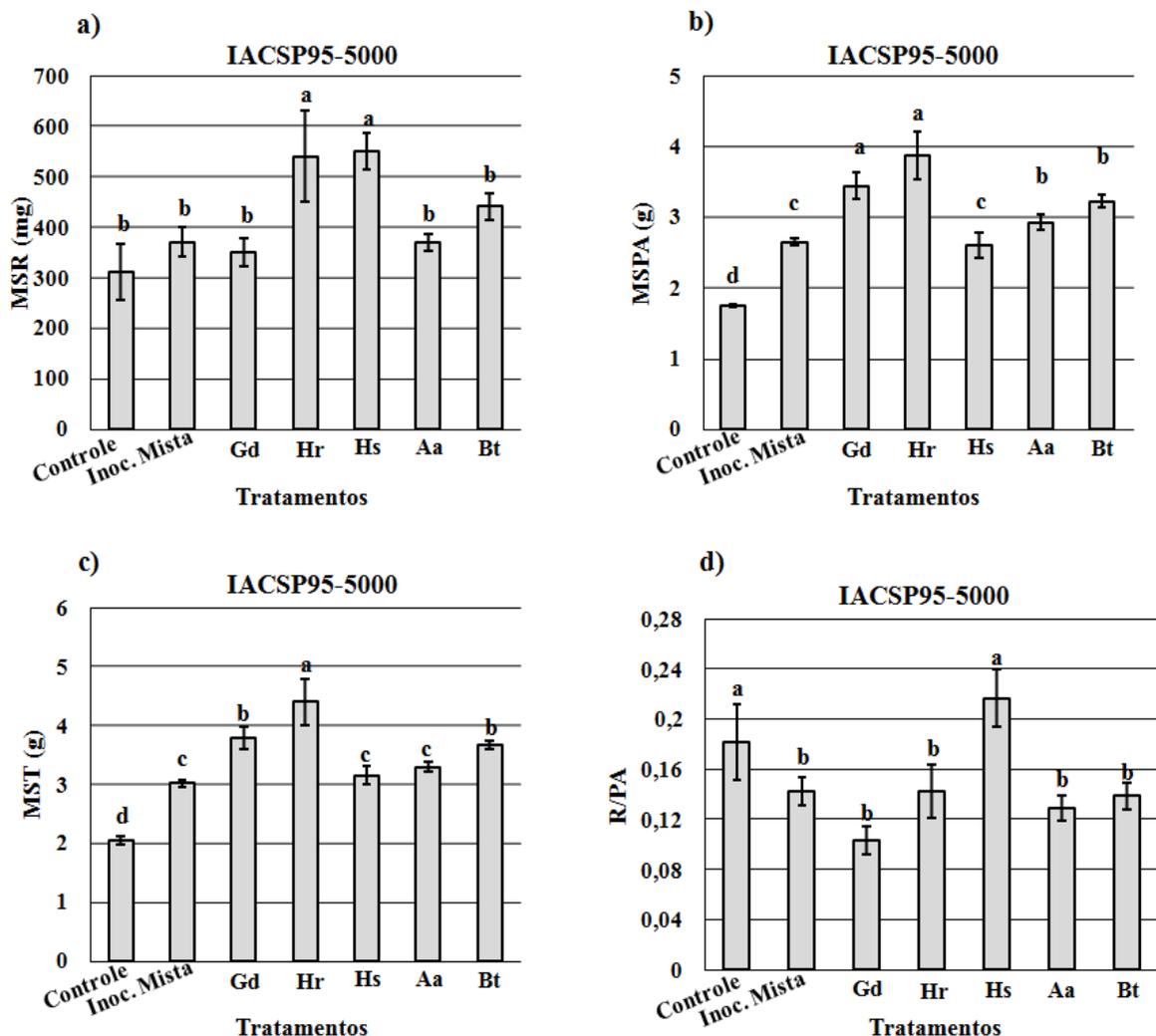


Figura 12. Variedade IACSP95-5000 após 44 dias de cultivo. a) Matéria seca de raiz (MSR); b) Matéria seca de parte aérea (MSPA); c) Matéria seca total (MST); d) Relação raiz/parte aérea (R/PA). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 23,52; b) 12,5; c) 11,36; d) 25,91.

Na produção de massa seca de parte aérea e massa seca total, todos os tratamentos foram significativamente superiores ao controle (Figura 12), porém os tratamentos que apresentaram os melhores resultados foram à inoculação com *G. diazotrophicus* (massa seca de parte aérea) e inoculação com *H. rubrisubalbicans* (massa seca de parte aérea e massa seca total), mostrando que o efeito da inoculação dessas duas estirpes foi positivo desde a fase de germinação, aumentando significativamente a velocidade de brotação e por fim o incremento de biomassa. A relação raiz/parte aérea foi significativamente superior no tratamento controle e inoculação com *H. seropedicae* em virtude da menor produção de parte aérea nesses tratamentos. Outros autores já obtiveram ganhos significativos de biomassa em cana-de-açúcar com a inoculação individual de estirpes diazotróficas: MARQUES JUNIOR et al. (2008) inocularam *H. seropedicae* em minitoletes da var. RB72454 tratados termicamente e observaram aumento significativo de matéria seca de raiz e parte aérea após 45 dias de cultivo em casa de vegetação; OLIVEIRA et al. (2002) inocularam *G. diazotrophicus* em plantas micropropagadas da var. SP 70-1143, obtendo incremento significativo de biomassa após 45 dias de cultivo em casa de vegetação. Estes resultados são evidências de que a inoculação de uma única estirpe na cana-de-açúcar pode ser suficiente para a obtenção de incrementos significativos de biomassa.

Os resultados quanto ao teor de nitrogênio para as variedades RB867515 e IACSP95-5000 são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Teor de nitrogênio na parte aérea e raiz das variedades RB867515 e IACSP95-5000 após inoculação mista e individual de bactérias diazotróficas.

Tratamentos	RB867515		IACSP95-5000	
	Parte Aérea (g kg ⁻¹)	Raiz (g kg ⁻¹)	Parte Aérea (g kg ⁻¹)	Raiz (g kg ⁻¹)
Controle	10,0 b	5,2 c	7,4	3,4
Inoc. Mista	9,4 b	5,0 c	8,1	4,6
Gd	11,0 a	5,7 b	6,0	3,9
Hr	9,7 b	5,6 b	7,1	4,1
Hs	10,5 a	6,8 a	7,0	3,9
Aa	10,8 a	6,1 b	7,8	4,0
Bt	10,4 a	4,7 c	6,6	3,5
CV%	6,19	10,87	10,18	12,23

Inoculação Mista (mistura das cinco estirpes); Gd (*G. diazotrophicus*); Hs (*H. seropedicae*); Hr (*H. rubrisubalbicans*); Aa (*A. amazonense*) e Bt (*Burkholderia tropica*). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

Resultados estatisticamente superiores ao controle para o teor de N na parte aérea da var. RB867515 (Tabela 7) foram obtidos com inoculação individual de *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *A. amazonense* e *B. tropica*. Quanto ao teor de N na raiz a inoculação individual com *G. diazotrophicus*, *H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae* e *A. amazonense* foram significativamente superiores ao controle, sendo a inoculação com *H. seropedicae* superior aos demais tratamentos. Na variedade IACSP95-5000 (Tabela 7) não houve diferenças nos teores de N nas raízes e parte aérea.

A inoculação de *H. rubrisubalbicans* e *A. amazonense* aumentou significativamente o conteúdo de nitrogênio na parte aérea e biomassa total da var. RB867515 (Figura 13).

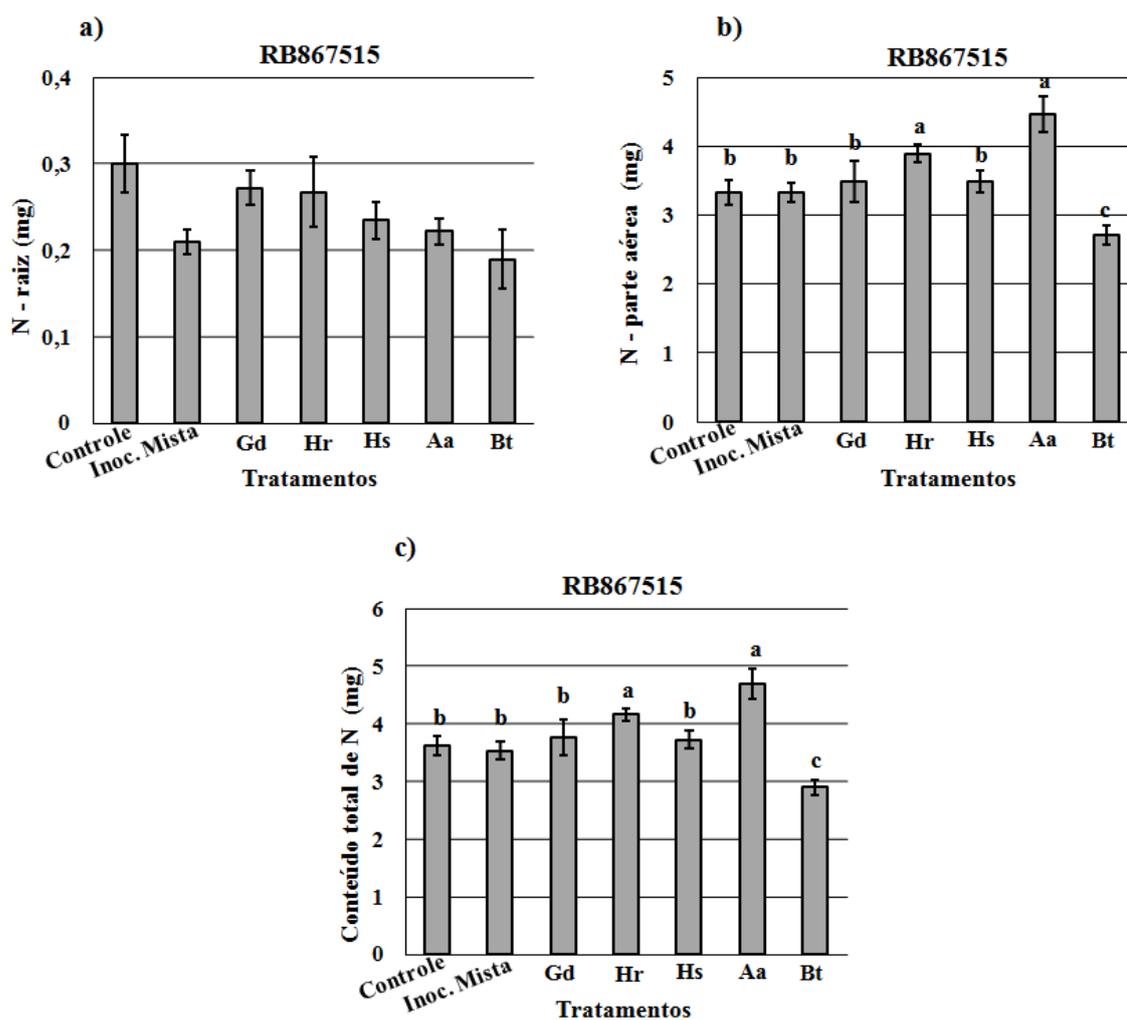


Figura 13. Variedade RB867515 após 44 dias de cultivo. a) Conteúdo de N na raiz; b) Conteúdo de N na parte aérea; c) Conteúdo total de N. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 22,9; b) 11,89; c) 10,82.

O N acumulado na variedade IACSP95-5000 (Figura 14), que representa indiretamente o maior acúmulo de massa da planta foi estatisticamente superior com a inoculação das bactérias *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*.

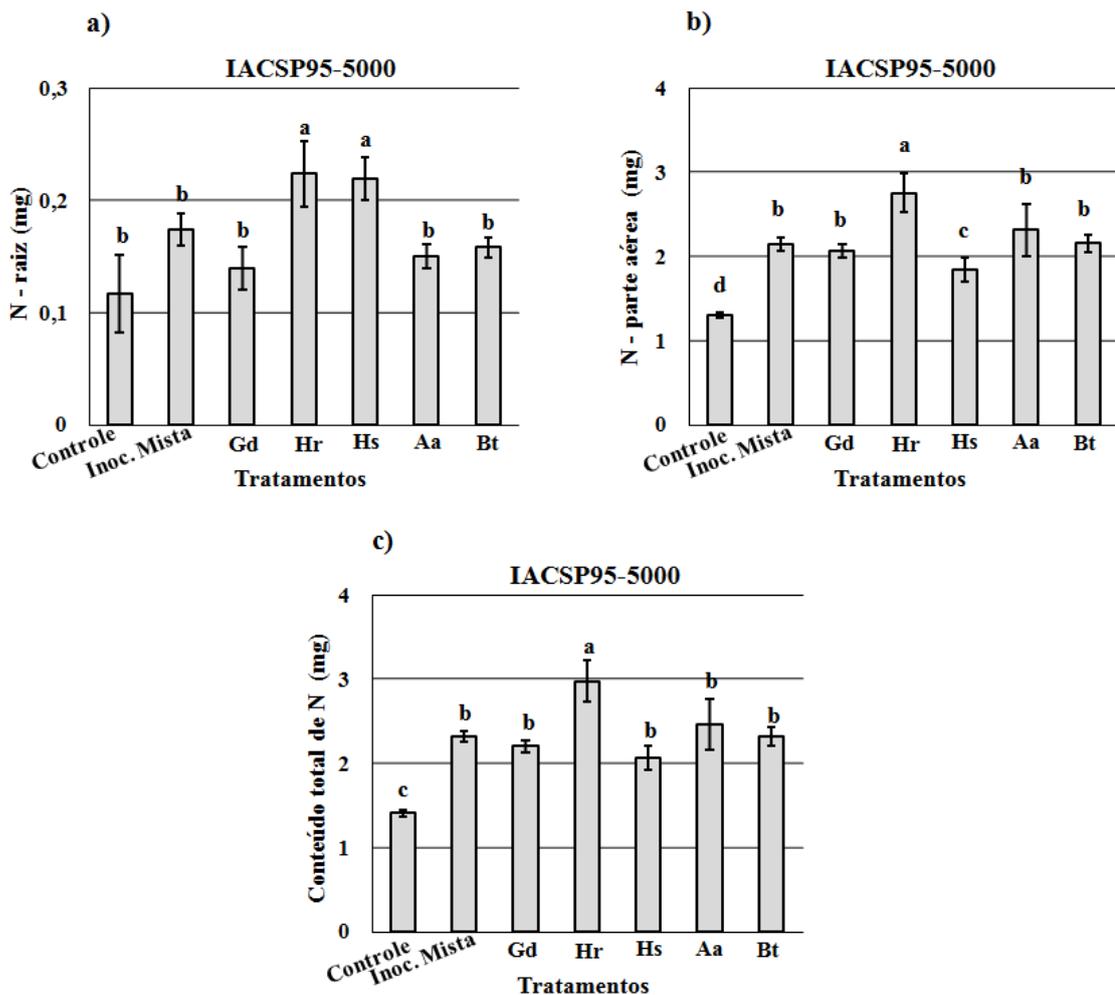


Figura 14. Variedade IACSP95-5000 após 44 dias de cultivo. a) Conteúdo de N na raiz; b) Conteúdo de N na parte aérea; c) Conteúdo total de N. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 26,35; b) 15,89; c) 14,74.

Uma vez que estes experimentos tiveram duração de 44 dias e o substrato utilizado foi areia e vermiculita (1:1 v/v) lavado e autoclavado, o nitrogênio mobilizado certamente é oriundo da reserva do próprio tolete, pois o N contido nos colmos da cana a ser plantada pode fornecer por volta de 12 kg de N por hectare (CARNEIRO et al., 1995). No início de seu desenvolvimento as plantas de cana-de-açúcar dependem das reservas da semente (tolete) para a produção dos diferentes órgãos componentes, onde novos pontos de crescimento atuam como drenos fisiológicos, acessando as reservas contidas nas células parenquimáticas do tolete por meio dos feixes vasculares (xilema e floema) (CÂMARA, 1993; MARAFON, 2012), onde num período de aproximadamente 60 dias, as reservas do tolete são fundamentais para a evolução do processo de brotação, com redução gradativa dessa dependência à medida que o sistema radicular se desenvolve aumentando à superfície ativa de absorção de água e nutrientes do solo (CASAGRANDE & VASCONCELOS, 2010). Dessa forma, até os 21 dias a partir do plantio ocorre a formação do aparato para o início da utilização das reservas com aumentos acentuados dos teores de proteína solúvel e aminoácidos livres e reduções lentas dos teores de açúcares solúveis totais e de sacarose; Dos 21 aos 42 dias ocorre utilização das reservas em ritmo acelerado, com aumento menos acentuado nos teores de proteína e

reduções acentuadas nos teores de aminoácidos, açúcares solúveis totais e de sacarose (MELO et al., 1995).

