

UFRRJ

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

DISSERTAÇÃO

**Crescimento Inicial de Genótipos Pertencente ao
Complexo *Saccharum* em Resposta a Inoculação da
Bactéria Diazotrófica *Nitrospirillum Amazonense***

Alex Paulo Lemos da Silva

2022



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

**CRESCIMENTO INICIAL DE GENÓTIPOS PERTENCENTES AO
COMPLEXO *SACCHARUM* EM RESPOSTA A INOCULAÇÃO DA
BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA *NITROSPIRILLUM AMAZONENSE***

ALEX PAULO LEMOS DA SILVA

Sob a Orientação da Professora
Dra. Veronica Massena Reis

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

Seropédica, RJ
Agosto de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central/Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586c Silva, Alex Paulo Lemos da, 1993-
Crescimento inicial de genótipos pertencentes ao complexo *Saccharum*
em resposta a inoculação da bactéria diazotrófica *Nitrospirillum amazonense*
/ Alex Paulo Lemos da Silva. – Seropédica, 2022.
52 f. : il.

Orientadora: Veronica Massena Reis.
Dissertação (Mestrado). – – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, 2022.

1. Nitrogênio. 2. *Poaceae*. 3. *Saccharum*. 4. Bactéria. I. Reis, Veronica
Massena, 1961-, orient. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo III. Título.

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 0001.**

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



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA (CIÊNCIAS DO SOLO)**



**HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 43 / 2022 - CPGACS
(12.28.01.00.00.00.27)**

Nº do Protocolo: 23083.054111/2022-82

Seropédica-RJ, 01 de setembro de 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE AGRONOMIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA ? CIÊNCIA DO SOLO

ALEX PAULO LEMOS DA SILVA

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 30/08/2022.

Verônica Massena Reis. Dra. Embrapa Agrobiologia

(Orientadora)

Bruno José Rodrigues Alves. Dr. Embrapa Agrobiologia

Leandro Azevedo Santos. Dr. UFRRJ

Raul Castro Carriello Rosa. Dr. Embrapa Agrobiologia

(Assinado digitalmente em 01/09/2022 15:51)

LEANDRO AZEVEDO SANTOS
CPGACS (12.28.01.00.00.00.27)
Matrícula: 2626406

(Assinado digitalmente em 01/09/2022 10:38)

VERÔNICA MASSENA REIS
CPF: 631.052.847-53

(Assinado digitalmente em 08/09/2022 09:46)

BRUNO JOSE RODRIGUES ALVES
CPF: 681.282.827-00

(Assinado digitalmente em 27/09/2022 14:04)

RAUL CASTRO CARRIELLO ROSA
CPF: 026.339.867-65

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **43**, ano: **2022**, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**, data de emissão: **01/09/2022** e o código de verificação: **e57c741cbb**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciências do Solo – PPGA-CS.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Agrobiologia).

À orientadora e pesquisadora Dra. Veronica Massena Reis pelo exemplo, orientação, dedicação, comprometimento e paciência.

Aos colegas do PPGA-CS e PPGA-Fitotecnia pela disponibilidade, amizade e auxílio, especialmente ao Ricardo Amaro e Raul Rosa.

Aos colegas da UFRRJ pela amizade e auxílio, especialmente ao Luiz Felipe Coutinho de Faria.

Aos meus pais Carmeci de Souza Silva, Vanderley Gomes, Adilson Paula da Silva e Daniel Conrado.

Aos meus irmãos Flavia Cristina de Oliveira, Alan Paulo Lemos da Silva, Ana Paula Lorraine da Silva, Isabela Brunet, Vinícius Aparecido Gomes e Thais Gomes.

Por fim, agradeço a todas pessoas e entidades envolvidas na minha educação, ensino e formação acadêmica e pessoal.

RESUMO

SILVA, Alex Paulo Lemos da. **Crescimento inicial de genótipos pertencentes ao complexo *Saccharum* em resposta a inoculação da bactéria diazotrófica *Nitrospirillum amazonense***. 2022. 52f. Dissertação. (Mestrado em Agronomia, Ciência do solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

A produção de açúcar e álcool no Brasil advém do plantio de híbridos oriundos do cruzamento de espécies pertencentes ao Complexo *Saccharum*. Estes genótipos, usados para o cruzamento de híbridos comerciais de cana, também pode assumir papel importante na geração de energia e biocombustíveis. Entretanto, pouco se sabe sobre a resposta de crescimento quando inoculados com a estirpe de bactéria diazotrófica *Nitrospirillum amazonense* hoje recomendada no Brasil como inoculante de cana de açúcar. Este trabalho teve o objetivo de avaliar o crescimento inicial de 12 genótipos de cana inoculados ou não com uma estirpe de *N. amazonense*. Os genótipos testados foram: *Miscanthus* Figi 10; *S. arundinaceus* IJ76-364; *S. officinarum* IJ76470 e *Hinahina*; o híbrido SP791011; *S. robustum* US760414; *S. spontaneum* US72-1319, Arundinoid B, CPDAU849678, NG77-042, NG77-122; e *Sacharum* sp. Q45416. Dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação em delineamento em blocos casualizados com ou sem a inoculação da bactéria e seis repetições. Foram utilizados vasos de contendo 3 kg em substrato areia:solo peneirado na proporção de 2:1 (v/v) contendo duas plantas por vaso. A inoculação foi realizada pela imersão de toletes em solução diluída em água destilada 1:100 (v/v) do inoculante imobilizado em turfa por 30 minutos antes do plantio. O tratamento controle foi imerso em água destilada durante o tempo de inoculação. Os experimentos foram avaliados semanalmente quanto ao número de folhas, diâmetro e comprimento da parte aérea. Aos 109 dias foi coletada uma planta por vaso e avaliado o perfilhamento, a área foliar e a massa fresca e seca de raízes, caules, folhas e toletes. A análise tecidual de macroelementos e teor de 15N nas diferentes partes foi realizado na coleta final. Estes parâmetros foram submetidos à análise de variância e o teste F ($p < 0.05\%$) para separação das médias. Usando biometria e o acúmulo de biomassa foi observado que o crescimento inicial foi maior nas plantas inoculadas em nove genótipos, sendo que dois não responderam à aplicação e apenas um genótipo reduziu o crescimento nas duas coletas realizadas. Entre as espécies avaliadas, os seis genótipos de *S. spontaneum* responderam positivamente à inoculação e o inverso ocorreu com *S. officinarum*, onde apenas um genótipo respondeu positivo e em apenas dois parâmetros. O genótipo de *Sacharum* sp, Q45416, reduziu o crescimento das plantas inoculadas. O ganho de massa fresca e seca ao final do ensaio apresentou outro perfil de resposta, sendo positivo apenas para o genótipo US72-1319, CPDAU 849678 e NG77-122, todos pertencentes a espécie *S. spontaneum* e o *Miscanthus* Figi 10 e negativo para Q45416. Quanto ao acúmulo de macronutrientes, fósforo foi o que mais diferiu entre os genótipos seguido de cálcio. Dentre os 12 genótipos testados, *S. spontaneum* US72-1319, acumula mais nutrientes especialmente N quando inoculado, sendo considerado responsivo à aplicação da bactéria BR11145.

Palavras-chave: Nitrogênio. *Poaceae*. *Saccharum*. Bactéria.

ABSTRACT

Silva, Alex Paulo Lemos da. **Initial growth of genotypes belonging to the *Saccharum* Complex to the inoculation of the diazotrophic bacterium *Nitrospirillum amazonense*.** 2022. 52p. Dissertation (Master in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ.

The production of sugar and alcohol in Brazil comes from the planting of hybrids from the crossing of species belonging to the *Saccharum* Complex. These genotypes, used for crossing commercial sugarcane hybrids, can also play an important role in the generation of energy and biofuels. However, little is known about the growth response when inoculated with the diazotrophic bacteria strain *Nitrospirillum amazonense* currently recommended in Brazil as an inoculant for sugarcane. This work aimed to evaluate the initial growth of 12 sugarcane genotypes inoculated or not with a strain of this species. The genotypes tested were: *Miscanthus* Figi 10; *S. arundinaceus* IJ76-364; *S. officinarum* IJ76470, Hinahina; the hybrid SP791011; *S. robustum* US760414; *S. spontaneum* US72-1319, Arundinoid B, CPDAU849678, NG77-042, NG77-122; and *Sacharum* sp. Q45416. Two experiments were carried out in a greenhouse in a randomized block design with or without bacterial inoculation and six replications. Pots containing 3 kg in sand:soil substrate sieved in the proportion of 2:1 (v/v) containing two plants each. Inoculation was carried out by immersion of seedlings in a solution diluted in distilled water 1:100 (v/v) of the inoculant immobilized in peat for 30 minutes before planting. The control treatment was immersed in distilled water during the inoculation time. The experiments were evaluated weekly regarding the number of leaves, diameter, and length of the shoot. At 45 days and 109 days, one plant per pot was collected and the tillering, leaf area, and fresh and dry mass of roots and aerial plant tissue were evaluated. Analysis of macro elements and ¹⁵N content in the different parts including the remained bud was performed at the final harvest. These parameters were submitted for variance and mean separation analysis using the F test ($p < 0.05\%$). Using biometric parameters and biomass accumulation it was observed that the initial growth was higher in plants inoculated in nine genotypes, two did not respond to application, and only one genotype reduced growth. Among the evaluated species, the six genotypes of *S. spontaneum* responded positively to inoculation and the opposite occurred with *S. officinarum*, where only one genotype responded positively and in only two parameters. The *Sacharum* sp genotype, Q45416, reduced the growth upon inoculation. The fresh and dry mass at the end of the trial showed another response profile, being positive only for the genotype US72-1319, CPDau 849678 and NG77-122, all belonging to the species *S. spontaneum* and *Miscanthus* Figi 10, being negative for Q45416. In relation to the macronutrient's accumulation, phosphorus showed different responses upon inoculation followed by calcium. Among the 12 genotypes tested, *S. spontaneum* US72-1319 accumulates more nutrients, especially N when inoculated, being considered responsive to the application of the bacterium BR11145.