Sendo assim, as alterações observadas no teor e conteúdo de N nas duas variedades, devem-se principalmente ao estímulo hormonal ao crescimento que estas plantas receberam. Contudo, uma vez que todas as estirpes utilizadas são capazes de fixar nitrogênio atmosférico (REIS et al., 2004; CALVALCANTE & DÖBEREINER, 1988; BALDANI et al., 1986; MAGALHÃES et al., 1983), contribuições de N oriundos da FBN podem também ser responsáveis pelo maior desenvolvimento dessas plantas.

4.3 Cultivo das Variedades RB92579, RB867515 e IACSP95-5000 ao Ar Livre

4.3.1 Crescimento e acúmulo de biomassa

Os experimentos conduzidos com as variedades RB92579, RB867515 e IACSP95-5000 foram conduzidos ao ar livre na sede da Embrapa Agrobiologia (Item 3.4). Durante o cultivo das variedades RB867515, IACSP95-5000 a temperatura mínima variou de 11,4 a 24,8 °C, a máxima entre 22,4 e 36,1 °C, e a precipitação pluvial acumulada foi de 127,8 mm. Já para a var. RB92579 as condições climáticas foram: temperatura mínima entre 18,7 a 23,1 °C, temperatura máxima entre 23 a 35,8 °C, e precipitação pluvial acumulada foi de 253,2 mm. Durante esses experimentos não prevaleceram condições ambientais extremas que inviabilizassem o cultivo das plantas, conforme os estudos de necessidades climáticas para a cana-de-açúcar realizados por CAMARGO et al. (1977) e BRUNINI et al. (2007).

Nas variedades RB867515 e IACSP95-5000 (Tabela 8) não houve diferença estatística para as variáveis: clorofila; altura de parte aérea; área foliar e diâmetro de colmo. Para a var. RB92579 a inoculação aumentou significativamente a altura de parte aérea (Tabela 9).

Tabela 8. Medida indireta da clorofila (MIC), altura de parte aérea (ALT), diâmetro de colmo (DC) e área foliar (AF) nas variedades RB867515 (50 dias de cultivo) e IACSP95-5000 (56 dias de cultivo) após inoculação mista e individual com bactérias diazotróficas.

Tratamentos	RB867515				IACSP95-5000			
	MIC	ALT (cm)	DC (cm)	AF (cm ²)	MIC	ALT (cm)	DC (cm)	AF (cm ²)
Controle	32,52	13,60	1,25	293,54	30,25	14,12	1,37	470,25
Inoc. Mista	28,50	12,62	1,20	309,56	31,42	14,30	1,27	438,31
Gd	29,94	12,12	1,20	256,08	35,30	14,87	1,37	429,85
Hr	30,03	11,12	1,17	239,53	30,55	16,37	1,47	502,83
Hs	31,57	13,54	1,35	311,58	32,59	15,97	1,45	502,21
Aa	30,10	12,07	1,25	244,78	32,32	11,30	1,17	343,33
Bt	29,51	11,00	1,17	253,96	29,43	13,92	1,37	543,98
CV%	11,86	12,70	12,62	19,62	12,47	15,42	9,58	16,01

Inoculação Mista (mistura das cinco estirpes); Gd (*G. diazotrophicus*); Hs (*H. seropedicae*); Hr (*H. rubrisubalbicans*); Aa (*A. amazonense*) e Bt (*Burkholderia tropica*). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

Tabela 9. Altura de planta (ALT) e medida indireta da clorofila (MIC) na variedade RB92579 (58 dias de cultivo) inoculada com bactérias diazotróficas.

Tratamentos	ALT (cm)	MIC
Inoc. mista	99,75 a	29,21 a
Controle	91,56 b	30,97 a
CV%	5,33	12,25

Inoculação Mista (mistura das cinco estirpes); Gd (*G. diazotrophicus*); Hs (*H. seropedicae*); Hr (*H. rubrisubalbicans*); Aa (*A. amazonense*) e Bt (*Burkholderia tropica*). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

Na variedade RB867515 não houve respostas significativas à inoculação na produção raiz, parte aérea e biomassa total (Figura 15). Para a var. IACSP95-5000 observou-se diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 16), onde a inoculação com *A. amazonense* reduziu significativamente a produção de biomassa de raiz, parte aérea e biomassa total. Conforme mencionado anteriormente, resultados obtidos por OLIVEIRA et al. (2002) demonstraram redução significativa de matéria seca em plantas micropropagadas da var. SP 70-1143, após a inoculação conjunta de *Burkholderia sp* e *A. amazonense*. É possível que em determinadas condições essas duas espécies produzam reguladores de crescimento em excesso, inibindo o crescimento inicial das plantas. Particularmente para o gênero *Azospirillum*, um experimento *in vitro* realizado por RADWAN et al. (2004) demonstrou que estirpes de *Azospirillum* produziram de três a sete vezes mais compostos indólicos que as de *Herbaspirillum*, sendo constatado por estes autores que o gênero *Herbaspirillum* possui um caminho metabólico diferente ou menos eficiente para a produção de indóis que o apresentado por *Azospirillum*, resultando em uma produção bem menor de auxinas. Conforme observado por estes autores, o comprimento das raízes de trigo e a área radicular foram reduzidos pela inoculação de *Azospirillum*. Como a inoculação é feita com bactérias que produzem elevadas quantidades de reguladores de crescimento, o excesso destas substâncias pode inibir o crescimento inicial quando aplicadas em doses elevadas (SPAEPEN et al., 2007).

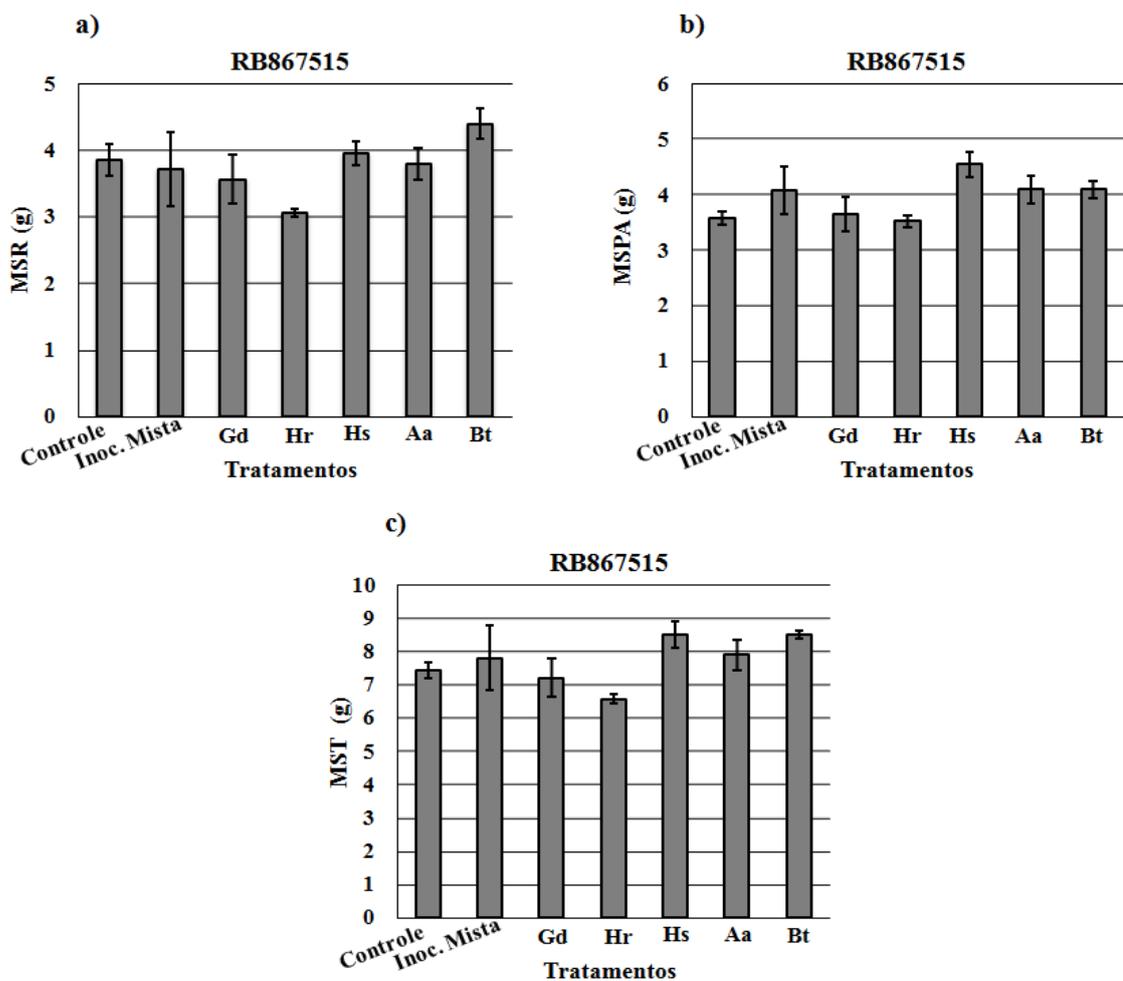


Figura 15. Variedade RB867515 após 50 dias de cultivo. a) Matéria seca de raiz (MSR); b) Matéria seca de parte aérea (MSPA); c) Matéria seca total (MST). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 16,13; b) 12,66; c) 13,06.

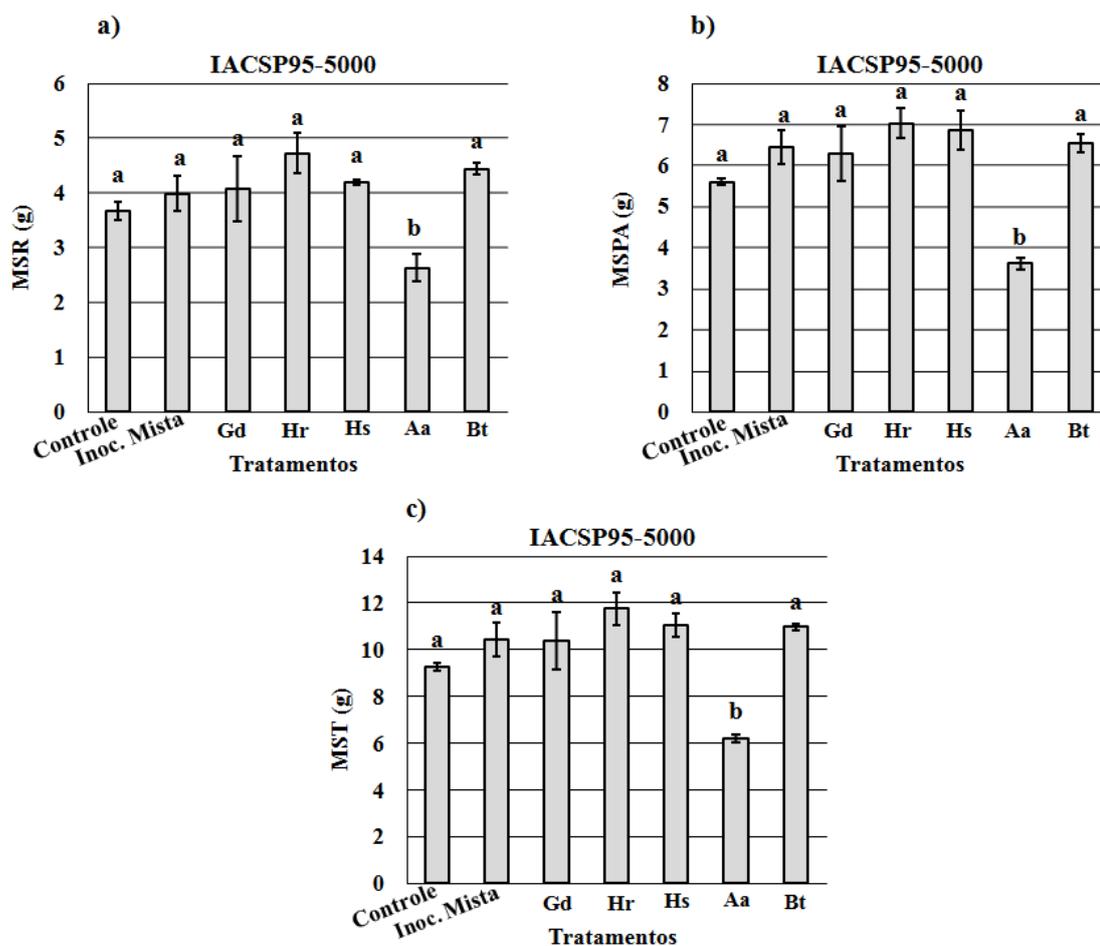


Figura 16. Variedade IACSP95-5000 após 56 dias de cultivo. a) Matéria seca de raiz (MSR); b) Matéria seca de parte aérea (MSPA); c) Matéria seca total (MST). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 15,88; b) 12,85; c) 12,63.

Os resultados aqui apresentados demonstram que as espécies *A. amazonense* e *B. tropica* foram as únicas a suprimir o desenvolvimento das plantas (variedade RB867515 em casa de vegetação e variedade IACSP95-5000 ao ar livre), assemelhando-se aos resultados obtidos por OLIVEIRA et al. (2002).

Na var. RB92579 não foi feita a comparação entre as estirpes inoculadas individualmente, apenas a mistura das cinco (Figura 17). Os resultados obtidos na etapa de cultivo das plantas em amostras de terra enriquecidas com ^{15}N mostram que as plantas inoculadas com bactérias diazotróficas obtiveram incremento significativo de matéria seca de parte aérea e matéria seca total (Figura 17 e Figura 18). Os minitoletes da var. RB92579 foram pré-germinados em substrato estéril em casa de vegetação após a inoculação. Já os minitoletes das variedades RB867515 e IACSP95-5000 depois de inoculados foram plantados em vasos com terra não estéril. Sendo assim, a oscilação das condições climáticas ao ar livre, as características físico-químicas do substrato e competição com outros microrganismos pode ter contribuído para que os resultados das variedades RB867515 (Figura 15) e IACSP95-5000 (Figura 16) cultivadas ao ar livre em vasos com terra tenham sido diferentes dos resultados observados quando as mesmas foram cultivadas em casa de vegetação com umidade e temperatura controladas.

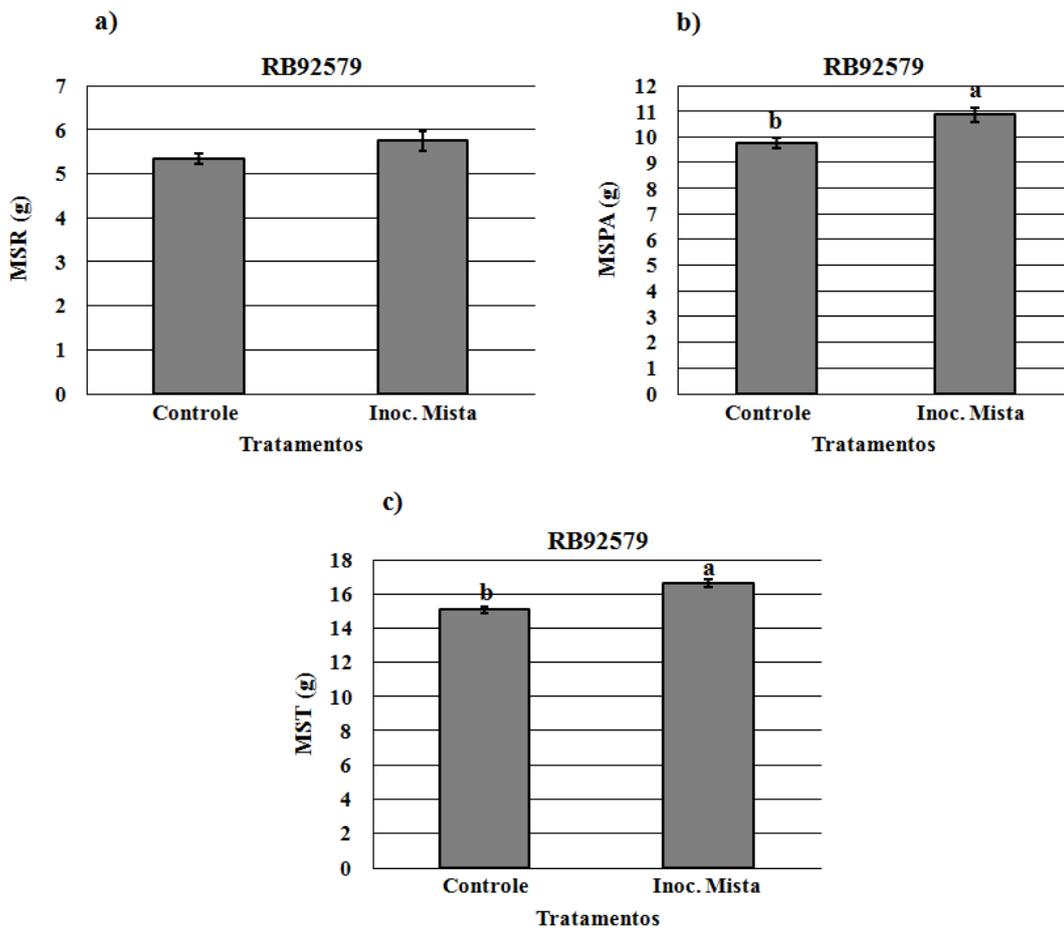


Figura 17. Variedade RB92579 após 58 dias de cultivo. a) Matéria seca de raiz (MSR); b) Matéria seca de parte aérea (MSPA); c) Matéria seca total (MST). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 9,14; b) 7,41; c) 6,34.



Figura 18. Comparação entre o tratamento inoculado (inoc. Mista) e não inoculado (controle) da variedade RB92579 após 58 dias de cultivo.

4.3.2 Acúmulo de nitrogênio

O teor de N na var. RB867515 (Tabela 10) aumentou significativamente na parte aérea com a inoculação de *A. amazonense*, porém nas raízes os teores foram semelhantes entre os tratamentos. Já para var. IACSP95-5000 (Tabela 10), os teores de N na parte aérea foram significativamente superiores no tratamento controle e inoculação mista, também não houve diferença estatística no teor de N da raiz.

Tabela 10. Efeito da inoculação mista e individual de bactérias diazotróficas sobre o teor de N nas variedades RB867515 (50 dias de cultivo) e IACSP95-5000 (56 dias de cultivo).

Tratamento	Teor de Nitrogênio (g kg ⁻¹)			
	RB867515		IACSP95-5000	
	Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea
Controle	5,60	7.87 b	4,55	8,57 a
Inoc. Mista	5,07	9.10 b	5,07	8,57 a
Gd	4,72	7.70 b	5,77	6,82 b
Hr	4,90	9.10 b	5,07	6,30 b
Hs	5,07	8.92 b	5,60	7,00 b
Aa	5,07	11.20 a	5,42	7,35 b
Bt	4,90	8.05 b	5,77	7,00 b
CV%	14,51	13,43	16,42	12,64

Inoculação Mista (mistura das cinco estirpes); Gd (*G. diazotrophicus*); Hs (*H. seropedicae*); Hr (*H. rubrisubalbicans*); Aa (*A. amazonense*) e Bt (*Burkholderia tropica*). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

Na var. RB92579 (Tabela 11) não houve diferença estatística entre os tratamentos quanto ao teor de N na raiz e parte aérea. A marcação de ¹⁵N também não diferiu entre os tratamentos mostrando que a inoculação não modificou a taxa de contribuição do N advindo do ar nesta fase inicial de crescimento, o que em parte pode ser explicado pelo alto teor de N do solo (Tabela 4) que favorece a absorção de N pelas raízes em lugar da FBN.

Tabela 11. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas sobre o teor de nitrogênio e %¹⁵N na variedade RB92579.

Tratamento	NR	NPA	% ¹⁵ N	% ¹⁵ N
	(g hg ⁻¹)	(g hg ⁻¹)	R	PA
Controle	4,9 a	7,4 a	0,14 a	0,16 a
Inoc. mista	5,2 a	7,2 a	0,14 a	0,15 a
CV%	14,29	6,30	5,54	3,27

Inoculação Mista (mistura das cinco estirpes): Gd (*G. diazotrophicus*); Hs (*H. seropedicae*); Hr (*H. rubrisubalbicans*); Aa (*A. amazonense*) e Bt (*Burkholderia tropica*). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

O acúmulo de N na var. RB867515 é apresentado a seguir na Figura 19.

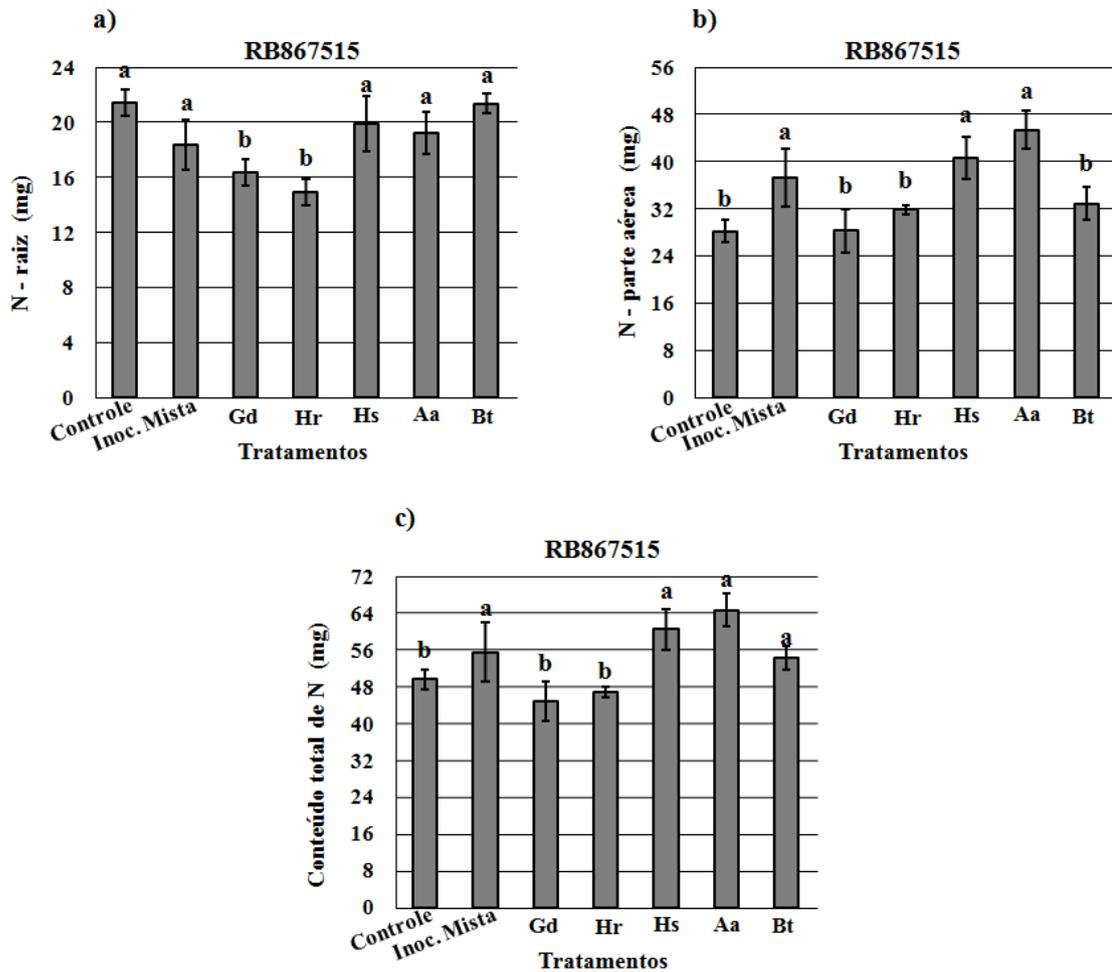


Figura 19. Variedade RB867515 após 50 dias de cultivo. a) Conteúdo de N na raiz; b) Conteúdo de N na parte aérea; c) Conteúdo total de N. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 14,48; b) 18,46; c) 14,3.

A inoculação de *G. diazotrophicus* e *H. rubrisubalbicans* reduziu significativamente o conteúdo de N no sistema radicular, e foi estatisticamente igual ao controle na parte aérea e biomassa total da var. RB867515 (Figura 19). Contudo, nesta mesma variedade a inoculação mista das cinco estirpes e a inoculação de *A. amazonense* e *H. seropedicae* aumentaram significativamente o conteúdo de N na parte aérea e na biomassa total, onde a inoculação com *B. tropica* também foi significativamente superior ao controle.

Na var. IACSP95-5000 (Figura 20) com exceção da inoculação com *B. tropica*, todos os demais tratamentos aumentaram significativamente o conteúdo de N na raiz. Na parte aérea e biomassa total, a inoculação com *A. amazonense* reduziu significativamente o conteúdo de N.

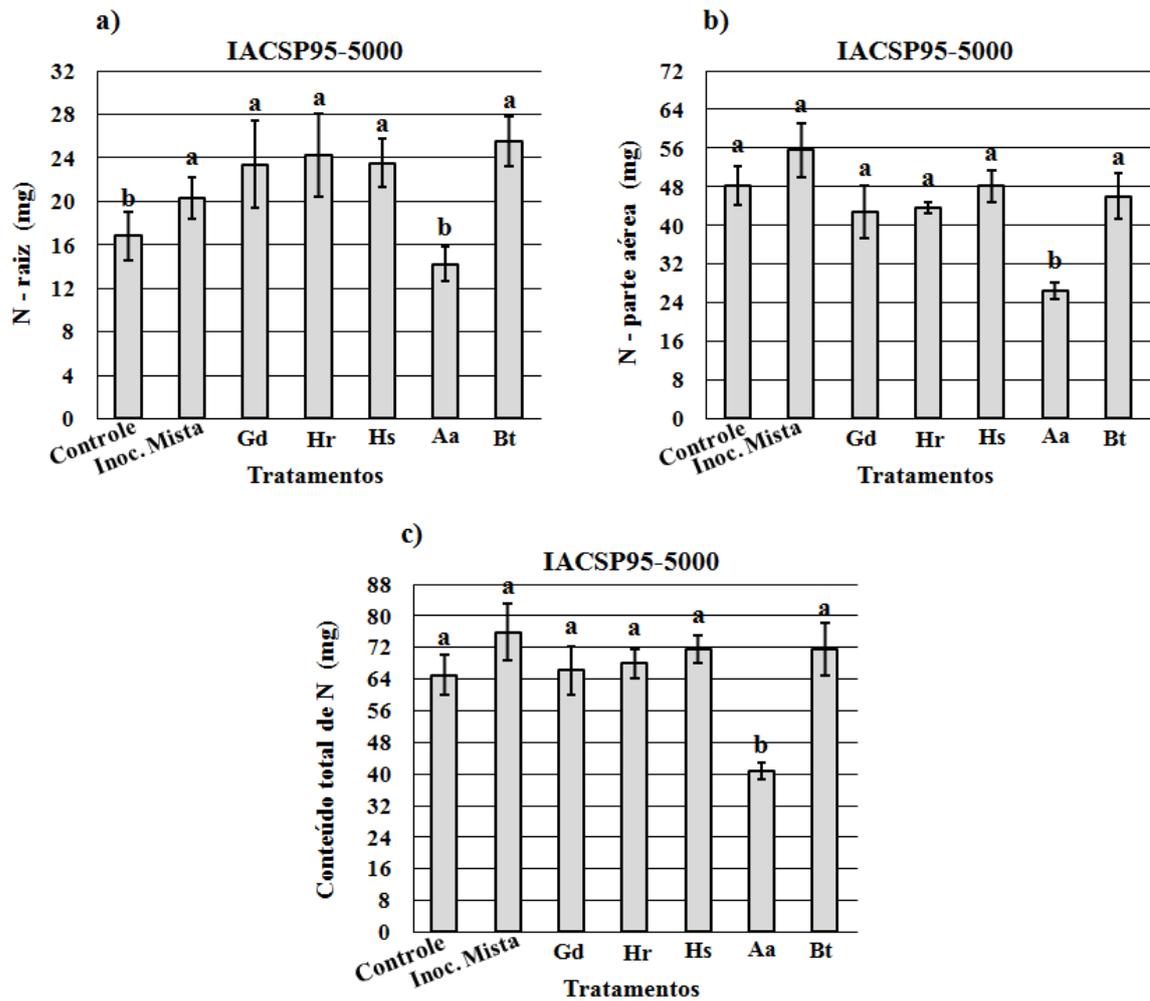


Figura 20. Variedade IACSP95-5000 após 56 dias de cultivo. a) Conteúdo de N na raiz; b) Conteúdo de N na parte aérea; c) Conteúdo total de N. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 25,68; b) 18,18; c) 15,94.

Para a variedade RB92579 (Figura 21) a inoculação aumentou significativamente o conteúdo de N na parte aérea e biomassa total.

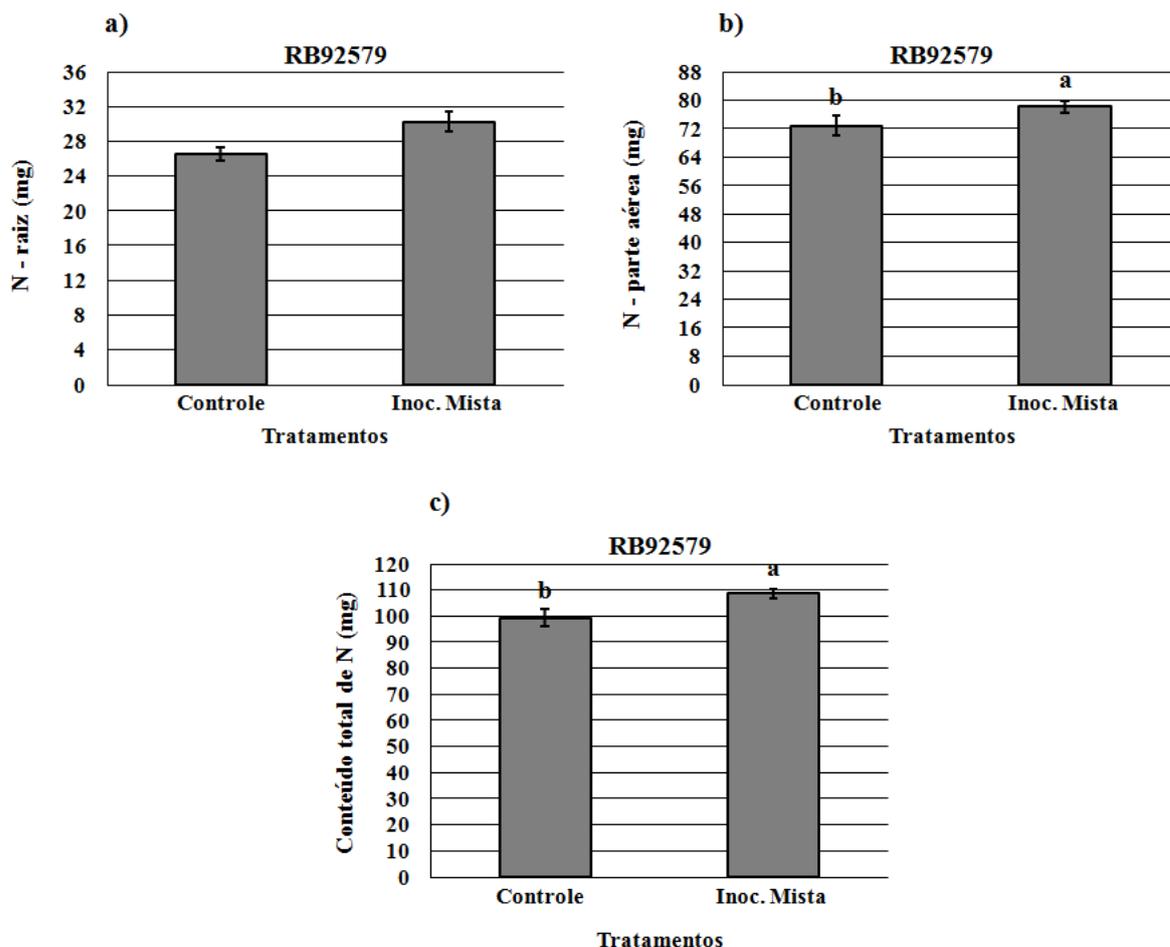


Figura 21. Variedade RB92579 após 58 dias de cultivo. a) Conteúdo de N na raiz; b) Conteúdo de N na parte aérea; c) Conteúdo total de N. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 14,38; b) 8,99; c) 9,38.

O conteúdo médio de N observado nas amostras de plantio das variedades RB92579, RB867515 e IACSP95-5000 apresentados na Tabela 2 (Item 3.2), foram respectivamente 11,58 mg, 67,24 mg e 56,35 mg de N. Uma vez que o conteúdo total de N acumulado na biomassa da var. RB867515 apresentou um valor menor ao da amostra de plantio em todos os tratamentos, é possível que o conteúdo de N no minitolete tenha sido a principal fonte do N acumulado na biomassa. O conteúdo total de N das variedades IACSP95-5000 (Figura 20) e RB92579 (Figura 21) foram superiores aos das amostras de plantio, indicando que além das reservas do minitolete, estas plantas absorveram nitrogênio do solo.