Keywords: Nitrogen. *Poaceae*. *Saccharum*. Bacteria.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crescimento das plantas no vaso (a) e diferença de germinação entre os materiais testados (b) aos 30 DAP.	11
Figura 2. Crescimento de diferentes genótipos de cana de açúcar pertencentes ao complexo <i>Saccharum</i> 80 dias após o plantio. (a) Vista lateral, (b) destaque do maior crescimento de <i>S. spontaneum</i> US72-1319.	14
Figura 3. Relação Raiz/Parte aérea de 12 genótipos de cana de açúcar inoculados com <i>N. amazonense</i> BR11145 e avaliados aos 109 dias após o plantio (n = 6). * F teste (p < 0,05).	16
Figura 4. Ranking de ganho de massa seca da parte aérea (g) de 12 genótipos de cana inoculados ou não com Na-BR 11145, aos 109 dias após o plantio (n = 6).....	19
Figura 5. Ranking de ganho de massa seca de raiz (g) de 12 genótipos de cana inoculados ou não com Na-BR11145, 109 dias após o plantio (n = 6).	20

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Resultado de análise de solo utilizado nos dois experimentos de casa de vegetação.	10
Tabela 2. Biometria de 12 genótipos de cana de açúcar pertencente ao Complexo <i>Saccharum</i> inoculadas com a estirpe BR11145 aos 109 dias após o plantio.	13
Tabela 3. Valores médios de germinação dos materiais utilizados no experimento 2.	15
Tabela 4. Massa fresca e seca da parte aérea e área foliar de 12 genótipos de cana de açúcar pertencentes ao Complexo <i>Saccharum</i> inoculados ou não com <i>N. amazonense</i> BR11145, avaliados aos 109 dias após o plantio.	18
Tabela 5. Teor de N na raiz, parte aérea e nos toletes usados para o plantio de 12 genótipos de cana de açúcar pertencentes ao Complexo <i>Saccharum</i> inoculados ou não com <i>N. amazonense</i> BR11145, e avaliados aos 109 dias após o plantio.	21
Tabela 6. Teor de potássio na raiz, parte aérea e nos toletes usados para o plantio de 12 genótipos de cana de açúcar pertencentes ao Complexo <i>Saccharum</i> inoculados ou não com <i>N. amazonense</i> BR11145, e avaliados aos 109 dias após o plantio.	22
Tabela 7. Teor de fósforo na raiz, parte aérea e nos toletes usados para o plantio de 12 genótipos de cana de açúcar pertencentes ao Complexo <i>Saccharum</i> inoculados ou não com <i>N. amazonense</i> BR11145, e avaliados aos 109 dias após o plantio.	23
Tabela 8. Teor de cálcio na raiz, parte aérea e nos toletes usados para o plantio de 12 genótipos de cana de açúcar pertencentes ao Complexo <i>Saccharum</i> inoculados ou não com <i>N. amazonense</i> BR11145, e avaliados aos 109 dias após o plantio.	24
Tabela 9. Teor de magnésio (Mg) na raiz, parte aérea e nos toletes usados para o plantio de 12 genótipos de cana de açúcar pertencentes ao Complexo <i>Saccharum</i> inoculados ou não com <i>N. amazonense</i> BR11145, e avaliados aos 109 dias após o plantio.	26
Tabela 10. Acúmulo de macro nutrientes na planta (raiz e parte aérea) de 12 genótipos de cana de açúcar inoculados ou não com <i>N. amazonense</i> BR11145 aos 109 DAP.	27
Tabela 11. Acúmulo de macro nutrientes na parte aérea, de 12 genótipos de cana de açúcar inoculados ou não com <i>N. amazonense</i> BR11145 aos 109 DAP.	28
Tabela 12. Balanço de N nos vasos contendo 12 genótipos de cana inoculados ou não com <i>N. amazonense</i> aos 109 DAP.	30
Tabela 13. Balanço de K nos vasos contendo 12 genótipos de cana inoculados ou não com <i>N. amazonense</i> aos 109 DAP.	32
Tabela 14. Balanço de P nos vasos contendo 12 genótipos de cana inoculados ou não com <i>N. amazonense</i> aos 109 DAP.	34
Tabela 15. Balanço de Ca nos vasos contendo 12 genótipos de cana inoculados ou não com <i>N. amazonense</i> aos 109 DAP.	37
Tabela 16. Balanço de Mg nos vasos contendo 12 genótipos de cana inoculados ou não com <i>N. amazonense</i> aos 109 DAP.	38
Tabela 17. Valores de delta ¹⁵ N dos 12 genótipos de cana inoculados ou não com <i>N. amazonense</i> aos 109 DAP e a marcação do solo usado nos dois experimentos e valor de referência da planta não fixadora (Painço).	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Cana-de-Açúcar, sua Importância no Cenário Nacional e Internacional.....	3
2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).....	4
2.2. Nitrogênio e sua Importância na Nutrição da Cana-de-Açúcar	4
2.3. Bactérias Diazotróficas Promotoras de Crescimento Vegetal (BDPCV)	5
2.4 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).....	6
2.4.1 <i>Nitrospirillum amazonense</i>	8
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1 Genótipos de Cana-de-Açúcar e Estirpe Bacteriana.....	9
3.2 Análise de Viabilidade de Inoculante	9
3.3 Preparo do Substrato	10
3.4 Tratamentos	10
3.5 Delineamento Experimental	10
3.6 Variáveis Analisadas.....	11
3.6.1 Variáveis não destrutivas	11
3.6.2 Variáveis destrutivas	11
3.7 Análise Estatística.....	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5. CONCLUSÕES	41
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura originária da Ásia, semiperene pertencente à família *Poaceae*, gênero *Saccharum*. Foi introduzida no Brasil por volta de 1500 pelos portugueses e desde então se espalhou em todo o território nacional. Além do gênero *Saccharum*, os gêneros *Erianthus*, *Miscanthus*, *Narenga* e *Sclerostachya* são cultivados da mesma forma que a cana-de-açúcar e utilizados no melhoramento genético. A maioria das variedades cultivadas são híbridos oriundos do cruzamento entre *Saccharum officinarum* x *Saccharum spontaneum*.

O gênero *Saccharum* contém seis espécies, quatro domesticadas: *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinensis* e *S. edule* e duas silvestres: *S. spontaneum* e *S. robustum* (DO AMARAL et al., 2015). O *S. officinarum* apresenta altos teores de sacarose e baixos de fibras, sendo a espécie mais indicada para produção de açúcar e etanol, enquanto *S. robustum* e *S. spontaneum* apresentam maior robustez, menores teores de sacarose e maiores de fibras, com seu uso indicado para produção de biomassa e doadoras de alelos de robustez em programas de melhoramento genético (ALVIM, 2015; SILVEIRA, 2014). O *S. spontaneum* possui colmos finos e eretos, alta produção de perfilhos e resistência a pragas e doenças, enquanto *S. robustum* possui maior diâmetro que *S. spontaneum* e menor que *S. officinarum* (MELLONI, 2014). O principal uso da cana-de-açúcar é para produção de açúcar, etanol, alimentação animal e biomassa. O Brasil é o maior produtor de cana, seguido da Índia e da China e a safra brasileira foi de 635 milhões de toneladas métricas para 2021/22 (CONAB, 2021) com previsão de redução na safra atual.

Um dos principais nutrientes exigidos pela cultura é o nitrogênio, elemento constituinte de moléculas orgânicas como aminoácidos e proteínas, portanto elemento essencial para organismos vivos. Os microrganismos do solo podem se alimentar de qualquer forma de N, desde que não seja completamente oxidado e, por isso é normalmente encontrado na forma de NO_3 . O nitrogênio é normalmente disponibilizado para as plantas comerciais pela aplicação de fertilizante sintético nitrogenado que, por sua vez, apresenta baixa eficiência por sua alta solubilidade, alto custo e potencial de eutrofização de ambientes aquáticos. Outro fator é a dependência de combustíveis fósseis no processo de produção de fertilizante químico nitrogenado, o que afeta sua variação de preço e impacto ambiental. O aumento da disponibilidade de nitrogênio solúvel oriundo das atividades humanas de aplicações intensivas de fertilizantes na agricultura tem promovido perturbações no ciclo do nitrogênio, acumulando nitratos nos corpos hídricos e óxidos nitrosos na atmosfera (HERRIDGE et al., 2008). Uma outra forma pela qual diversas plantas acessam o nitrogênio é através da associação com microrganismos capazes de tornar forma atmosférica e abundante de N_2 em formas absorvíveis pelos vegetais, processo denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN) e estes microorganismos são denominados diazotróficos (BUYER & KAUFMAN, 1996).