O aumento na produção de matéria seca de raízes resulta em maior superfície específica de raízes, refletindo em maior exploração do volume de solo e, conseqüentemente, maior absorção de água e nutrientes (FRANCO et al., 2007). Embora inicialmente a cana-de-açúcar dependa das reservas do tolete para iniciar o seu desenvolvimento, essa dependência tende a se tornar menor a medida que as raízes se desenvolvem pois tem a função de suprir os perfilhos recém-brotados com água e nutrientes do solo, e a medida que os perfilhos vão crescendo e tornando-se colmos, essas raízes tendem a desaparecer (VASCONCELOS & CASAGRANDE, 2010; CASAGRANDE & VASCONCELOS, 2010).

Uma vez que a inoculação com bactérias promotoras de crescimento contribua para aumentar a capacidade das plantas em absorver N, isso poderá representar um grande

benefício no sistema de produção de cana-de-açúcar especialmente em solos de baixa fertilidade, devido ao importante papel fisiológico que o nitrogênio desempenha na cultura da cana-de-açúcar quanto à composição de aminoácidos, proteínas, enzimas e ácidos nucleicos (MALAVOLTA et al., 1989). Contudo, é preciso ressaltar que contribuições oriundas da FBN também podem ser responsáveis pelos resultados observados para as variedades RB867515 (Figura 20) e IACSP95-5000 (Figura 21) (CALVALCANTE & DÖBEREINER, 1988; BALDANI et al., 1986; MAGALHÃES et al., 1983; REIS et al., 2004).

4.3.3 Acúmulo de potássio

Não houve diferença significativa no teor de K entre os tratamentos aplicados nas variedades RB867515 e IACSP95-5000 (Tabela 12).

Tabela 12. Efeito da inoculação mista e individual de bactérias diazotróficas sobre o teor de K nas variedades RB867515 (50 dias de cultivo) e IACSP95-5000 (56 dias de cultivo).

Tratamento	Teor de Potássio (g kg ⁻¹)			
	RB867515		IACSP95-5000	
	Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea
Controle	7,72	16,85	12,65	19,12
Inoc. Mista	8,37	17,52	12,17	16,90
Gd	8,40	17,87	14,02	21,60
Hr	9,02	19,27	12,00	18,10
Hs	9,02	17,05	10,87	20,15
Aa	9,20	16,90	12,50	19,30
Bt	8,22	16,70	10,85	19,62
CV%	8,11	9,24	12,28	12,53

Inoculação Mista (mistura das cinco estirpes); Gd (*G. diazotrophicus*); Hs (*H. seropedicae*); Hr (*H. rubrisubalbicans*); Aa (*A. amazonense*) e Bt (*Burkholderia tropica*). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

Na var. RB92579 o teor de K na raiz e parte aérea foi significativamente superior no tratamento controle (Tabela 13).

Tabela 13. Teor de potássio na raiz e parte aérea da variedade RB92579 (58 dias de cultivo) inoculada com bactérias diazotróficas.

Tratamentos	Teor de Potássio (g kg ⁻¹)	
	Raiz	Parte aérea
Inoc. Mista	16,60 b	20,90 b
Controle	18,00 a	23,50 a
CV%	11,43	4,03

Inoculação Mista (mistura das cinco estirpes); Gd (*G. diazotrophicus*); Hs (*H. seropedicae*); Hr (*H. rubrisubalbicans*); Aa (*A. amazonense*) e Bt (*Burkholderia tropica*). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

O acúmulo de potássio não foi diferente entre os tratamentos aplicados a variedade RB867515 (Figura 22).

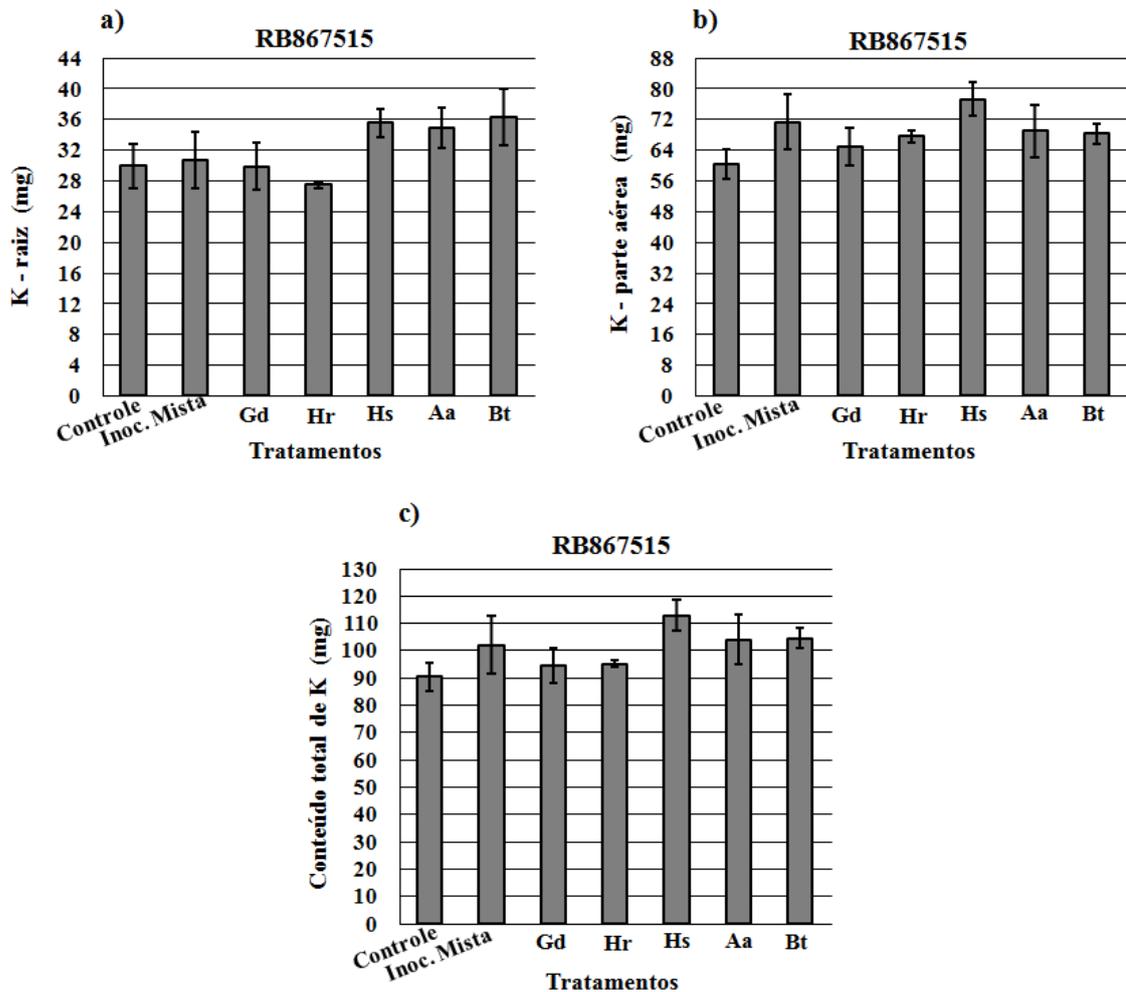


Figura 22. Variedade RB867515 após 50 dias de cultivo. a) Conteúdo de K na raiz; b) Conteúdo de K na parte aérea; c) Conteúdo total de K. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 17,54; b) 15,05; c) 13,35.

Para var. IACSP95-5000 (Figura 23) a inoculação com *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *B. tropica*, aumentou significativamente o conteúdo desse nutriente na parte aérea e biomassa total da planta. Por outro lado, a inoculação de *A. amazonense*, reduziu significativamente o conteúdo de K na raiz, parte aérea e biomassa total em razão de ter inibido o crescimento das plantas.

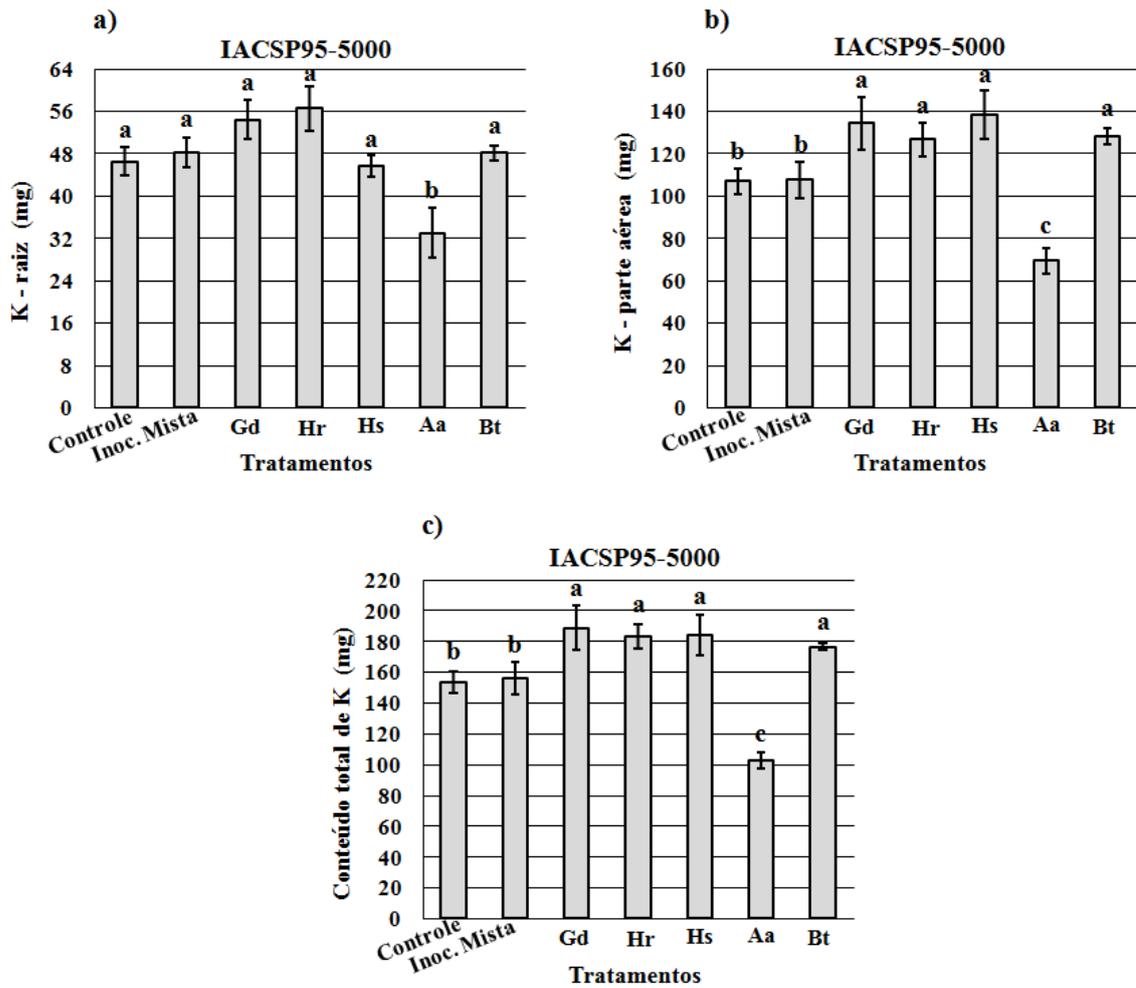


Figura 23. Variedade IACSP95-5000 após 56 dias de cultivo. a) Conteúdo de K na raiz; b) Conteúdo de K na parte aérea; c) Conteúdo total de K. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 13,73; b) 14,66; c) 11,68.

Na var. RB92579 os resultados mostram que só houve alteração significativa no teor de K (Tabela 13), onde o teor desse nutriente no tratamento controle foi significativamente superior ao tratamento com inoculação mista das cinco estirpes. O acúmulo de potássio na raiz, parte aérea e biomassa total também apresentaram valores mais altos no tratamento controle para esta variedade, porém não foram estatisticamente significativos.

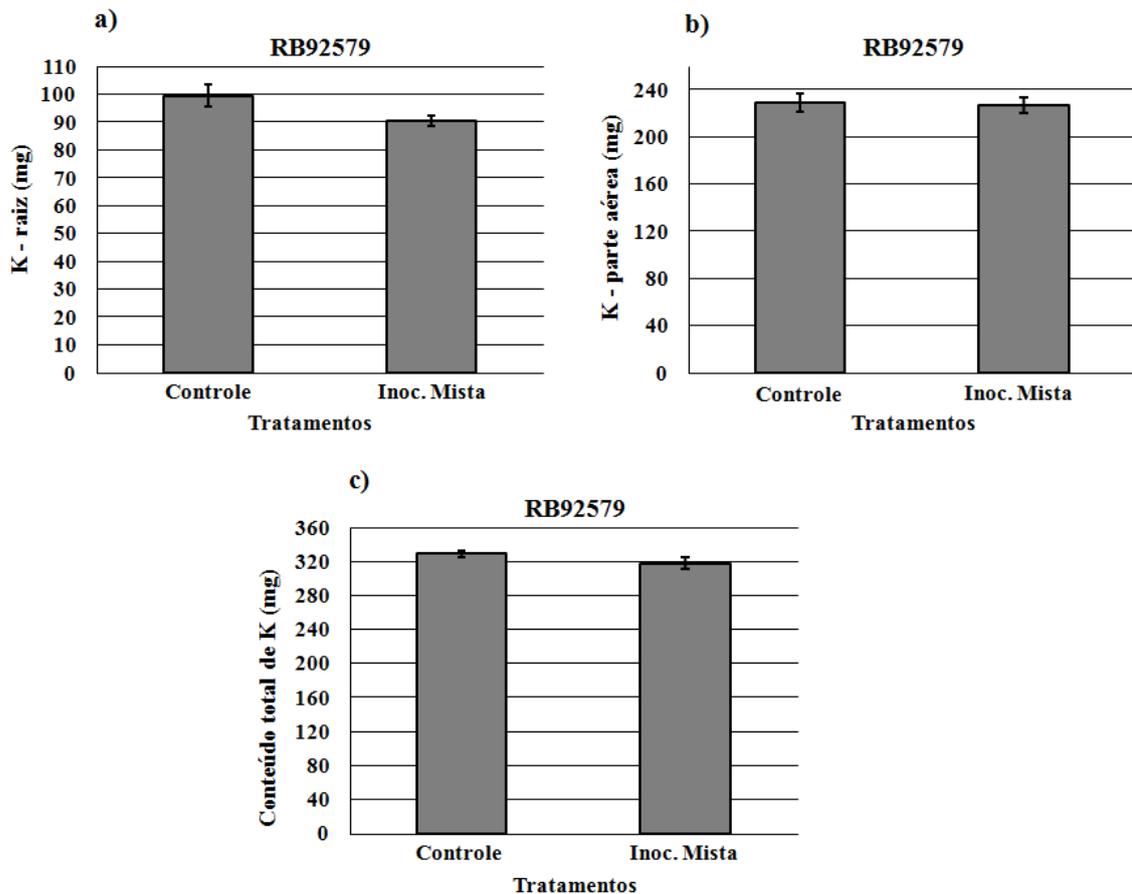


Figura 24. Variedade RB92579 após 58 dias de cultivo. a) Conteúdo de K na raiz; b) Conteúdo de K na parte aérea; c) Conteúdo total de K. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 11,63; b) 9,67; c) 8,99.

Teores adequados de K aumentam a sacarose na cana-de-açúcar (HAUCK & DICKINSON, 1954 Apud COSTA et al., 2007), pois o potássio contribui para a formação de um gradiente de potencial osmótico entre fonte e dreno, auxiliando no transporte de açúcares via floema e de célula a célula. Por outro lado, teores elevados de potássio podem aumentar conteúdo de cinzas que prejudicam a cristalização do açúcar diminuindo o rendimento do processo industrial ou reduzir o teor de sacarose (RODRIGUES, 2007; ESPIRONELO et al., 1987). Os constituintes das cinzas do caldo também podem ter um efeito benéfico agindo como fonte de nutrientes no processo fermentativo, aumentando a velocidade de desdobramento dos açúcares em álcool, o que favorece a fabricação de etanol (COSTA et al., 2007). Dessa forma, o aumento da absorção de potássio como resultado da inoculação de bactérias diazotróficas é importante do ponto de vista nutricional especialmente em solos de baixa fertilidade, porém o excesso de potássio pode ter efeitos indesejados na produção da cana-de-açúcar, pois o mesmo é o macronutriente mais extraído pela cana-de-açúcar e pode diminuir a concentração de sacarose e atrasar a maturação (REIS JUNIOR, 2001; ROSSETO et al., 2010).