É sabido que *Poáceas* são capazes de se associarem a microrganismos fixadores de nitrogênio, como em cana de açúcar, que pode atingir até 40% de sua demanda anual de N suprida pela FBN (URQUIAGA et al., 2012) e variando conforme espécie da planta pela associação com bactérias diazotróficas. Diversos gêneros e espécies foram descritas e capazes de promover ganhos de N na cultura, de modo que um dos microrganismos capazes de se associar à cana-de-açúcar é o *Nitrospirillum amazonense* que, por sua vez, pode fornecer parte do nitrogênio necessário ao desenvolvimento da cultura, além de apresentar outros mecanismos de promoção de crescimento vegetal (REIS et al., 2020). O *Nitrospirillum amazonense* foi isolado em gramíneas oriundas da região amazônica e do Rio de Janeiro (MAGALHÃES et al., 1983), inicialmente descrito *Azospirillum amazonense*, porém posteriormente foi reclassificado

como *N. amazonense* (LIN et al., 2014) apresentando características que a distinguem do gênero *Azospirillum*. Principais características que o diferencia são: menor tamanho celular, melhor desenvolvimento em concentrações de hidrogênio entre pHs 5,8 e 6,8, sensibilidade a pHs alcalinos e uso de malato e sacarose como fonte de carbono (THAKURIA et al., 2004). *N. amazonense* também é capaz de secretar ácido-3-acético (AIA), produzir biofilme e fitocromos bacterianos (HAYASHI & ANNA, 2011) e outros meios capazes de interferir no desenvolvimento vegetal.

O *Nitrospirillum amazonense* é recomendado como promotor de crescimento em cana-de-açúcar através da estirpe BR11145 desenvolvida pela Embrapa e disponível como produto comercial. Porém pouco se sabe sobre seus efeitos em materiais de cana-de-açúcar robustos com potencial de doadores de alelos no melhoramento genético ou, ainda, de serem usados como cana energia.

A FBN em cultivos apresenta potencial de redução de impactos ambientais oriundos da aplicação de fertilizantes, mostrando ser capaz de contribuir no desenvolvimento sustentável da agricultura. A aplicação de inoculante comercial de *Nitrospirillum amazonense* já é recomendada para a cana-de-açúcar, porém se faz necessário levantamento de seus efeitos nos genótipos usados no melhoramento genético vegetal de cana de açúcar.⁷

Assim sendo, este trabalho tem por finalidade avaliar o efeito da inoculação de *Nitrospirillum amazonense* no crescimento inicial de genótipos de cana-de-açúcar oriundos do banco de germoplasma do Complexo *Saccharum* da Embrapa Agrobiologia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cana-de-Açúcar, sua Importância no Cenário Nacional e Internacional

Mais de 80 países cultivam cana-de-açúcar (CONAB, 2021). O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido da Índia e China (SILVA, 2017) (USDA, 2020) (SILVA et al., 2020) com safra 2021/2022 estimada de 592 milhões de toneladas, 9,5% a menos que o ano anterior e em uma área de 8.243,1 mil hectares (CONAB, 2021). Original da Ásia, a cana-de-açúcar (família *Poaceae*, gênero *Saccharum*) foi introduzida no Brasil por volta de 1500, trazida pelos portugueses. Seu centro de origem é Nova Guiné no Oceano Pacífico. É uma gramínea perene, uma espécie capaz de crescer em ampla faixa de habitats e altitudes, adaptando-se a diferentes ambientes (SILVA, 2017).

Os principais usos da cana-de-açúcar são para produção do açúcar, sendo subdividido entre açúcares (cristal, mascavo, demerara e outros) e para produção de etanol (anidro ou hidratado). A cana-de-açúcar também é produzida e utilizada na alimentação animal como forrageira e sua biomassa também pode ser usada como combustível na geração de energia na forma de calor ou eletricidade (FERREIRA et al., 2016), além do etanol de segunda geração e o biogás, de uso mais recente. Usando subprodutos a cana pode ser utilizada na produção de plásticos biodegradáveis, além de ser fonte de nutrientes para produção de leveduras, e outros usos biotecnológicos.

Original da Ásia, a cana-de-açúcar pertence à família *Poaceae* sendo hoje plantadas variedades comerciais que são fruto do cruzamento de espécies diferentes dentro do que se reconhece com o Complexo *Saccharum*. Esta cultura foi introduzida no Brasil por volta de 1500 e trazida pelos portugueses. Seu centro de origem é Nova Guiné no Oceano Pacífico. É uma gramínea perene, uma espécie capaz de crescer em ampla faixa de habitats e altitudes, adaptando-se a diferentes ambientes (SILVA, 2017).

O complexo '*Saccharum*' é composto por cinco gêneros, sendo eles: *Saccharum*, *Erianthus*, *Miscanthus*, *Narenga* e *Sclerostachya*. Existem 6 espécies no gênero *Saccharum*, sendo elas: *Saccharum officinarum*, *S. robustum*, *S. barberi*, *S. sinense*, *S. spontaneum* e *S. erianthus*. A espécie *S. officinarum* se destaca pelo alto teor de sacarose e baixo de fibras, contrastando com *S. robustum* e *S. spontaneum* que são consideradas mais selvagens e apresentam menores teores de sacarose e maiores de fibras. Estas duas espécies são indicadas para geração de energia através de sua biomassa ou como doadoras de alelos de robustez em programas de melhoramento (ALVIM, 2015; SILVEIRA, 2014). *S. spontaneum* L. (2n = 40-128) é uma planta selvagem, isto é, não melhorada que apresenta elevado polimorfismo e distribuído em várias regiões desde Nova Guiné até a África e Mediterrâneo, sendo a Índia seu centro de origem e diversidade (AMALRAJ & BALASUNDARAM, 2006). Apresenta colmos finos e eretos, alta produção de perfilho e resistência a muitas pragas e doenças (MELLONI, 2014; CLEMENTS, 1980; DO AMARAL et al., 2015). *S. robustum* Brandes et Jesw. (2n = 60,80) é uma planta selvagem presente na Indonésia. Possui diâmetro maior que *S. spontaneum* sendo o nome '*robustum*' derivado da característica de grande altura e vigor e, ainda, *S. spontaneum* e *S. robustum* podem ser usadas em trabalhos de construção (CLEMENTS, 1980). *S. barbari* Jesw é originário do norte da Índia, são cana de colmos finos e inclui cinco grupos: *Mungo*, *Nargori*, *Saretha*, *Sunnabile* e *Pansahi* (AMALRAJ & BALASUNDARAM, 2006). Estes mesmos autores descrevem que *S. sinense* Roxb. São cana chinesas e com elevado número de cromossomos (2n = 81-124), são plantas altas de folhas largas. *S. edule* Hassk. (2n = 60-80) é cultivado na Nova Guiné até Fiji para fins comestíveis de sua inflorescência. *Erianthus* é um gênero considerado primitivo do complexo *Saccharum* e está distribuído nas Américas, Mediterrâneo e Índia, China e Nova Guiné (AMALRAJ & BALASUNDARAM, 2006). Este

gênero possui sete espécies e dentre elas o *E. arundinaceus* (Retz) Jesw. (2 n = 30, 40, 60) distribuído na Índia, China, Indonésia e Nova Guiné.

Durante o início de 1900, os melhoristas de cana-de-açúcar fizeram cruzamentos interespecíficos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* e depois retrocruzaram com *S. officinarum*, um processo conhecido como "nobilização" (EDME et al. 2005; ROACH 1989; ROACH 1971). Esses cruzamentos resultaram nos genótipos híbridos de *Saccharum* usados comercialmente hoje, que normalmente possuem uma composição genética de 80% de *S. officinarum*, 10% de *S. spontaneum* e 10% de cromossomos recombinantes, possuem alto teor de sacarose, alguma resistência a doenças e boa capacidade de produzir novas soqueiras (D'HONT E GLASZMANN 2001; GRIVET & ARRUDA 2001; MATSUOKA & GARCIA 2011). Em 1992, Urquiaga et al., quantificaram a contribuição da FBN e observaram que o genótipo Krakatau, um *S. spontaneum*, foi o que apresentou as maiores contribuições advindas da FBN. Uma das possíveis explicações está no seu crescimento vigoroso, rusticidade e resistência que podem estar associadas a uma microbiota mais competitiva.

As áreas em que a cana-de-açúcar é conduzida normalmente apresentam baixa fertilidade natural do solo sendo que dentre os nutrientes mais exigidos pela cana-de-açúcar, o nitrogênio (N) destaca-se pela importância na nutrição e fisiologia da planta pois, dentre outras funções, é constituinte das proteínas e dos ácidos nucleicos.

2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

As atividades humanas têm aumentado a disponibilidade de nitrogênio no ambiente através da aplicação de fertilizantes altamente solúveis e de baixa eficiência na agricultura. Esta aplicação intensiva de fertilizantes na agricultura tem levado a perturbações sem precedentes no ciclo do nitrogênio, demonstrado pela acumulação de nitratos nos corpos d'água, além dos óxidos nitrosos na atmosfera (HERRIDGE et al., 2008). A fixação do nitrogênio pode se dar de forma biológica e industrial, sendo que no processo industrial usada na produção de fertilizantes nitrogenados, apresenta alto custo energético e uso de combustíveis fósseis o que, por sua vez, ocasiona liberação de gases promotores de efeito estufa. Os fertilizantes químicos nitrogenados por serem dependentes de combustíveis fósseis apresentam alto custo de produção. Já o processo de fixação biológica de N₂ consiste em transformação do N₂ abundante na atmosfera e indisponível para absorção direta por organismos eucariotos para formas assimiláveis por estes. Estes organismos fixadores de nitrogênio são capazes de quebrar a ligação tripla das moléculas de N₂ através da enzima nitrogenase, uma reação com alto custo energético e que é inibida pela presença de O₂, gás capaz de inativar a enzima (OLIVARES et al., 2013). Os microrganismos fixadores de nitrogênio capazes de se associar com plantas são denominados diazotróficos e podem ser de interesse agrônomo. Microrganismos de vida livre também são capazes de realizar FBN, porém sua importância na agricultura é muito baixa devido à alta demanda energética da fixação de N₂.

2.2. Nitrogênio e sua Importância na Nutrição da Cana-de-Açúcar

O nitrogênio, cujo símbolo químico é N, encontra-se na natureza em forma gasosa (N₂), iônica (NH₄⁺, NO₂⁻ e NO₃⁻) e ainda, em diversas estruturas orgânicas como aminoácidos (unidades fundamentais das proteínas) e nucleotídeos (subunidades formadoras do RNA, DNA e do ATP), além de outros diversos compostos como os alcaloides.

Este elemento é o segundo nutriente mais absorvido pela planta de cana de açúcar, e dependendo da variedade, vem depois do potássio (OTTO et al., 2010; COLETI et al., 2002). Embora faça parte de apenas 1% da matéria seca da cana-de-açúcar, possui papel fundamental no desenvolvimento e potencial produtivo da cultura. Sua deficiência causa efeitos

generalizados sobre toda a planta, como o definhamento das folhas mais velhas (lâminas foliares ficam verde-claras a amarelas), os colmos ficam mais curtos e finos, as pontas e margens das folhas mais velhas tornam-se necróticas prematuramente, ocasionando a redução na longevidade das folhas, resultando na redução do potencial produtivo do canavial. Um canavial bem nutrido em nitrogênio apresenta-se verde e exuberante, uma vez que este nutriente estimula a brotação, o enraizamento e o desenvolvimento de perfilhos.

O uso de N na agricultura de forma eficiente tem se mostrado de extrema importância não só para o desenvolvimento e produção vegetal mas também pelo custo, e quando utilizado erroneamente, pode elevar os efeitos nocivos de emissões de gases de efeito estufa, além da própria produção de N-fertilizante que consome grandes quantidades de energia fóssil (BODDEY et al., 2008; MACEDO et al., 2008), representando 22% do consumo de energia e 11% das emissões de gases de efeito estufa para a produção de etanol (SEABRA et al., 2011).

Atualmente a visão do produtor rural leva em conta o custo do adubo e sendo o nitrogenado o que apresenta um dois mais elevados na atualidade devido a quantidade utilizada, normalmente de 30 a 50 kg na cana-planta e chegando a 120-150 kg N na cana-soca (BODDEY et al., 2008). Normalmente a recomendação de N na cana leva em conta a produtividade esperada, a fase de crescimento (planta ou soca) e o ambiente de produção que engloba dados do tipo de solo e do clima da região para determinado ano agrícola. Portanto, aplicar N nos canaviais precisa estar vinculado à resposta agrônômica para ser viável, isto pode também ser válido para os demais nutrientes. Outro ponto importante é que uma agricultura com menores riscos ambientais relacionados à adição de N mineral em excesso também não é ambientalmente correta.

Estudos recentes têm mostrado que a cana utiliza de 20 a 40% do N aplicado na forma de fertilizantes (VIEIRA-MEGDA et al., 2015; OTTO et al., 2016) e que a baixa utilização do adubo pode estar ligada a habilidade radicular de usar o N na forma de nitrato, diferindo de outras plantas C4 como o milho e o sorgo (LIMA et al., 2022); forma esta que está presente em maior quantidade nos solos agrícolas (MILLER et al., 2007). Outra questão importante refere-se a recomendação de N fertilizante no Brasil que não excede 100 kg N ha⁻¹ por ano (ROBINSON et al., 2011) e que tradicionalmente é menor que em outros países como a Austrália, que aplica em média de 140 a 220 kg N ha⁻¹ por ano ou a Índia que pode atingir patamares de 400 kg N ha⁻¹ por ano (ROBINSON et al., 2011). Este uso de N associado a seleção de variedades que não respondem a adubações nitrogenadas elevadas pode também favorecer a resposta da cultura a aquisição de N via processos biológicos como a FBN, e deste modo manter uma população ativa em maior número permitindo que 40% do N seja obtido via FBN (URQUIAGA et al., 2012).

Outro ponto importante é que o uso do N acima da demanda do vegetal pode ocasionar acidificação dos solos, especialmente através do uso do sulfato de amônio, contaminação do ar via produção de gás resultante em óxido nitroso, contribuindo para o efeito estufa e à depleção de ozônio na estratosfera e poluição de águas de superfície e dos aquíferos (ISHERWOOD, 2000). A procura por alternativas mais sustentáveis de obtenção de N para a cultura de cana-de-açúcar, que apresenta relevante importância mundial, tem crescido significativamente nos últimos anos. Uma destas alternativas são as pesquisas evidenciando a eficiência da aplicação de bactérias promotoras de crescimento vegetal e capazes de fixar nitrogênio atmosférico, tornando-se de suma importância ambiental, econômica e social.

2.3. Bactérias Diazotróficas Promotoras de Crescimento Vegetal (BDPCV)

Entre as alternativas existentes para reduzir o impacto e aumentar a eficiência do uso de fertilizantes químicos, podendo levar à diminuição da quantidade aplicada em ambientes de produção agrícola, está no uso de inoculantes que contêm bactérias diazotróficas promotoras

de crescimento vegetal (BDPCV). Estes inoculantes contém bactérias benéficas e que promovem o crescimento vegetal por diversos mecanismos incluindo a redução do N atmosférico pela presença e atuação da enzima nitrogenase. Estas bactérias compreendem um grupo bastante diverso e são utilizadas na agricultura na forma de inoculantes contendo células vivas, que uma vez em contato com a planta, são capazes de colonizar os tecidos vegetais e contribuir para o crescimento, incluindo a contribuição na aquisição de nutrientes. Não só nitrogênio está diretamente envolvido nesta promoção, mas a absorção de água e nutrientes é observada em plantas inoculadas com estas BDPCV (SCHULTZ et al., 2014; SANTOS et al., 2019). Diversos mecanismos diretos e/ou indiretos são citados nesta promoção de crescimento, sendo os mais conhecidos relacionados à produção de reguladores de crescimento (CASSAN et al., 2014).

Diversos autores têm relatado resultados obtidos com a inoculação de bactérias promotoras de crescimento na cultura da cana-de-açúcar. Gírio et al. (2015), ao avaliar os efeitos da inoculação de bactérias promotoras de crescimento sobre a formação de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar, concluíram que a inoculação associada ao fornecimento de N favorece o crescimento inicial da parte aérea, ao aumentar o perfilhamento, a altura, o diâmetro e a produção das matérias secas de colmos, palha e total das plantas. Já Marques Júnior et al. (2008), avaliando o efeito do uso combinado de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas sobre a promoção de desenvolvimento de mudas. Pereira et al. (2013), aplicaram uma mistura de cinco estirpes em variedades comerciais de cana-de-açúcar e observaram que inoculação promoveu ganhos de biomassa dependendo da variedade utilizada e estirpes inoculada, sugerindo uma interação entre estes fatores. Schultz et al. (2014), avaliaram a eficiência do inoculante contendo cinco estirpes no desempenho agrônomo e na nutrição nitrogenada da cana-de-açúcar, com aumento na produtividade de colmos nas colheitas de cana-planta e primeira soqueira.

Dentre os diazotróficos em cana-de-açúcar, se destaca o gênero *Nitrospirillum* por ser hoje a estirpe utilizada na forma de inoculante recomendada pelo MAPA para a cana de açúcar (REIS et al., 2020). Este é o primeiro produto nacional desenvolvido pela pesquisa que utiliza uma estirpe isolada da própria planta e com eficiência agrônoma comprovada.

2.4 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

As atividades humanas têm aumentado a disponibilidade de nitrogênio no ambiente através da aplicação de fertilizantes altamente solúveis e de baixa eficiência na agricultura. Esta aplicação intensiva de fertilizantes na agricultura tem levado a perturbações sem precedentes no ciclo do nitrogênio, demonstrado pela acumulação de nitratos nos corpos d'água, além dos óxidos nitrosos na atmosfera (HERRIDGE et al., 2008). A fixação do nitrogênio pode se dar de forma biológica e industrial, sendo que no processo industrial usada na produção de fertilizantes nitrogenados, apresenta alto custo energético e uso de combustíveis fósseis o que, por sua vez, ocasiona liberação de gases promotores de efeito estufa. Os fertilizantes químicos nitrogenados por serem dependentes de combustíveis fósseis apresentam alto custo de produção. Já o processo de fixação biológica de N₂ consiste em transformação do N₂ abundante na atmosfera e indisponível para absorção direta por organismos eucariotos para formas assimiláveis por estes. Estes organismos fixadores de nitrogênio são capazes de quebrar a ligação tripla das moléculas de N₂ através da enzima nitrogenase, uma reação com alto custo energético e que é inibida pela presença de O₂, gás capaz de inativar a enzima (OLIVARES et al., 2013). Os microrganismos fixadores de nitrogênio capazes de se associar com plantas são denominados diazotróficos e podem ser de interesse agrônomo. Microrganismos de vida livre também são capazes de realizar FBN, porém sua significância na agricultura é muito baixa devido à alta demanda energética da fixação de N₂.