4.3.4 Acúmulo de fósforo

A inoculação com bactérias diazotróficas não foi estatisticamente diferente do controle quanto ao teor de P na raiz e parte aérea para as variedades RB867515 e IACSP95-5000 (Tabela 14) e var. RB92579 (Tabela 15).

Tabela 14. Efeito da inoculação mista e individual de bactérias diazotróficas sobre o teor de P nas variedades RB867515 (50 dias de cultivo) e IACSP95-5000 (56 dias de cultivo).

Tratamento	Teor de Fósforo (g kg ⁻¹)			
	RB867515		IACSP95-5000	
	Raiz	Parte aérea	Raiz	Parte aérea
Controle	0,70	1,65	1,29	1,85
Inoc. Mista	0,73	1,56	1,26	1,96
Gd	0,68	1,61	1,42	2,05
Hr	0,69	1,58	1,37	1,77
Hs	0,67	1,67	1,25	1,92
Aa	0,69	1,67	1,49	2,14
Bt	0,69	1,63	1,31	1,98
CV%	10,07	11,51	17,31	13,74

Inoculação Mista (mistura das cinco estirpes); Gd (*G. diazotrophicus*); Hs (*H. seropedicae*); Hr (*H. rubrisubalbicans*); Aa (*A. amazonense*) e Bt (*Burkholderia tropica*). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

Tabela 15. Teor de P na raiz e parte aérea da variedade RB92579 (58 dias de cultivo) inoculada com bactérias diazotróficas.

Tratamentos	Teor de Fósforo (g kg ⁻¹)	
	Raiz	Parte aérea
Inoc. Mista	1,24	1,57
Controle	1,21	1,57
CV%	19,15	2,96

Inoculação Mista (mistura das cinco estirpes): Gd (*G. diazotrophicus*); Hs (*H. seropedicae*); Hr (*H. rubrisubalbicans*); Aa (*A. amazonense*) e Bt (*Burkholderia tropica*). Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

O acúmulo de P na var. RB867515 não foi estatisticamente diferente entre os tratamentos (Figura 25), provavelmente em virtude da produção de biomassa também não ter sido significativamente afetada pelos tratamentos.

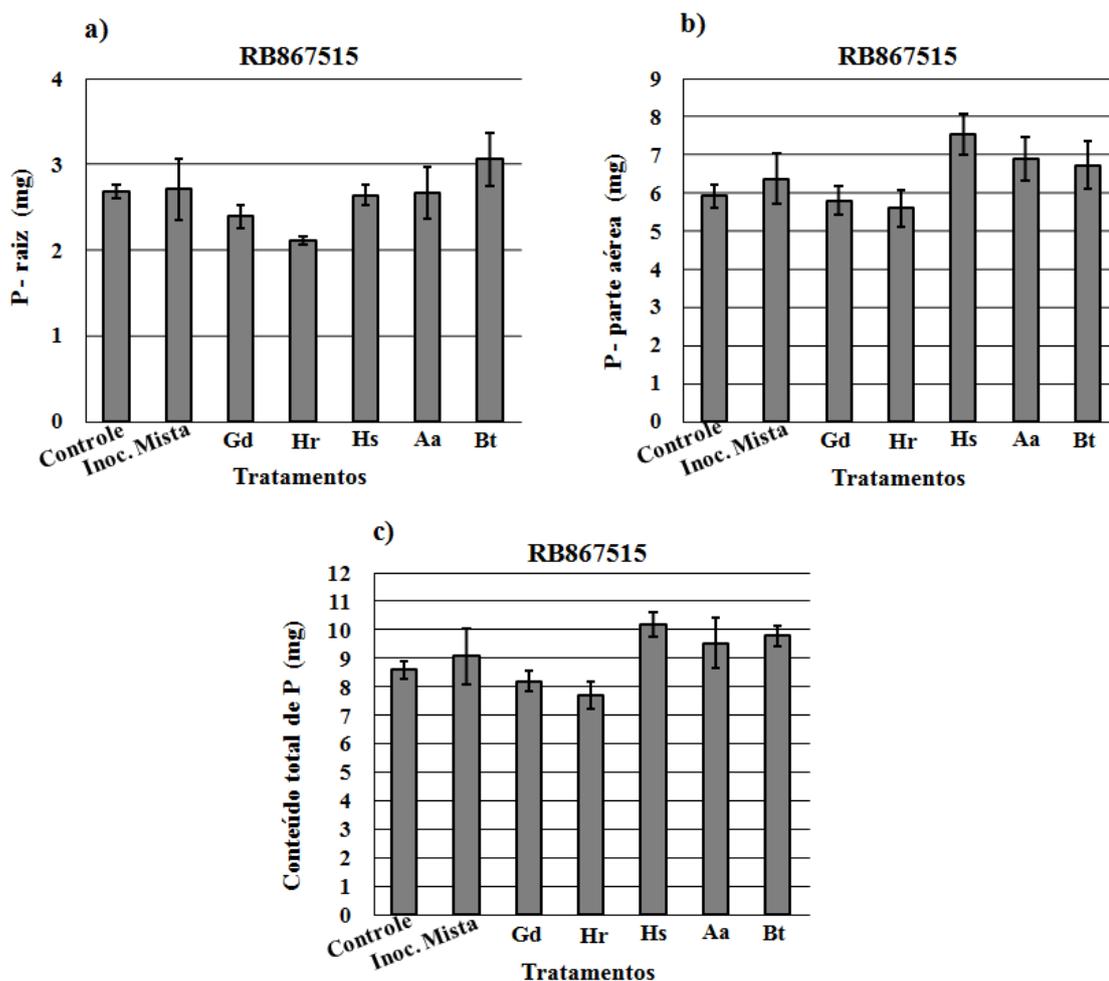


Figura 25. Variedade RB867515 após 50 dias de cultivo. a) Conteúdo de P na raiz; b) Conteúdo de P na parte aérea; c) Conteúdo total de P. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 17,37; b) 16,35; c) 13,26.

Para a var. IACSP95-5000 (Figura 26), o conteúdo de P na raiz aumentou significativamente com a inoculação individual com *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *B. tropica*. Com relação a parte aérea e biomassa total, a inoculação mista e a inoculação individual com *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *B. tropica* aumentaram significativamente conteúdo de P. O efeito deletério da inoculação com *A. amazonense* na produção de biomassa também levou a resultados significativamente inferiores no conteúdo de P na raiz, parte aérea e biomassa total.

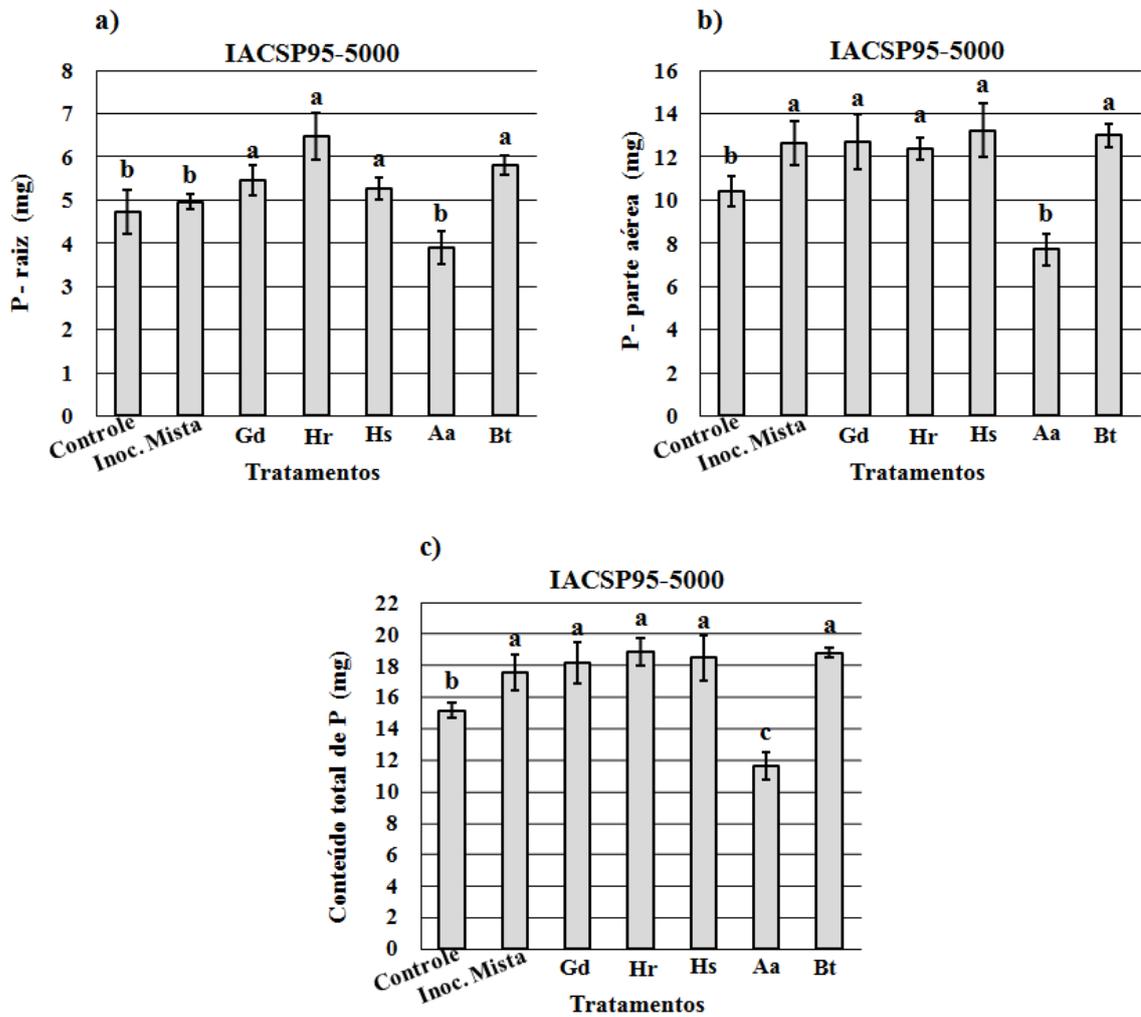


Figura 26. Variedade IACSP95-5000 após 56 dias de cultivo. a) Conteúdo de P na raiz; b) Conteúdo de P na parte aérea; c) Conteúdo total de P. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 14,11; b) 16,33; c) 11,68.

Na variedade RB92579 (Figura 27), a inoculação mista com as cinco estirpes apresentou resultados significativos no conteúdo de P da parte aérea e biomassa total em relação ao controle.

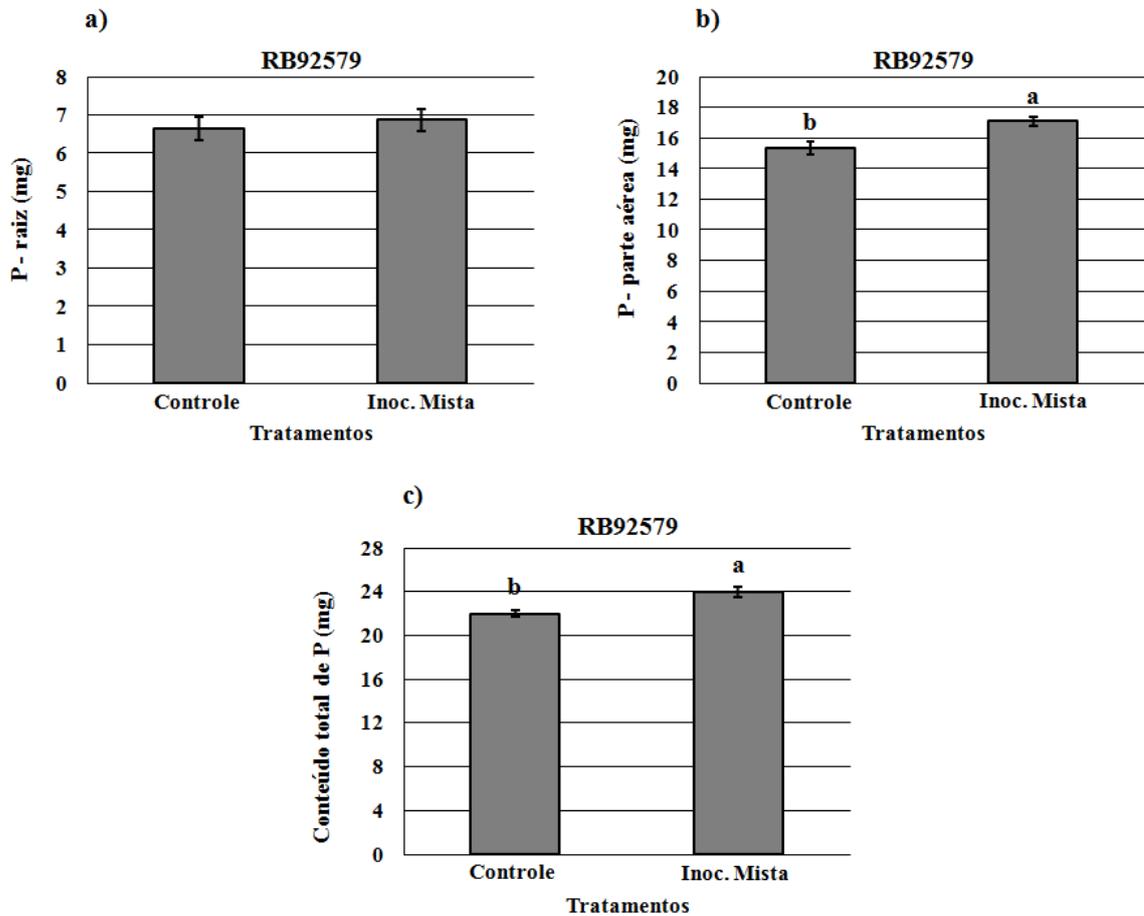


Figura 27. Variedade RB92579 após 58 dias de cultivo. a) Conteúdo de P na raiz; b) Conteúdo de P na parte aérea; c) Conteúdo total de P. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. CV%: a) 18,95; b) 7,19; c) 8,29.

Embora o fósforo seja absorvido em pequenas quantidades pela cana-de-açúcar se comparado com nitrogênio e potássio, exerce função-chave no metabolismo dessa planta, particularmente na formação de proteínas, processo de divisão celular, fotossíntese, armazenamento de energia, desdobramento de açúcares, respiração e fornecimento de energia a partir de ATP e formação de sacarose (ALEXANDER, 1973 apud KORNDÖFER & MELO, 2009). O P é um elemento importante para a cultura da cana-de-açúcar, em virtude de participar, direta e indiretamente, de diversos processos metabólicos: atua no desenvolvimento das raízes, aumenta a produção de colmos e atua nas características industriais, como porcentagem aparente de sacarose contida no caldo da cana (pol%), pureza de caldo e clarificação; sua deficiência pode levar à diminuição na formação de sacarose (SIMÕES NETO et al., 2009).

Segundo RAIJ (1991), o fósforo absorvido pelas plantas é retirado da solução do solo. Porém, com o passar do tempo o fósforo tende a se apresentar em formas mais estáveis diminuindo a sua disponibilidade na solução do solo. Dessa forma, a absorção do fósforo ocorre através do contato da raiz com o ânion que se movimenta por processos de difusão (ROSSETO et al., 2010). Sendo assim, o aumento significativo do conteúdo de fósforo nas plantas inoculadas pode ter ocorrido em resposta ao maior desenvolvimento do sistema radicular aliado a capacidade dessas bactérias de realizarem solubilização de fósforo.

4.3.5 Considerações quanto ao acúmulo de N, P e K nas três variedades

O conteúdo de P e K observado antes do plantio nos minitoletes das variedades RB92579, RB867515 e IACSP95-5000 (Tabela 2, item 3.2), apresentaram valores menores do que os observados na biomassa total dessas três variedades, até mesmo para o tratamento controle. Isso demonstra que mesmo que todo conteúdo de P e K dos propágulos fosse mobilizado para construção de tecidos vegetais, o excedente certamente seria oriundo do solo.

O potássio da solução do solo entra em contato com a superfície da raiz por difusão e fluxo de massa (MEURER, 2006). Para o fósforo a difusão apresenta-se como o principal mecanismo pelo qual este elemento entra em contato com as raízes (ROSSETO et al., 2010). Embora a inoculação não tenha aumentado significativamente a biomassa de raiz, as diferenças observadas entre os tratamentos quanto ao teor e conteúdo desses elementos, podem ser explicadas pelo aumento da superfície específica do sistema radicular que pode ter ocorrido em níveis não detectados pela análise de variância, mas que foram decisivos para o aumento da absorção de K e P, favorecendo também a absorção de nitrogênio, uma vez que o acúmulo de nitrogênio em plantas não leguminosas pode ocorrer devido a FBN ou aumento da absorção do nitrogênio do solo (BHATTACHARJEE et al., 2008)

Resultados, quanto a influencia da inoculação de bactérias promotoras de crescimento na absorção de macronutrientes em cana-de-açúcar já foram observados por outros autores: SUMAN et al. (2005) observaram que a inoculação com *G. diazotrophicus* na variedade CoSe92423 cultivada na Índia, aumentou significativamente o teor e o conteúdo total de N, porém não afetou a absorção de P e K. Por outro lado, YADAV et al. (2009) constataram que a inoculação de *G. diazotrophicus* promoveu incrementos significativos de produtividade e absorção de N, P e K na variedade CoSe92423 cultivada em condições de campo na Índia, além de proporcionar maior economia na utilização de fertilizantes nitrogenados. No Brasil, PEDULA (2013) ao cultivar a variedade RB92579 em condições de campo após inoculação mista com cinco estirpes, observou no ciclo da cana-planta que os tratamentos inoculados acumularam mais K no colmo e na biomassa total, além disso, a associação da inoculação a 50 kg ha⁻¹ de N elevou o acúmulo de P total quando em comparação com o tratamento inoculado e o controle.

Segundo ANGHINONI & MEURER (1999), a aquisição de nutrientes é alterada sempre que a cinética de absorção ou o crescimento das raízes forem afetados, que neste caso podem ter sua explicação na produção de reguladores de crescimento produzidos por esses microrganismos, como por exemplo, as auxinas (SPAEPEN et al., 2007; FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993; BASTIÁN et al., 1998; RADWAN et al., 2002) que tem a sua biossíntese regulada por diversos fatores, incluindo fatores genéticos, ambientais, além da interação com a planta que pode ter um papel ativo nesta regulação (SPAEPEN et al. 2007).

Embora o aumento da superfície específica do sistema radicular levando ao aumento da absorção de nutrientes seja a hipótese mais comum para explicar os benefícios da inoculação com bactérias promotoras de crescimento, é possível que essas bactérias também possam estimular os sistemas de captação e transporte de íons, porém os mecanismos que envolvem a interação entre bactérias promotoras de crescimento e plantas ainda não estão claramente definidos, sendo um fenômeno complexo que afeta vários aspectos da nutrição mineral e desenvolvimento radicular (MANTELIN & TOURAINÉ, 2008).

Os resultados observados neste estudo evidenciam a importância da inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal na nutrição da cana-de-açúcar, mostrando que além do N a planta também pode ser beneficiada pela absorção de outros nutrientes. Para uma produção de 120 toneladas de matéria natural por hectare, cerca de 100 t de colmos industrializáveis, o acúmulo de nutrientes na parte aérea da planta é da ordem de 150, 40 e 180 kg de N, P e K respectivamente, além de outros nutrientes (OLIVEIRA et al., 2007).

Esses nutrientes embora altamente requisitados pelas plantas, nem sempre se encontram disponíveis em abundância no solo. REIS JÚNIOR & MONNERAT (2002) avaliaram diagnoses nutricionais de padrões calibrados regionalmente (teores adequados e DRIS) em lavouras de cana-de-açúcar em Campos dos Goytacazes (RJ), e indicaram K, P e S como os principais nutrientes limitantes. Para CALHEIROS et al. (2012), o P juntamente com o N são os elementos que de modo geral mais limitam o crescimento da cana. Além disso, a disponibilidade endógena de fósforo, principalmente a quantidade de ATP no sistema radicular, controla a absorção, a translocação e o metabolismo do nitrato.

Portanto, os benefícios aqui descritos certamente seriam de grande importância no sistema de produção da cana-de-açúcar, pois podem favorecer diretamente a nutrição da planta.

5 CONCLUSÕES

Diferentes respostas a inoculação foram observadas entre as variedades e também entre os ambientes de cultivo.

A inoculação individual nas variedades RB867515 e IACSP95-5000 mostrou-se promissora no cultivo ao ar livre e em casa de vegetação, sendo observados resultados iguais ou superiores a inoculação mista das cinco estirpes quanto ao acúmulo de biomassa e macronutrientes. A inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR11335) e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR11504) esteve associada aos melhores resultados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, B. J. R.; SANTOS, J. C. F.; URQUIARGA, S.; BODDEY, R. M. Métodos de determinação do nitrogênio em solo e planta. In: **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Ed.: ARAÚJO, R. S., HUNGRIA, M. Brasília, 1999. p. 449-469.
- ANGHINONI, I.; MEURER, E. J. Eficiência de absorção de nutrientes pelas raízes. In: Workshop sobre sistema radicular: Metodologias e estudo de casos, 1999, Aracaju. **Anais...** Embrapa Tabuleiros Costeiros, 1999. p. 57-87.
- AZEREDO, D.F.; BOLSANELLO, J.; WEBER, H.; VIEIRA, J.R. Nitrogênio na cana planta: doses e fracionamento. **Revista STAB**, v.4, p.32-36, 1986.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M.J.A.M.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Localization of *Herbaspirillum* spp and *Burkholderia* sp. in rice root system. In: **International Symposium on Microbiol Ecology**, v. 7, 133 p. 1995.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R. & DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 911-922, 1997.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 485-491, 2000.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, v. 29, p. 417-423, 2002.
- BALDANI, J. I. & BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 77, p. 549-579, 2005.
- BARBOSA, G. V. S.; SOUSA, A. J. R.; ROCHA, A. M. C.; SANTOS, A. V. P.; BARRETO, C. G. R.; MOURA FILHO, E. J. S.; SOUZA, G. J. L.; FERREIRA, J. L. C.; SOARES, L.; CRUZ, M. M.; FERREIRA, P. V.; SILVA, W. C. M. Três novas variedades RB de cana-de-açúcar. **Boletim Técnico**, PMGCA, v. 2, 2003, 18 p.
- BARBOSA, E. A.; PERIN, L.; REIS, V. M.; Uso de diferentes fontes de carbono por estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isoladas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p.827-833, 2006.

BASHAN, Y. & HOLGUIM, G. *Azospirillum*-planta relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 103-121, 1997.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; BASHAN, L. E. de. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 521–577, 2004.

BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 e A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, p. 7-11, 1998.

BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S. N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p.199–209, 2008.

BLANCO, Y.; BLANCH, M.; PIÑÓN, D.; LEGAZ, M-E. & VICENTE, C. Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (Pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, p. 366–371, 2005.

BODDEY, R.M.; DE OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; REIS, V.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, v. 174, p. 195 – 209, 1995.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; REIS, V.M. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, p.139-149, 2003.

BRUNINI, O.; FERRAZ, F. M.; CARVALHO, J. P.; BRUNINI, A. P. C. Potencialidade da cana-de-açúcar. **AgraFNP**, v. 1, p. 23-28, 2007.

BURDMAN, S.; JURKEVITCH, E.; SCHWARTSBURD, B.; HAMPEL, M.M.; OKON, Y. Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. **Microbiology**, v. 144, p. 1989-1999, 1998.

CABALLERO-MELLADO, J.; ONOFRE-LEMUS, J.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; The Tomato Rhizosphere, an Environment Rich in Nitrogen-Fixing *Burkholderia* Species with Capabilities of Interest for Agriculture and Bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 5308–5319, 2007.

CALHEIROS, A. S.; OLIVEIRA, M. W. de; FERREIRA, V. M.; BARBOSA, G. V. S. de; SANTIAGO, A. D.; ARISTIDES, E. V. S. dos. Produção de biomassa, de açúcar e de proteína em função de variedades de cana e de adubação fosfatada. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, p. 809-818, 2012.

CAMARGO, A. P.; PEDRO JUNIOR, M. J.; BRUNINI, O.; ALFONSI, R. R. Aptidão ecológica de culturas – SP. In: São Paulo. Secretaria de Agricultura. (Org.). **Zoneamento Agrícola do Estado de São Paulo**. IAC, 1977. p. 109-049.

CÂMARA, G. M. S. Ecofisiologia da cultura da cana-de-açúcar. In: CÂMARA, G. M. S.; OLIVEIRA, E. A. M. **Produção de cana-de-açúcar**. FEALQ, cap. 3, p. 31-64, 1993.

CANUTO, E. L. de; OLIVEIRA, A. L. M. de; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Evaluation of the biological nitrogen fixation contribution in sugarcane plants originated from seeds and inoculated with nitrogen-fixing endophytes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, (Supl.1): p. 62-64, 2003.

CANELLAS, L. P.; VELLOSO, A. C. X.; MARCIANO, C. R.; RAMALHO, J. F. G. P.; RUMJANEK, V. M.; REZENDE, C. E. SANTOS, G. A. Propriedades Químicas de um Cambissolo Cultivado com Cana-de-açúcar, com Preservação do Palhico e Adição de Vinhaça por Longo Tempo. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 27, p. 935-944, 2003.

CARNEIRO, A. E. V.; TRIVELIN, P. C. O.; VICTORIA, R. L. Utilização da reserva orgânica e do nitrogênio do tolete de plantio (colmo-semente) no desenvolvimento da cana-planta. **Scientia Agrícola**, v. 53, p. 199-209, 1995.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J. & SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-bacteria-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **J. Plant Growth Regulat.**, v. 33, p. 440-459, 2014.

CASAGRANDE, A. A. & VASCONCELOS, A. C. M. de. Fisiologia da parte aérea In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. de; LANDELL, M. G. A. (Org.). **Cana-de-açúcar**. v. 1, p. 57-78, 2010.

CAVALCANTE, V.A.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane. **Plant and Soil**, v. 108, p. 23-31, 1988.

CEDDIA, M. B.; ANJOS, L. H. C.; LIMA, E.; NETO, A. R.; SILVA, L. A. Sistemas de Colheita da Cana-de-açúcar e Alterações nas Propriedades Físicas de um Solo Podzólico Amarelo no Estado do Espírito Santo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p.1467-1473, 1999.

CHAVES, V. A.; PEDULA, R.; PEREIRA, W.; SOUSA, J. S.; CASSADOR, R.; MACHADO, D.; GIORI, F.; REIS, V. M. Estudo de compatibilidade de bactérias diazotróficas com Regent 800 WG utilizado na cana-de-açúcar. In: FERTBIO 2012 - A responsabilidade socioambiental da pesquisa agrícola, 2012. **Anais...** Maceió-AL, Resumo CD-ROM ISSN 0100-0683.

CHAVES, V. A; MAGALHÃES JÚNIOR, H. X.; SOUZA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; MACHADO, D. O. de; REIS, V. M. Resposta da variedade de cana-de-açúcar RB867515 a doses de nitrogênio associadas à inoculação de bactérias diazotróficas. In: XXXIV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 2013. **Anais...** Florianópolis-SC, Resumo disponível em: <http://www.eventosolos.org.br/cbcs2013/>

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento – **Acompanhamento da safra Brasileira de cana-de-açúcar - 1º Levantamento da safra 2011/2012 (Maio de 2011)**. Publicação trimestral em: www.conab.gov.br/

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento – **Acompanhamento da safra Brasileira de cana-de-açúcar - 3º Levantamento da safra 2013/2014 (Dezembro de 2013)**. Publicação trimestral em: www.conab.gov.br/

COSTA, M. C. G.; MAZZA, J. A.; VITTI, G. C.; JORGE, L. A. C. de. Distribuição radicular, estado nutricional e produção de colmos e de açúcar em soqueiras de dois cultivares de cana-de-açúcar em solos distintos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1503-1514, 2007.

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL A.P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, v. 1, p. 261-272, 1958.

DOBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, v. 44, p. 310-313, 1992.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**, 1995, 60 p.

EMBRAPA. **Manual de Métodos de Análise do solo**. Embrapa Solos, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional e Pesquisa de Solos, Rio de Janeiro, RJ, 1997. 212p.

ESPIRONELO, A.; COSTA, A. A.; LANDELL, M. G. A. de; PEREIRA, J. C. V. N. A.; IGUE, T.; CAMARGO, A. P. de; RAMOS, M. T. Adubação NK em três variedades de cana-de-açúcar em função de dois espaçamentos. **Bragantia**, v. 46, p. 247-268, 1987.

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. **Current World Fertilizer Trends and Outlook to 2014**. FAO, 2010, 40 p.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA Ltda. Manual do medidor eletrônico de teor clorofila (ClorofiLOG / CFL 1030). **Falker Automação Agrícola**. 2008. 33 p.

FRANCO, H. C. J.; BOLOGNA, I. R.; FARONI, C. E.; VITTI, A. C.; TRIVELIN, P. C. O. Acúmulo de macronutrientes em cana-de-açúcar em função da adubação nitrogenada e dos resíduos culturais incorporados ao solo no plantio. **Bragantia**, v. 66, p. 669-674, 2007.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R.; CABALERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus* a endolactic producing bacterium isolated from sugar cane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, v. 154, p. 145-150, 1993.

GILLIS, M.; DOBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERSTERS, K. Taxonomic relationships between (*Pseudomonas rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and (*Aquaspirillum*) *autrophicum*. In: **Nitrogen fixation** (M, Polsinelli, R; Materassi and M. Vicenzi, Eds), p. 292-294, Kluwer Academic Publishers, 1991.

GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Improved yield of micropropagated sugar cane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. **Plant and Soil**, v. 280, p. 239–252, 2006.

GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; KWON, S-W; WEON, H-Y; LAKSHMINARASIMHAN, C. Effects of the Inoculation of *Burkholderia vietnamiensis* and Related Endophytic Diazotrophic Bacteria on Grain Yield of Rice. **Microbial Ecology**, v. 55, p. 21–37, 2008.

HERMANN, E.R.; CÂMARA, G.M.S. Um método simples para estimar a área foliar de cana-de-açúcar. **STAB- Açúcar Álcool e Subprodutos**, v. 17, p. 32-34, 1999.

HOFFMANN, H. P.; SANTOS, E. G. D.; BASSINELLO, A. I. V.; VIEIRA, M. ANTONIO S. **Variedades RB de cana-de-açúcar**. 1ª Ed. Araras: CCA-UFSCar, 2008, 30 p.

IAC – Instituto Agronômico de Campinas – **Cultivares IAC (2007)**. Acessado em Março de 2012 em: <http://www.iac.sp.gov.br/>

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - **Indicadores IBGE: Estatística da Produção Agrícola (Setembro de 2013)**. Acessado em Fevereiro de 2014 em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201309.pdf

KORNDÖRFER, G. H. & MELO, S. P. Fontes de fósforo (fluida ou sólida) na produtividade agrícola e industrial de cana-de-açúcar. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 92-97, 2009.

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.; BRANCALIÃO, 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**, v. 109, 16 p., 2013.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; HARI, K.; SARAVANAN, V.S.; SA, T.M. Influence of pesticides on the growth rate and plant-growth promoting traits of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 84, p. 143-154, 2006.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas. **Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato**, 1989. 201p

MANTELIN, S. & TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 27-34, 2004.

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – **Balança Comercial do Agronegócio – Setembro de 2013** – Acessado em Dezembro de 2013 em: <http://www.agricultura.gov.br/>

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R. & DOBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 55, p. 417-430, 1983.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962.

MARQUES JÚNIOR, R. B.; CANELLAS, L. P.; SILVA, L. G. da; OLIVARES, F. L. Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1121-1128, 2008.

MARAFON, A. C. **Análise quantitativa de crescimento em cana-de-açúcar : uma introdução ao procedimento Prático**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012. 29 p. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-1953; 168).

MEDEIROS, A. F. A.; POLIDORO, J. C. & REIS, V. M. Nitrogen source effect on *Gluconacetobacter diazotrophicus* colonization of sugarcane (*Saccharum spp.*). **Plant and Soil**, v. 279, p. 141–152, 2006.

MENDONZA, H. N. S.; LIMA, E.; ANJOS, L. H. C.; SILVA, L. A.; CEDDIA M. B. & ANTUNES, M. V. M. Propriedades químicas e biológicas de solo de tabuleiro cultivado com cana-de-açúcar com e sem queima da palhada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 201-207, 2000.

MELO, G. A.; ALVES, J. D.; OLIVEIRA, L. E. M. D. Propagação da cana-de-açúcar – alterações dos componentes de reservas do tolete durante a brotação. **STAB – Açúcar álcool e Subprodutos**, v. 13, p. 10-15, 1995.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; BOSCOLO, W. R. Utilização de levedura *spray dried* na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). **Acta Scientiarum**, v. 22, p. 479-484, 2000.

MEURER, E. J. Potássio. In: Manlio Silvestr Fernandes. (Org.). **Nutrição Mineral de Plantas**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 1, p. 281-298, 2006.