Muitas bactérias associativas e consideradas endofíticas foram isoladas e identificadas a partir de amostras de tecidos de cana de açúcar. Por exemplo, *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE & DOBEREINER, 1989), *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al., 1986, 1996), *Nitrospirillum amazonense* (LIN et al., 2013). *Pseudomonas* (LI et al., 2017) e *Paraburkholderia tropica* (REIS et al., 2004) e muitas outras. O de comum é a utilização de métodos tradicionais de cultivo. Mas também estudos utilizando sequenciamento, especialmente da 16S rRNA também mostraram grande diversidade de espécies (SOUZA et al., 2016; YEOH et al., 2016).

Estudos de quantificação da FBN são realizados com cana a mais de 35 anos e para tal o isótopo mais pesado do N é usado. O ^{15}N possui uma grande vantagem, não é radioativo e facilmente discriminado do ^{14}N por uso de espectrometria de massa. A aplicação de métodos com o isótopo estável ^{15}N permitem monitorar as transformações individuais do N no solo, mesmo quando múltiplas transformações ocorrem simultaneamente no meio. Esses métodos traçam o movimento dos dois isótopos de N (^{15}N e ^{14}N) simultaneamente fornecendo informações acerca do sistema e estimando as taxas de transformações do N (FRANCO et al., 2011). O uso do ^{15}N -fertilizante possibilita o acompanhamento e quantificação do N na planta nos diferentes compartimentos de um sistema em estudo. A principal vantagem é a possibilidade de distinção do N na planta, do proveniente do solo e o N do fertilizante (TRIVELIN et al., 1994) e por diferença a entrada do N atmosférico via FBN (URQUIAGA et al., 1992; 2012).

Um dos primeiros estudos que mostrou a contribuição da FBN na cultura da cana foi conduzido em potes contendo solo enriquecido com ^{15}N (LIMA et al., 1987). Neste ensaio foram testadas quatro variedades e apenas duas apresentaram resultados positivos, sendo observada a contribuição de 60% na variedade CB47-89. Usando tanque preenchido com solo marcado com ^{15}N , 10 outras variedades de cana-de-açúcar foram avaliadas por três anos e a contribuição comparada com *Brachiaria arrecta*, a planta usada como controle não fixador (URQUIAGA et al., 1992). A resposta foi variada novamente, e a variedade SP70-1143 foi a mais promissora, recebendo via FBN, 60% do nitrogênio presente em seus tecidos. Em estudos posteriores, já com a seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio observou-se um incremento na nutrição da planta via FBN de cerca de 30% (OLIVEIRA et al., 2006). Este estudo comparou cinco estirpes aplicadas em mistura e duas variedades e o experimento foi plantado em três locais diferentes. No solo mais restritivo a contribuição da mistura de cinco estirpes observou-se que 31% do N foi oriundo do processo biológico e neste caso, plantas inoculadas. Estes estudos mostraram a importância de se conhecer a contribuição da FBN na nutrição de cana e buscar por alternativas de seleção de estirpes que pudessem ser usadas na forma de inoculante na agricultura brasileira. A partir de 2009 o primeiro inoculante para milho foi lançado e em 2019 o mesmo aconteceu para a cana. A bactéria *Nitrospirillum amazonense*, antiga *Azospirillum*, foi testada em diferentes locais por três anos consecutivos e comparada a mistura selecionada por Oliveira et al., (2006). Esta estirpe, a CBAMC (=BR11145), fez parte da mistura de cinco estirpes avaliada por estes autores, mas por se tratar de um produto comercial a escolha de produtos simples foi viável. Hoje *N. amazonense* BR11145 é a estirpe utilizada na forma de inoculante recomendada pelo MAPA para a cana de açúcar (REIS et al., 2020). Este é o primeiro produto nacional desenvolvido pela pesquisa que utiliza uma estirpe isolada da própria planta e com eficiência agrônômica comprovada.

Sabe-se que variedades de cana respondem a contribuição da FBN de forma distinta. Os trabalhos pioneiros de Lima et al. (1987) e Urquiaga et al. (1992, 2012) mostram que esta variabilidade é esperada. Mas não se conhece a resposta de espécies de cana não melhoradas. A oportunidade de se utilizar o germoplasma de cana disponibilizado para a pesquisa por ajudar a entender que ancestral usado no cruzamento varietal traz esta resposta a aplicação do

inoculante e se a cana não melhorada se comporta de forma similar a aplicação de BDPCV que variedades comerciais.

2.4.1 *Nitrospirillum amazonense*

A espécie *Nitrospirillum amazonense* foi originalmente isolada em gramíneas da região amazônica e Rio de Janeiro (MAGALHÃES et al., 1983), sendo descrita como *Azospirillum amazonense* e posteriormente reclassificada como *Nitrospirillum amazonense* (LIN et al., 2014). Segundo Magalhães et al. (1983), Baldani & Bandani (2005) e Hayashi & Anna (2011), as principais características da espécie que a diferencia de *Azospirillum brasilense* são: menor tamanho celular; multiplicação preferencial em teores de pH entre 5,8 e 6,8 sendo sensível a teores de pH alcalinos; uso de sacarose e malato (THAKURIA et al., 2004) como fonte de carbono; ausência de flagelos laterais.

A estirpe BR11145 mostrou efeitos positivos no crescimento das plantas quando inoculada em cana-de-açúcar no campo (REIS et al. 2020; de SANTIS SICA et al. 2020). Esta estirpe foi inicialmente isolada de colmos esterilizados superficialmente de cana de açúcar, o que sugere sua capacidade de estabelecimento endofítico naquele órgão (SCHWAB et al. 2018). Usando diferentes métodos para visualizar a colonização de cana após a aplicação do inoculante contendo BR11145, duas técnicas complementares foram usadas para testar três métodos de inoculação e obter conhecimento sobre o padrão de colonização da estirpe BR11145 em cana-de-açúcar: primeira a metodologia de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) associada à microscopia confocal de varredura a laser (CSLM), e a segunda, reação quantitativa em cadeia da polimerase (qPCR) (SCHWAB et al., 2023). Os resultados da qPCR indicaram que a inoculação nos mini-toletes (uma gema) foi mais eficiente quando comparada com a inoculação no substrato ou na folha. Além disso, a bactéria não apresenta quantidades significativas de sobrevivência no substrato, demonstrando que prefere a associação com a planta, ao invés de permanecer no solo. Estes resultados mostram que a bactéria é dependente das fontes de carbono provenientes da planta para se manter no ambiente, diferente de estirpes de *Azospirillum* e *Rhizobium*, que são bactérias que mantem populações no solo longe da planta, embora se beneficiem este contato.

Dentre seus mecanismos de atuação como promotora de crescimento vegetal se destaca a fixação biológica de N₂. Hayashi & Anna (2011) também afirmam que *N. amazonense* é capaz de secretar ácido indol-3-acético (AIA), produzir biofilme e fitocromos bacterianos. A análise genômica realizada na bactéria CBAmC revelou a presença de genes possivelmente envolvidos em mecanismos de interação com a planta hospedeira e estimulação do crescimento vegetal, como genes para uso de sacarose e N-glicanos, biossíntese de moléculas autoindutoras, produção e aquisição de sideróforos, biossíntese de auxinas e poliaminas, flagelos, σ -fimbrias, sistemas de secreção e um sistema de desnitrificação completo (SCHWAB et al. 2018). Todas essas funções e estruturas celulares são candidatas a estarem envolvidas com os efeitos positivos da inoculação bacteriana observados em condições de campo.

Estas observações mostram que em variedades comerciais, a estirpe BR11145 se mostrou capaz de colonizar tecidos e posteriormente promover o crescimento e aumentar a produtividade de plantas inoculadas. Mas a resposta desta estirpe em materiais não melhorados é o objetivo deste trabalho.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos com duração de 109 dias avaliando respostas de genótipos de cana-de-açúcar à inoculação de bactéria diazotrófica *N. amazonense* estirpe BR11145; em casa de vegetação com temperatura controlada da Embrapa Agrobiologia, município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil (22°44' S e 43°42' W e 26 m de altitude.). O primeiro experimento ocorreu no verão de 2020/2021 entre novembro de 2020 e fevereiro de 2021, enquanto o segundo ocorreu entre fevereiro e junho de 2021. O material vegetal usado nos experimentos foi originalmente obtido de plantas do National Center for Genetic Resources Preservation/ARS/USDA, Fort Collins, CO, USA. Este material vegetal foi micropropagado após quarentena e plantado no Banco Ativo de Germoplasma do Complexo *Saccharum* da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no Campo Experimental Jorge Prado Sobral, localizado em Nossa Senhora das Dores, Sergipe, Brasil, (10°29'27''S; 37°11'34''W).

3.1 Genótipos de Cana-de-Açúcar e Estirpe Bacteriana

Os genótipos de cana avaliados no primeiro experimento foram: IJ76-470 (*Sacharum officinarum*), US72-1319 (*Sacharum spontaneum*), US76-414 (*Sacharum robustum*), SP791011 (híbrido comercial) e Figi 10 (*Mischantus* sp.). No segundo foram: CP Dau 849678 (*Sacharum spontaneum*), NG77-042 (*Sacharum spontaneum*), NG77-122 (*Sacharum spontaneum*), Hinahina (*Sacharum officinarum*), IJ76-364 (*Sacharum arundinaceus*), Q 45416 (*Sacharum* sp.) e Arundinoid B (*Sacharum spontaneum*). Siglas de origem: IJ – Purari, Nova Guiné; US – USA; CP – Canal Point, Flórida-USA; NG – Papua, Nova Guiné; RB – Ridesa, SP – Copersucar, Brasil atualmente CTC (Centro de Tecnologia Canavieira); Q – Queensland, Austrália. As siglas representam os países de origem deste germoplasma.