MOREIRA, F. M. S. de; SILVA, K. da; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. de. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, p. 74-99, 2010.

NJOLOMA, J.; TANAKA, K. SHIMIZU, T.; NISHIGUSHI, T.; ZAKRIA, M.; AKASHI, R.; OOTA, M.; AKAO, S. Infection and colonization of aseptically micropropagated sugar cane seedlings by nitrogen-fixing endophytic bacterium, *Herbaspirillum sp.* B501gfp1. **Biol Fertil Soils**, v. 43, p. 137–143, 2006.

NÓBREGA, J. C. M. de; DORNELAS, M. C. Biotecnologia e Melhoramento da Cana-de-Açúcar. In: SEGATO, S. V., PINTO, A. D. S., JENDIROBA, E.; NOBREGA, J. D. (Org.). **Atualização em Produção de Cana-de-Açúcar**. CP 2, p. 39-56. 2006.

NOGUEIRA, E. M. de; VINAGRE, F.; MASUDA, H. P.; VARGAS, C.; PÁDUA, V. L. M. de; SILVA, F. R. da; SANTOS, R. V. dos; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 199-206, 2001.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DOBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂ –fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and soil**, v. 242, p. 205-215, 2002.

OLIVEIRA, A. L. M. **Inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em duas variedades de cana-de-açúcar sob condições de campo**. 2003. 123 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo), UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 2003.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. 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**, v. 284, p. 23-32, 2006.

OLIVEIRA, M. W.; FREIRE, F. M.; MACÊDO, G. A. R.; FERREIRA, J. J. Nutrição mineral e adubação da cana-de-açúcar. **Informe Agropecuário**, v. 28, p. 30-43, 2007.

PATTEN, C. L. & GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 207-220, 1996.

PECEGE. **Custos de produção de cana-de-açúcar, açúcar e etanol no Brasil: Fechamento da safra 2010/2011**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Programa de Educação Continuada em Economia e Gestão de Empresas/Departamento de Economia, Administração e Sociologia. 2011. 141 p. Relatório apresentado à Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil – CNA. Disponível em: http://canaldoprodutor.com.br/sites/default/files/relatorio_Custos_Prod_Cana_2010_11.pdf

PEDULA, R. **Análise de crescimento da cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas e com adubação nitrogenada**. 2013, 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica.

PEREIRA, W.; LEITE, J. M.; HIPÓLITO, G. S. de; 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 Agronômica**, v. 44, p. 363-370, 2013.

PERIN, L.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 763-770, 2004.

POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S. de; QUESADA, D. M.; XAVIER, R. P.; COELHO, C. H. M.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. **Levantamento da contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura da cana-de-açúcar no Brasil**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2001. 8 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 144).

PRADO JR.; J. P. Q. **Qualidade e produtividade da cana-de-açúcar inoculada com *Gluconacetobacter diazotrophicus* e adubada com nitrogênio mineral e orgânico.** Campinas, SP, 2008. 49 f. Dissertação. (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) Instituto Agronômico de Campinas.

PROCÓPIO, S. O.; FERNANDES, M. F.; TELES, D. A.; SENA FILHO, J. G.; CARGNELUTTI FILHO, A.; VARGAS, L.; SANT'ANNA, S. A. C. Toxicidade de herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar à bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense*. **Planta Daninha**, v. 29, p. 1079-1089, 2011.

QUISPEL, A. A search of signals in endophytic microorganisms. In: **VERMA, D. P. S.** (Ed.) Molecular signals in plant-microbe communications. Boca Raton: CRC Press, p. 471-490, 1992.

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**, v. 32, p. 39-54, 2002.

RADWAN, T. EL-S. EL-D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 39, p. 987-994, 2004.

RAIJ, B. Van. **Fertilidade do solo e adubação.** Piracicaba: Ed. Ceres, 343 p. 1991.

REIS, V. M.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOLGEL, J.; STROFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

REIS, V. M. **Interações entre Plantas e Microrganismos.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 24 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 194).

REIS, V. M. & OLIVARES, F. L. **Vias de penetração e infecção de plantas por bactérias.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 34 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 216).

REIS JÚNIOR, F. B. dos; SILVA, L. G. da; REIS, V. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 985-994, 2000.

REIS JUNIOR, R. A.; Probabilidade de resposta da cana-de-açúcar à adubação potássica em razão da relação K^+ ($Ca^{2+}+Mg^{2+}$)-0,5 do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 1175-1183, 2001.

REIS JUNIOR, R. A. & MONNERAT, P. H.; Diagnose nutricional da cana-de-açúcar em Campos dos Goytacazes. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, p. 367-372, 2002.

REIS JUNIOR, F. B. dos; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em

diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônios pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 103-113, 2004.

REIS JUNIOR, F. B. dos; MACHADO, C. T. T. de; MACHADO, A. T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1139-1146, 2008.

RESENDE, A. S. de; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. **Técnicas utilizadas na quantificação da fixação biológica de nitrogênio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 26 p. (Documentos, 165).

RODRIGUES, E. P.; OLIVEIRA, A. L. M.; VIDAL, M. S. SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; BALDANI, J. I. **Obtenção e seleção de mutantes Tn5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal 5) com alterações na produção de Auxinas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 21 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 27).

ROSSETTO, R.; DIAS, F. L. F.; VITTI, A. C.; TAVARES, S. Potássio. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. de; LANDELL, M. G. A. de. (Org.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: IAC, v. 1, p. 289-312, 2010.

ROSSETTO, R.; DIAS, F. L. F.; VITTI, A. C.; PRADO JUNIOR, J. P. Q. Fósforo. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. de; LANDELL, M. G. A. de. (Org.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: IAC, v. 1, p. 271-287, 2010.

ROSSETTO, R.; DIAS, F. L.; VITTI, A. C. F. Fertilidade do Solo, nutrição e adubação In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. de; LANDELL, M. G. A. de. (Org.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: IAC, v.1, p. 221-228, 2010.

ROSSIELO, R.O.P. **Bases fisiológicas na acumulação de nitrogênio e potássio em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. cv. NA 56-79) em resposta à adubação nitrogenada em cambissolo**. 1987. 172p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1987.

RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiol Lett**, v. 23, p. 1-9, 2008.

SALLA, D. A.; FURLANETO, F. P. B.; CABELLO, C.; KANTHACK, R. A. D. Avaliação energética da produção de etanol utilizando como matéria-prima a cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, v. 39, p. 2516-2520, 2009.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; JABEZ OSBORNE; THANGARAJU, M.; SA, T.M. Ecological Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Nitrogen-fixing Acetobacteraceae Members: Their Possible Role in Plant Growth Promotion. **Microbial Ecology**, v. 55, p. 130-140, 2008.

SARRUGE, J. R. & HAAG, H. P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba, ESALQ/USP, 1974. 56p.

SCOPINHO, R. A.; EID, F.; VIAN, C. E. F.; SILVA, P. R. C. Novas tecnologias e saúde do trabalhador: a mecanização do corte da cana-de-açúcar. **Cad. Saúde Pública**, v. 15, p. 147-161, 1999.

SCHULTZ, N.; MORAIS, R. F.; SILVA, J. A.; BAPTISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P.; LEITE, J. M.; PEREIRA, W.; CARNEIRO-JÚNIOR, J. B.; ALVES, B. J. R.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Avaliação agrônômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 261-268, 2012.

SERNA-COCK, L.; ARIAS-GARCÍA, C.; HERNANDEZ, L. J. V. Effect of Biofertilization on the Growth of potted sugarcane plants (*saccharum officinarum*). **Biotecnologia en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 9, p. 85-95, 2011.

SILVA, M. F. **Uso de Inoculante Polimérico contendo Bactérias Diazotróficas na Cultura da Cana-de-açúcar**. Seropédica, RJ, 2009. 80 p. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

SILVA, M. A. de; ARAGÃO, N. C.; BARBOSA, M. A. de; JERONIMO, E. M.; CARLIN, S. D. Efeito hormótico de glyphosate no desenvolvimento inicial de cana-de-açúcar. **Bragantia**, v. 68, p. 973-978, 2009.

SILVA, V. S.; GARCIA, C. A.; SILVA, C. M. O Destino do Bagaço da Cana-de-açúcar: Um Estudo a Partir das Agroindústrias Sucroalcooleiras do Paraná. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.3, p. 59-76, 2010.

SILVA, M. F.; ANTÔNIO, C. Z.; OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANK, N. G.; SOARES, L. H. B.; REIS, V. M. Survival of endophytic bacteria in polymer-based inoculants and efficiency of their application to sugarcane. **Plant and Soil**, v. 356, p. 231-243, 2012.

SIMÕES NETO, D. E.; OLIVEIRA, A. C. de; FREIRE, F. J.; FREIRE, M. B. G. S. dos; NASCIMENTO, C. W. A. do; ROCHA, A. T. da. Extração de fósforo em solos cultivados com cana-de-açúcar e suas relações com a capacidade tampão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, p. 840–848, 2009.

SPAEPEN S, VANDERLEYDEN J, REMANS R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiol Rev**, v. 31, p. 425–448. 2007.

SPAEPEN, S. & VANDERLEYDEN, J. Auxin and Plant-Microbe Interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, p. a001438, 2011.

SUMAN, A.; GAUR, A.; SHRIVASTAVA, A. K.; YADAV, R. L. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 155–162, 2005.

SUMAN, A.; SHRIVASTAVA, A. K.; GAUR, A.; SINGH, P.; SINGH, J.; YADAV, R. L. Nitrogen use efficiency of sugarcane in relation to its BNF potential and population of endophytic diazotrophs at different N levels. **Plant Growth Regulation**, v. 54, p. 1-11, 2008.

TAUCONNIER, R. & BASSEREAU, D. La canã de azucar. Barcelona: Editorial Blume, 1975. 433 p. **Coleção Agricultura Tropical**.

TANDRA-SFEIR, M. Z.; SOUZA, E. M.; FAORO, H.; MÜLLER-SANTOS, M.; BAURA, V. A.; TULESKI, T. R.; RIGO, L. U.; YATES, M. G.; WASSEM, R.; PEDROSA, F. O.; MONTEIRO, R. A. Naringenin Regulates Expression of Genes Involved in Cell Wall Synthesis in *Herbaspirillum seropedicae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 2180–2183, 2011.

TRIVELIN, P.C.O. Utilização do nitrogênio pela cana-de-açúcar: três casos estudados com uso do traçador ¹⁵N. 143p. **Livre docência, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar – **Levantamento da safra 2012/2013** – Acessado em Fevereiro de 2014 em: <http://www.unica.com.br/>

UNKOVICH, M.; HERRIDGE, D.; PEOPLES, M.; CADISCH, G.; BODDEY, R.; GILLER, K.; ALVES, B. AND CHALK, P. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. **ACIAR Monograph**, v. 136, 258 p., 2008.

URQUIAGA, S.; JANTALIA, C. P.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; Contribuição da FBN na produtividade dos sistemas agrícolas na América latina. **Embrapa Agrobiologia**, 368 p., 1992.

URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F. de; BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; SÁ, J. M. e; BARBOSA, K. P.; RESENDE, A. S. de; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 356, p. 5-21, 2012.

VASCONCELOS, A. C. M. & CASAGRANDE, A. A. Fisiologia do sistema radicular In: Leila Luci Dinardo-Miranda; Antônio Carlos Machado de Vasconcelos; Marcos Guimarães de Andrade de Landell. (Org.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: IAC, v. 1, p. 79-98, 2010.

VISICK, K. L. & FUQUA, C. Decoding Microbial Chatter: Cell-Cell Communication in Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 5507–5519, 2005.

VITTI, G. C. & MAZZA, J. A. Planejamento, estratégias de manejo e nutrição da cultura de cana-de-açúcar. **Encarte do informações agrônômicas**, v. 97, p. 1–16, 2002.

VITTI, A. C.; CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; ROSSETO R. Nitrogênio. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. de; LANDELL, M. G. A. de. (Org.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: IAC, v. 1, p. 239-270, 2010.

ZAKRIA, M.; NJOLOMA, J.; SAEKI, Y.; AKAO, S. Colonization and Nitrogen-Fixing Ability of *Herbaspirillum sp.* Strain B501 *gfp1* and Assessment of Its Growth-Promoting Ability in Cultivated Rice. **Microbes and Environments**, v. 22, p. 197-206, 2007.

ZAKRIA, M.; UDONISHI, K.; SAEKI, Y.; YAMAMOTO, A.; AKAO, S. Infection, Multiplication and Evaluation of the Nitrogen-Fixing Ability of *Herbaspirillum sp.* Strain

B501*gfp*1 in Sugarcane Stems Inoculated by vacuum Infiltration Method. **Microbes and Environments**, v. 23, p. 128-133, 2008.

ZIMMER, W.; ROEBEN, K.; BOTHE, H. An alternative explanation for plant growth promotion by bacteria of the genus *Azospirillum*. **Planta**, v. 176, p. 333-342, 1988.

YADAV, R. L.; SUMAN, A.; PRASAD, S. R.; PRAKASH, O. (2009). Effect of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Trichoderma viride* on soil health, yield and N-economy of sugarcane cultivation under subtropical climatic conditions of India. **European Journal of Agronomy**, 30(4), 296-303.

7 ANEXO

Acompanhamento da brotação da variedade RB92579

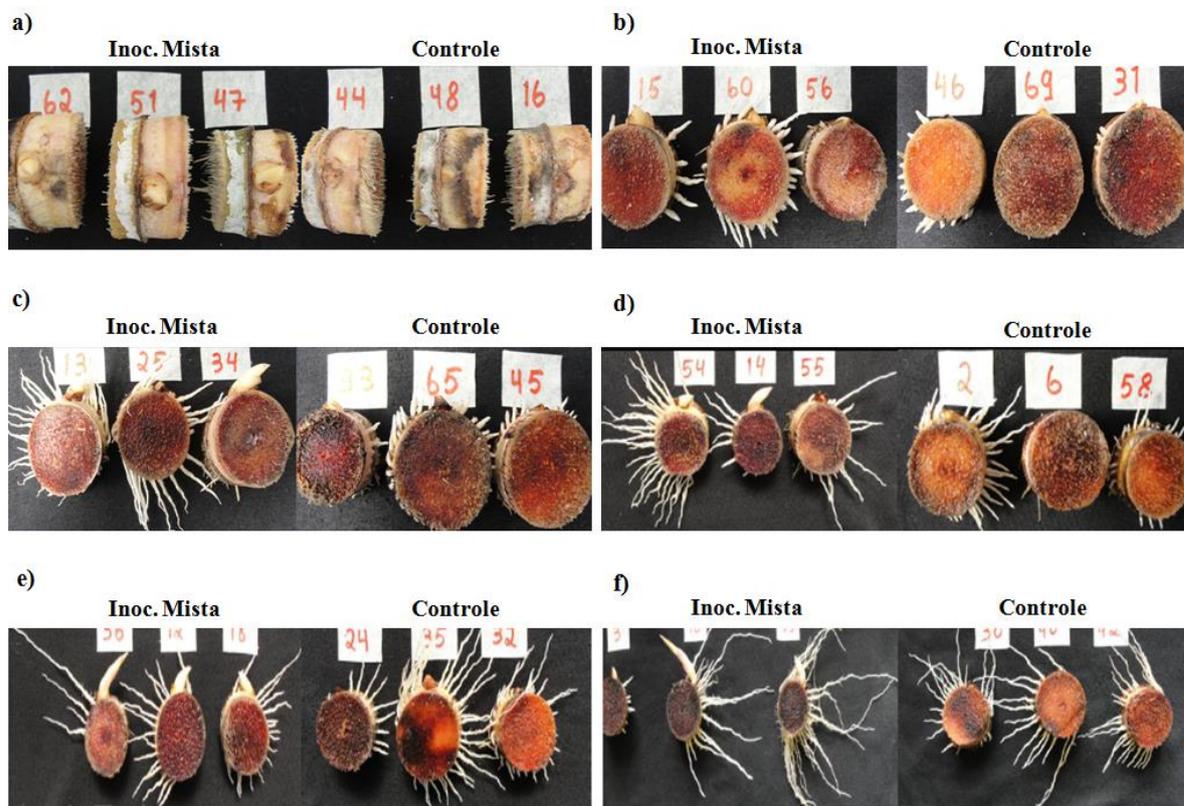


Figura 28. Brotação da variedade RB92579 inoculada com bactérias diazotróficas. a) 3° dia após o plantio. b) 4° dia após o plantio. c) 5° dia após o plantio. d) 6° dia após o plantio. e) 7° dia após o plantio. f) 8° dia após o plantio.

Acompanhamento da brotação da variedade RB867515. Utilizou-se uma régua de 15 cm como objeto de referência nas imagens.

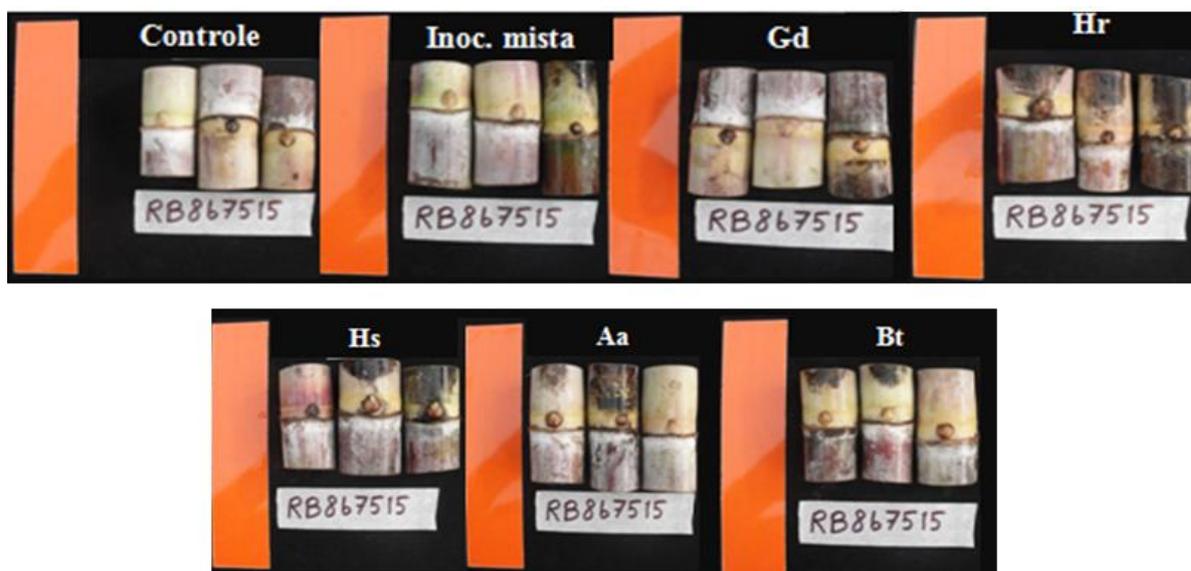


Figura 29. Variedade RB867515 inoculada com bactérias diazotróficas (2° dia após o plantio).



Figura 30. Variedade RB867515 inoculada com bactérias diazotróficas (5° dia após o plantio).

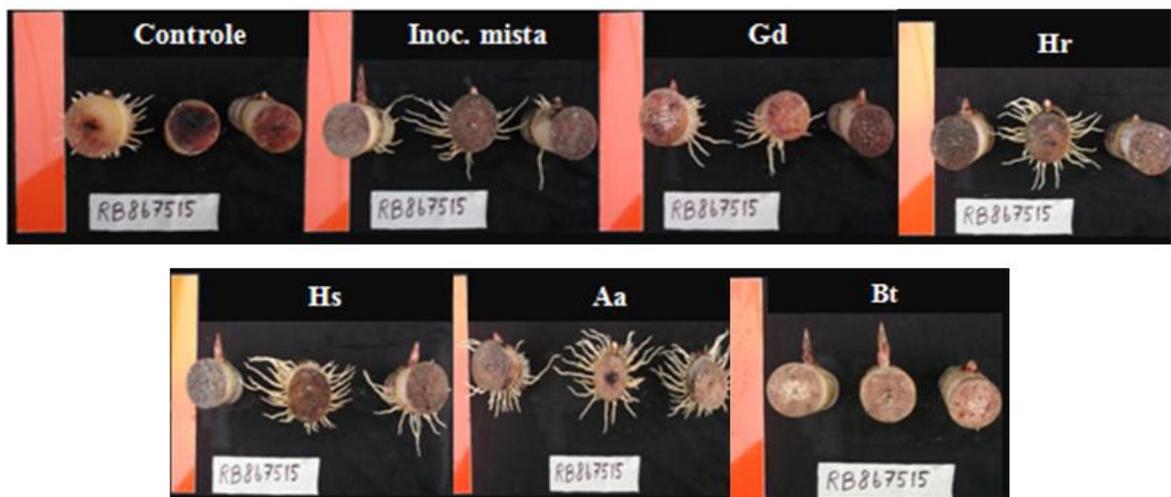


Figura 31. Variedade RB867515 inoculada com bactérias diazotróficas (8° dia após o plantio).

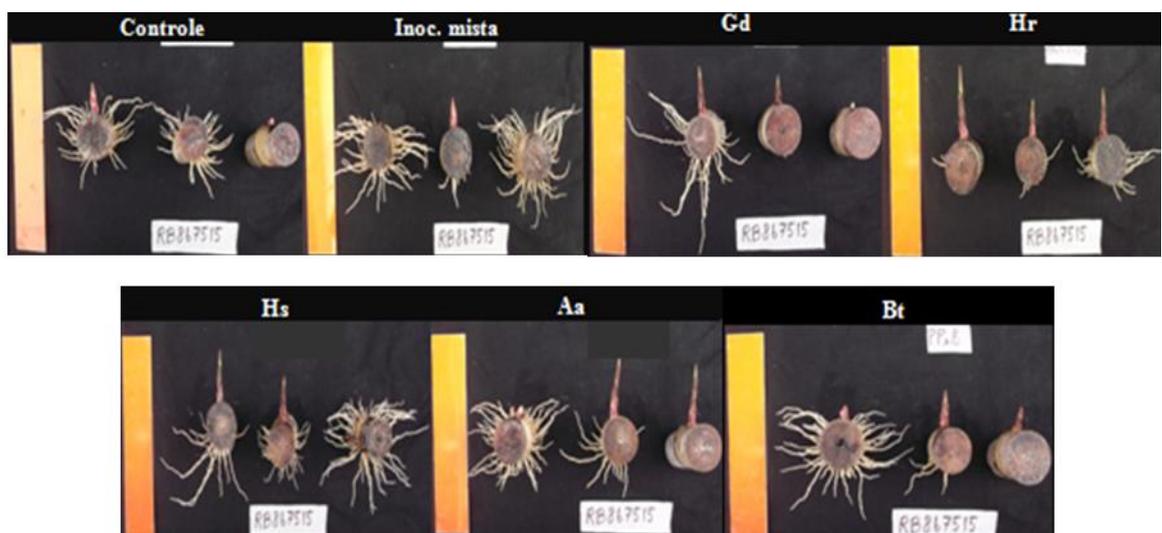


Figura 32. Variedade RB867515 inoculada com bactérias diazotróficas (11° dia após o plantio).

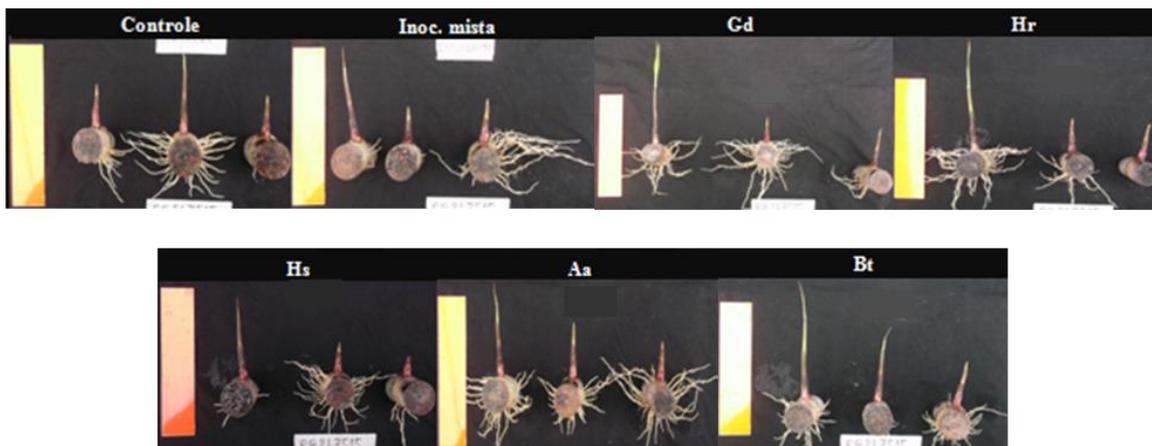


Figura 33. Variedade RB867515 inoculada com bactérias diazotróficas (14º dia após o plantio).

Acompanhamento da brotação da variedade IACSP95-5000. Utilizou-se uma régua de 15 cm como objeto de referência nas imagens.

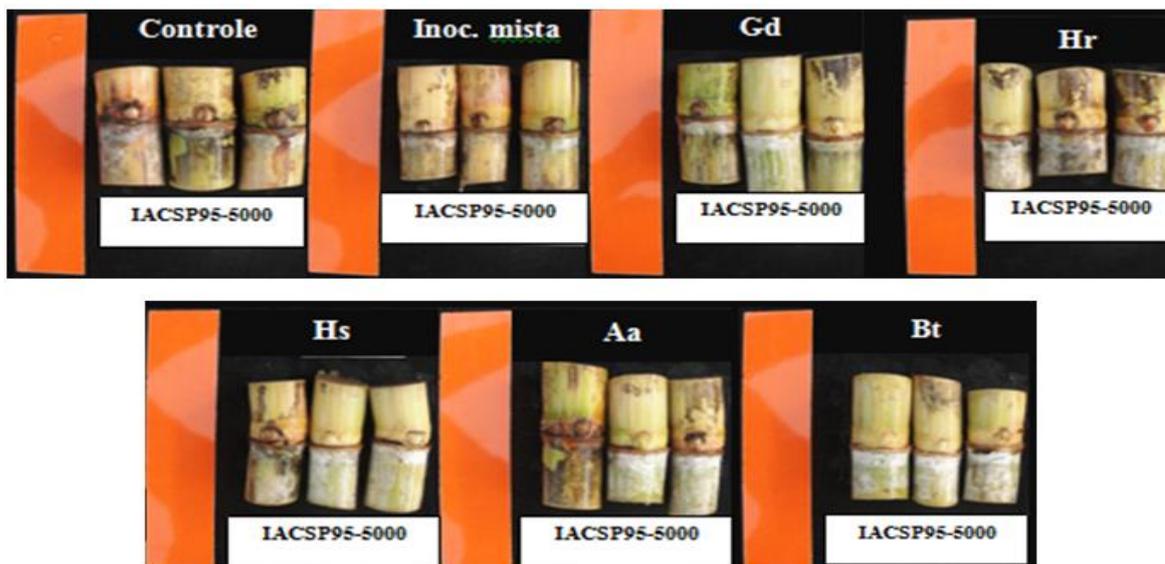


Figura 34. Variedade IACSP95-5000 inoculada com bactérias diazotróficas (2º dia após o plantio).

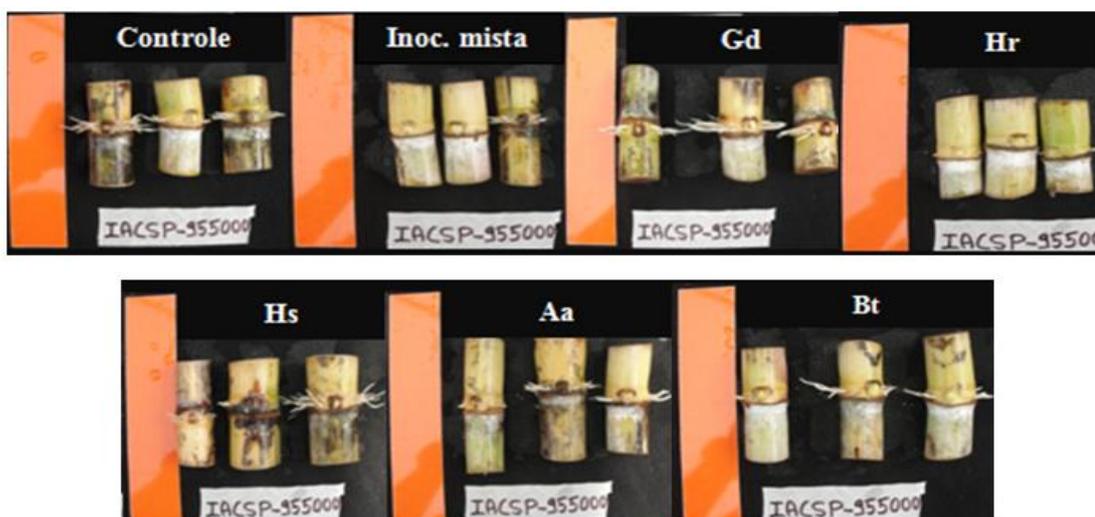


Figura 35. Variedade IACSP95-5000 inoculada com bactérias diazotróficas (5º dia após o plantio).

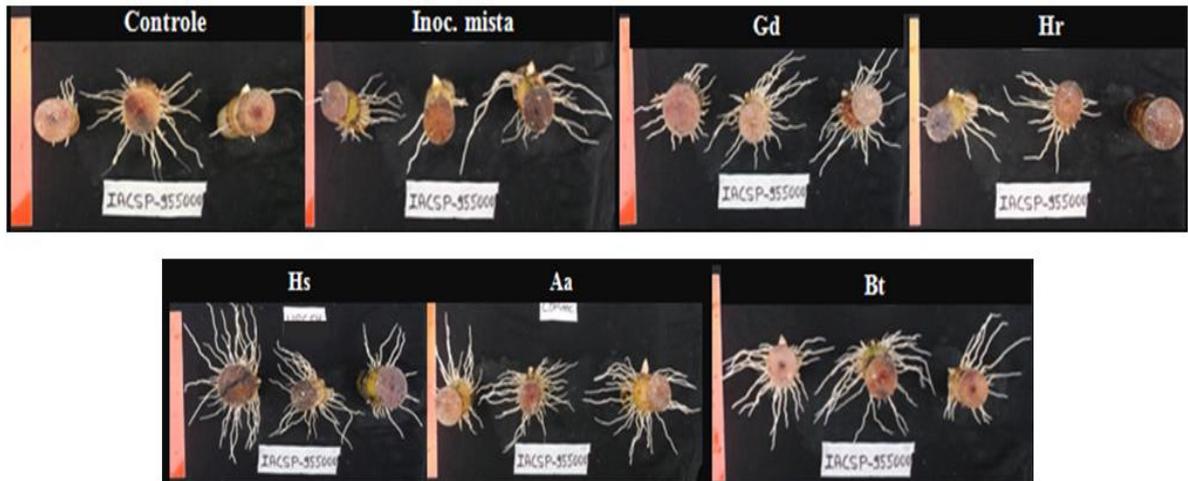


Figura 36. Variedade IACSP95-5000 inoculada com bactérias diazotróficas (8º dia após o plantio).

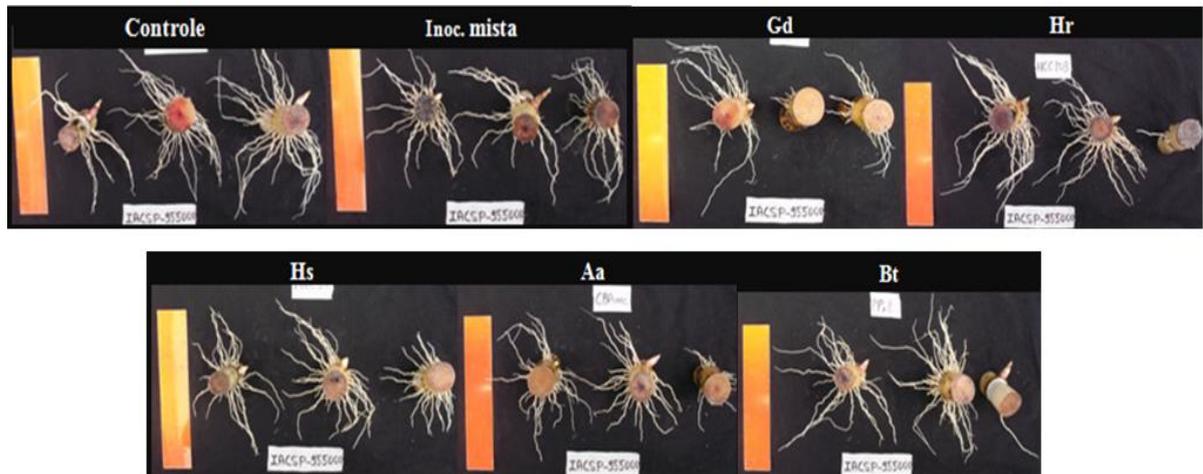


Figura 37. Variedade IACSP95-5000 inoculada com bactérias diazotróficas (11º dia após o plantio).



Figura 38. Variedade IACSP95-5000 inoculada com bactérias diazotróficas (14º dia após o plantio).