Todo o material foi recebido dentro da parceria do projeto Pluricana, financiado pela Finep e cópia da coleção do National Center for Genetic Resources Preservation/ARS/USDA, Fort Collins, CO, USA. Com exceção dos genótipos de *S. spontaneum*, os restantes fazem parte do Banco ativo de Germoplasma de Cana-de-açúcar da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. Os *S. spontaneum* vieram da coleção da Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS. Todos os genótipos acima foram coletados do Banco de Germoplasma da Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ.

3.2 Análise de Viabilidade de Inoculante

O inoculante aplicado foi da estirpe BR11145 de *Nitrospirillum amazonense*. A verificação da viabilidade do inoculante ocorreu utilizando inoculante sólido imobilizado em turfa para a estirpe BR11145 selecionada para aplicação em cana de açúcar. Para tal foi realizada análise de crescimento pelo método de contagem em frascos contendo meio de cultura semi-sólido LGI, realizando diluições sucessivas de 10^{-1} a 10^{-9} , de modo que a cada diluição na proporção de 1:10 (v:v). Um volume de 0,1 mL da solução anterior era nesta inoculada, cada frasco contendo 5mL de meio de cultura. Após sete dias de incubação foi observada formação de película na ordem de 10^{-9} e, através da tabela McCrady para três repetições por diluição, foi realizada a técnica de número mais provável (NMP) (BALDANI et al., 2014), sendo observado em torno de $4,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) no primeiro experimento e 110×10^{10} UFC no segundo experimento.

3.3 Preparo do Substrato

O substrato consistiu de 3 Kg de solo: areia na proporção 2:1 (v/v) peneirado. Foi utilizada betoneira para homogeneização do substrato, que foi pesado e acondicionado em vaso plástico de 5 L em bancada de casa de vegetação com temperatura controlada e ventilação forçada. A água utilizada para irrigação foi filtrada e livre de cloro. O substrato foi submetido à análise química de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, %C,) cujos procedimentos foram baseados em Nogueira & Souza (2005) (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Resultado de análise de solo utilizado nos dois experimentos de casa de vegetação.

Experimento	C	Al	Ca	Mg	H + Al	K	P	N	pH (H ₂ O)
	%	cmol/dm ³				mg L ⁻¹		%	unidade
1	0,23	0,0	1,73	0,53	1,25	21,10	8,02	0,02	6,34
2	0,53	0,0	1,47	0,58	0,99	16,71	8,47	0,02	6,09
Média	0,38	0,0	1,60	0,55	1,12	18,91	8,25	0,02	6,21

3.4 Tratamentos

Os tratamentos consistiram no controle (sem inoculação) e no tratamento inoculado com a estirpe BR11145 de *Nitrospirillum amazonense*. O procedimento de inoculação foi realizado nos toletes de aproximadamente 5 cm contendo uma gema viável imersos por 30 min em solução de inoculante diluído em água destilada na proporção 1:100 (p:v). Durante o mesmo período o tratamento controle foi imerso em água destilada. Após a imersão as gemas foram inseridas nos vasos contendo o substrato, tomando-se o cuidado de primeiro transplantar o tratamento controle e em seguida o inoculado a fim de evitar contaminação. Cada vaso (unidade experimental) recebeu duas gemas, uma delas destinada a ser coletada aos 45 dias de experimento e a outra ao final do experimento (Figura 1).

De cada genótipo foram pesadas três gemas individualizadas conforme descrito no item 3.6.2. avaliando massa fresca e seca e análises químicas de macronutrientes e diluição isotópica de ¹⁵N, necessário para os cálculos de balanço.

3.5 Delineamento Experimental

Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso. No primeiro experimento foram avaliados cinco genótipos e no segundo sete. O tratamento aplicado foi com e sem inoculação com seis repetições. Não foi realizada nenhuma correção do solo ou adição de fertilizantes durante o crescimento das plantas.

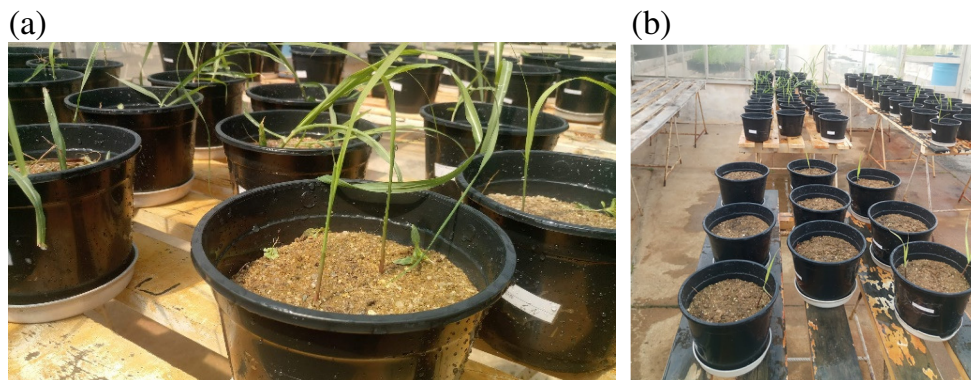


Figura 1. Crescimento das plantas no vaso (a) e diferença de germinação entre os materiais testados (b) aos 30 DAP.

3.6 Variáveis Analisadas

3.6.1 Variáveis não destrutivas

Estas variáveis consistiram em avaliações semanais de altura do colmo, diâmetro e número de folhas verdes e o número de brotações. Para aferir altura do colmo foi utilizado escalímetro e para diâmetro um paquímetro universal, ambos com graduação em centímetros. Foram consideradas folhas verdes aquelas completamente abertas desde a bainha.

3.6.2 Variáveis destrutivas

Aos 45 dias e 109 dias após o plantio (DAP) foram feitas as coletas dos vasos de uma planta inteira e dividida em partes: raiz, parte aérea (para medição das massas) e do colmo usado para o plantio (usado nos estudos de ^{15}N e balanço de N). Em ambas as coletas foram aferidas a área foliar através de scanner óptico.

As plantas foram divididas em parte aérea, raiz e tolete. Destas amostras foram determinadas a massa fresca e seca, análises químicas de teores de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S) (SILVA et al., 2009) e diluição isotópica ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$). A determinação da massa fresca consistiu na pesagem imediata após sua coleta. A massa seca foi obtida após a secagem em estufa de circulação de ar forçada, regulada na temperatura de 65°C , permanecendo até atingir massa constante. Para efetuar análises químicas as amostras secas foram submetidas a moagem em moinho de facas tipo Willye, moinho analítico de bancada e moinho de rolos. Nas amostras pulverizadas, foram realizadas as determinações de N total (NOGUEIRA e SOUZA, 2005).

As análises de abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) foram realizadas em espectrômetro de massas (Finnigan MAT, Bremen, Germany) no Laboratório de Isótopos Estáveis John M Day na Embrapa Agrobiologia usando a metodologia descrita por Ramos et al., (2001). Os cálculos da contribuição percentual da FBN foram realizados seguindo-se a fórmula (Equação 1):

$$\% \text{Ndfa} = \frac{\delta^{15}\text{N planta testemunha} - \delta^{15}\text{N planta teste} \times 100}{\delta^{15}\text{N planta testemunha} - B} \quad (1)$$

Onde:

%Ndfa = Contribuição da FBN para a nutrição nitrogenada da planta teste (neste caso a cana de açúcar);

$\delta^{15}\text{N}$ da planta testemunha = neste caso será a planta controle não inoculada;

B - valor da discriminação isotópica de ^{15}N pelas plantas durante o processo de FBN (neste estudo, foi considerado igual a zero (0) (BODDEY et al., 2001).

O valor de $\delta^{15}\text{N}$ do N disponível do solo foi obtido através da moagem do solo usado nos vasos antes do plantio. Para determinar o N disponível foi usado painso, plantado em copos com 100 g do mesmo solo. As plantas após extrair todo o N disponível também foram moídas e analisadas quanto ao N obtido através de plantas que não recebem significativa contribuição da FBN.

Os cálculos da contribuição da FBN para as plantas de cana-de-açúcar foram realizados somente quando o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ observado na planta de cana-de-açúcar inoculadas foram significativamente menores que os observados nas plantas controle, através da aplicação do teste “t-student” para dados não pareados, como proposto por Shearer e Khol (1986) e Boddey et al. (2001).

3.7 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística para verificar a normalidade e homogeneidade das variâncias pelos testes de Lilliefors e Cochran e Bartlett, respectivamente. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, por meio do teste de F ao nível de 95% de confiança. O contraste foi realizado somente para o tratamento inoculação, e não para comparar genótipos entre si por se tratar de espécies e gêneros diferentes e o objetivo foi a resposta a aplicação do inoculante. Para execução da análise estatística foram utilizados os softwares estatísticos SISVAR® e R-Stúdio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 12 genótipos avaliados aos 109 dias após o plantio, o número de folhas verdes foi mais sensível para distinguir as plantas inoculadas, destacando-se os genótipos IJ76-364, Hinahina e US76-414. Neste período as plantas produziram em medias cinco folhas verdes, sem grande variabilidade entre os materiais testados.

Para a altura das plantas o crescimento foi diferente, saindo de 7,50 cm até 67,07 cm no *S. robustum* US72-1319. A inoculação foi responsável pelo maior crescimento das três variáveis no *S. arundinaceus* IJ76-384, em duas variáveis no US72-1319 sendo a altura a variável mais sensível e desta forma a que mais representou a resposta a aplicação da bactéria (Tabela 2). Detalhe do crescimento das plantas e a diferença entre os genótipos (Figura 2), com destaque para a US72-1319 (Figura 1b).

Tabela 2. Biometria de 12 genótipos de cana de açúcar pertencente ao Complexo *Saccharum* inoculadas com a estirpe BR1145 aos 109 dias após o plantio.

Espécie	Genótipo	Inoculação	Número de Folhas unidade	Altura cm	Diâmetro cm
<i>Miscanthus sp</i>	Figi 10	Controle	5,80	8,30	6,90
		Inoculado	5,60	8,30	6,00
<i>S. arundinaceus</i>	IJ76-364	Controle	5,18	8,13	4,31
		Inoculado	5,75*	9,30*	5,00*
<i>S. officinarum</i>	IJ76 470	Controle	4,67	9,58	7,00
		Inoculado	5,00	8,50	6,90
	SP791011	Controle	5,00	7,50	6,43
		Inoculado	5,29	7,79	6,36
	Hinahina	Controle	5,00	13,25*	5,00
		Inoculado	6,00*	10,38	5,29
<i>S. robustum</i>	US76-414	Controle	4,50	10,50	6,33
		Inoculado	5,00*	10,50	6,67
<i>S. spontaneum</i>	US76-1319	Controle	5,20	33,83	5,00
		Inoculado	5,00	67,07*	6,60*
	Arundinoid B	Controle	5,33	11,61	7,28
		Inoculado	5,44	13,11*	7,44
	CPDau 849678	Controle	4,33	12,61	6,50
		Inoculado	4,11	14,13	6,67
	NG77-042	Controle	5,63	11,81	5,00
		Inoculado	5,13	13,83*	5,00
	NG77-122	Controle	5,00	8,13	5,44
		Inoculado	5,00	13,40*	5,28
<i>Sacharum sp.</i>	Q 45416	Controle	4,25	9,25	4,81
		Inoculado	4,13	9,25	4,56

Valores médios de seis repetições. * F teste ($p < 0,05$).

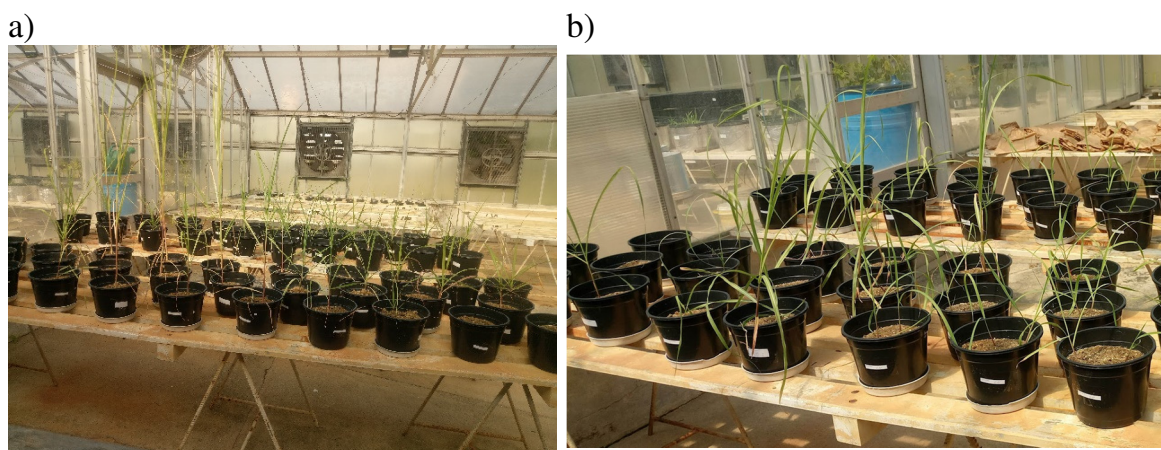


Figura 1. Crescimento de diferentes genótipos de cana de açúcar pertencentes ao complexo *Saccharum* 80 dias após o plantio. (a) Vista lateral, (b) destaque do maior crescimento de *S. spontaneum* US72-1319.

A área foliar das plantas coletadas ao final dos 109 dias de crescimento também não diferiu na maioria dos genótipos testados com exceção de IJ76-364 e US72-1319.

Nas variáveis de biometria e área foliar nenhum material testado apresentou redução de crescimento, mostrando que o crescimento inicial da parte aérea, que normalmente acontece depois do crescimento radicular, se apresenta muito lento não permitindo uma boa avaliação do tratamento de inoculação.

Nesta avaliação inicial de estande de plantas e de arranquio vemos que alguns materiais de *S. spontaneum* se sobressaem como o Arundinoid B, CPDau 849678 e NG77-122. Dos primeiros materiais, apenas o *S. officinarum* SP791011 manteve bom crescimento com resposta à inoculação. No primeiro experimento Hinahina produziu seis perfilhos no controle e apenas 2 no inoculado, mostrando ser um material que limitou seu crescimento quando inoculado e um dos poucos a perfilhar. No segundo experimento, com um maior número de materiais de *S. spontaneum*, o perfilhamento dos materiais testados foi superior. Por exemplo CPDau 849678 apresentou cinco perfilhos no controle e três no inoculado e US72-1319 apresentou oito perfilhos no controle e dois no inoculado. O inverso ocorreu com NG77-042 que apresentou um no controle e dois no inoculado. NG77-122 3 no controle e 10 no inoculado.

O valor médio de brotação dos materiais utilizados no experimento 2 estão listados na Tabela 3. IJ76-364 reduziu 60% a média de plantas brotadas no tratamento inoculado em relação ao controle. A inoculação também reduziu em 30% a germinação no genótipo Q45416, refletindo negativamente nas coletas posteriores. Nestes materiais há uma clara evidência do efeito deletério do inoculante, o que pode ser explicado, pelo menos em parte, pela ação hormonal. Podemos especular que nestes materiais mais sensíveis a dose resposta seja diferente da utilizada nos híbridos comerciais. Arundinoid B por outro lado manteve em 100% seu estande de plantas no tratamento inoculado (2 plantas) seguido de CPDau 849678. Esta fase inicial de brotação, em experimentos de curta duração, reflete diretamente no ganho de massa e nutrientes e já são um indício da resposta a aplicação da estirpe inoculante.

Tabela 3. Valores médios de germinação dos materiais utilizados no experimento 2.

Espécie	Genótipo	Inoculação	Média de brotação unidade
<i>Miscanthus sp.</i>	Fiji 10	Controle	ND
		Inoculado	ND
<i>S. arundinaceus</i>	IJ76-364	Controle	0,90
		Inoculado	0,36
<i>S. officinarum</i>	IJ76 -470	Controle	ND
		Inoculado	ND
	SP791011	Controle	ND
		Inoculado	ND
	Hinahina	Controle	1,38
		Inoculado	1,75
<i>S. robustum</i>	US76-414	Controle	ND
		Inoculado	ND
<i>S. spontaneum</i>	US72-1319	Controle	ND
		Inoculado	ND
	Arundinoid B	Controle	1,91
		Inoculado	2,00
	CPDau 849678	Controle	1,00
		Inoculado	1,90
	NG77-042	Controle	1,88
		Inoculado	1,75
	NG77-122	Controle	1,78
		Inoculado	1,27
<i>Sacharum sp.</i>	Q 45416	Controle	1,88
		Inoculado	1,38

ND = Não determinado. Valor = número de plantas germinadas / total de vasos plantados.

A comparação entre massas foi avaliada pela relação raiz/parte aérea (RA/PA) dos 12 genótipos avaliado (Figura 3). Dois genótipos, ambos *S. spontaneum*, aumentaram a relação RA/PA das plantas inoculadas em relação ao controle, CPDAU 849678 e NG77-122. Mesmo materiais de crescimento vigoroso, a relação de massa seca da raiz foi maior nas plantas inoculadas, uma característica que os distinguiu dos outros 11 genótipos testados. De uma forma geral, relações maiores de 0,5 mostram que o genótipo investiu seu crescimento em mais raiz neste período e desta forma explorou mais o substrato, como o Arundinoid B, e o CPDau 849678, ambos *S. spontaneum*. A inoculação alterou esta relação em quatro destes, sendo mais expressiva nos genótipos CPDau 849678 e NG77-122. Houve redução no Hinahina e no US72-1319.

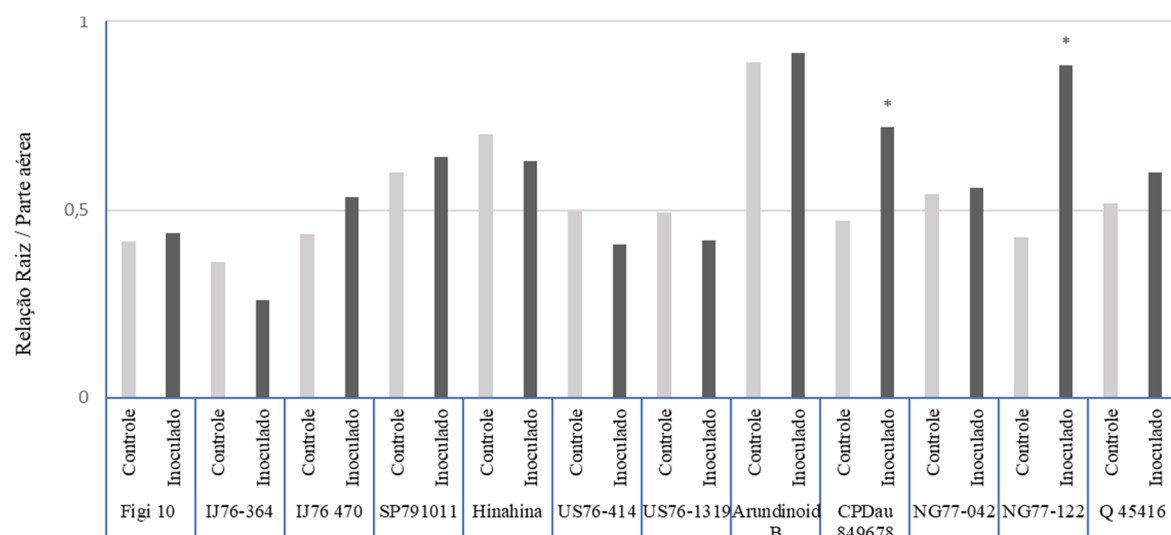


Figura 2. Relação Raiz/Parte aérea de 12 genótipos de cana de açúcar inoculados com *N. amazonense* BR11145 e avaliados aos 109 dias após o plantio (n = 6). * F teste (p < 0,05).

Os dados de massa fresca e seca e de área foliar da coleta final aos 109 DAP estão apresentados na Tabela 4. Em média os tratamentos de inoculação não diferiram na massa seca de raiz e parte aérea, sendo os maiores incrementos observados na massa fresca de raiz de 21 % na massa fresca de raiz das plantas inoculadas e de 155 na massa fresca da parte aérea. Ganhos tímidos quando se compara materiais tão discrepantes no crescimento (Figuras 4 e 5).

Dos doze genótipos avaliados, somente dois responderam a inoculação aumentando a massa fresca de raiz, o US72-1319 e o NG77-122, ambos *S. spontaneum*. Já a massa seca foi maior em quatro genótipos sendo três *S. spontaneum* e um *Miscanthus*, o Fiji 10. Comparativamente a maior resposta radicular em magnitude foi observada no US76-1319, com aumento de 3 vezes nas plantas inoculadas em relação ao controle (Tabela 4). Neste genótipo a inoculação aumentou não só a raiz, mas também a massa fresca e seca da parte aérea e a área foliar, diferindo de todos os outros onze materiais testados.

Por outro lado, o genótipo Q 45416 de *Saccharum* sp. reduziu seu crescimento da parte aérea quando inoculado, sendo o único a apresentar este comportamento. Estudos posteriores podem ajudar a explicar a inibição de crescimento que pode estar vinculada a menor germinação das plantas, da mesma forma que o NG77-122 (Tabela 3). Este último apresentou maior estímulo radicular, mas reduziu a massa seca da parte aérea quando inoculado (Tabela 4).

Entre os 12 materiais avaliados temos a variedade SP791011 que até 10 anos atrás era uma das mais plantadas na região de Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2015). É considerada uma variedade rustica, bem produtiva com maturação média tardia. Se compararmos com os outros materiais não melhorados a SP791011 acumulou quantidades semelhantes de massa seca total que os outros materiais de *S. officinarum* e não respondeu à inoculação aos 109 DAP (Tabela 4).

Nos genótipos de menor crescimento radicular como o NG77-122 a inoculação dobrou a massa fresca e seca das raízes em detrimento da parte aérea (Tabela 4, Figura 3). Já o US76-414 foi um genótipo insensível à inoculação e apresentou uma relação equilibrada de crescimento entre as duas partes.

Os dados de massa fresca e seca e de área foliar da coleta final aos 109 DAP estão apresentados na Tabela 4. Em média os tratamentos de inoculação não diferiram na massa seca de raiz e parte aérea, sendo os maiores incrementos observados na massa fresca de raiz de 21 % na massa fresca de raiz das plantas inoculadas e de 155 na massa fresca da parte aérea. Ganhos tímidos quando se compara materiais tão discrepantes no crescimento (Figuras 4 e 5).

Dos doze genótipos avaliados, somente dois responderam a inoculação aumentando a massa fresca de raiz, o US72-1319 e o NG77-122, ambos *S. spontaneum*. Já a massa seca foi maior em quatro genótipos sendo três *S. spontaneum* e um *Miscanthus*, o Fiji 10. Comparativamente a maior resposta radicular em magnitude foi observada no US76-1319, com aumento de 3 vezes nas plantas inoculadas em relação ao controle (Tabela 4). Neste genótipo a inoculação aumentou não só a raiz, mas também a massa fresca e seca da parte aérea e a área foliar, diferindo de todos os outros onze materiais testados.

Por outro lado, o genótipo Q 45416 de *Saccharum* sp. reduziu seu crescimento da parte aérea quando inoculado, sendo o único a apresentar este comportamento. Estudos posteriores podem ajudar a explicar a inibição de crescimento que pode estar vinculada a menor germinação das plantas, da mesma forma que o NG77-122 (Tabela 3). Este último apresentou maior estímulo radicular, mas reduziu a massa seca da parte aérea quando inoculado (Tabela 4).

Entre os 12 materiais avaliados temos a variedade SP791011 que até 10 anos atrás era uma das mais plantadas na região de Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2015). É considerada uma variedade rustica, bem produtiva com maturação média tardia. Se compararmos com os outros materiais não melhorados a SP791011 acumulou quantidades semelhantes de massa seca total que os outros materiais de *S. officinarum* e não respondeu à inoculação aos 109 DAP (Tabela 4).

Nos genótipos de menor crescimento radicular como o NG77-122 a inoculação dobrou a massa fresca e seca das raízes em detrimento da parte aérea (Tabela 4, Figura 3). Já o US76-414 foi um genótipo insensível à inoculação e apresentou uma relação equilibrada de crescimento entre as duas partes.

Uma grande fonte de variabilidade dos materiais testados foi atribuída a massa inicial usada no plantio. Como se trata de seis espécies diferentes e 12 genótipos, não só o acúmulo final variou, mas também a quantidade de massa seca plantada, que representa uma fonte de nutrientes e outros componentes como açúcares, fibras e microorganismos nativos oriundos da planta de origem.

Dentre as diferentes características morfológicas observadas no crescimento inicial de genótipos de *Erianthus*, *S. spontaneum* e híbridos de *S. officinarum*, Suzuki et al. (2015) observaram que aos seis meses de crescimento *S. spontaneum* apresentou um diâmetro de colmo de 7,3 mm enquanto *S. officinarum* atingiu 23,2 mm. De crescimento mais rápido, *Erianthus* spp. atingiu o diâmetro de colmo de 14,8 mm aos 180 dias de plantio.

Tabela 2. Massa fresca e seca da parte aérea e área foliar de 12 genótipos de cana de açúcar pertencentes ao Complexo Saccharum inoculados ou não com *N. amazonense* BR11145, avaliados aos 109 dias após o plantio.

Espécie	Genótipo	Inoculação	Massa fresca de raiz	Massa seca de raiz	Massa fresca de parte aérea	Massa seca de parte aérea	Massa fresca total	Massa seca total	Área foliar
			g	g	g	g	g	g	cm ²
<i>Miscanthus sp</i>	Figi 10	Controle	5,22	0,93	8,78	2,23	14,00	3,16	94,28
		Inoculado	6,17	1,10*	9,78	2,50	15,95	3,60	87,85
<i>S. arundinaceus</i>	IJ76-364	Controle	3,20	0,70	7,00	1,93	10,20	2,62	64,59
		Inoculado	2,30	0,52	7,62	2,01	9,92	2,52	71,44*
<i>S. officinarum</i>	IJ76 470	Controle	2,18	0,98	6,97	2,24	9,14	3,22	66,94
		Inoculado	2,57	1,02	6,84	1,91	9,41	2,92	89,59
	SP791011	Controle	5,49	1,19	8,28	1,98	13,77	3,18	83,58
		Inoculado	6,51	1,32	8,95	2,06	15,46	3,38	89,37
	Hinahina	Controle	6,31	1,41	8,35*	2,01	14,67	3,43	95,10
		Inoculado	4,84	1,30	8,90	2,06	11,74	3,36	107,28
<i>S. robustum</i>	US76-414	Controle	5,26	1,30	9,77	2,62	15,02	3,92	107,58
		Inoculado	4,85	1,19	10,23	2,92	15,08	4,11	110,63
<i>S. spontaneum</i>	US76-1319	Controle	7,37	1,42	9,72	2,87	17,09	4,29	63,89
		Inoculado	18,54*	4,26*	25,99*	10,15*	44,52*	14,41*	124,22*
	Arundinoid B	Controle	12,68	3,10	12,60	3,47	25,28	6,58	118,84
		Inoculado	14,16	3,25	13,31	3,54	27,47	6,79	128,53
	CPDau 849678	Controle	9,23	1,85	12,28	3,93	21,51	5,78	131,39
		Inoculado	11,81	2,25*	10,65	3,13	22,46	5,38	122,07
	NG77-042	Controle	5,09	1,31	8,24	2,41	13,33	3,72	97,98
		Inoculado	4,12	1,30	7,94	2,32	12,06	3,62	97,62
	NG77-122	Controle	3,68	0,97	8,27	2,26*	11,95	3,23	102,19
		Inoculado	4,71*	1,46*	7,46	1,65	12,18	3,10	85,66
<i>Sacharum sp.</i>	Q 45416	Controle	4,99	1,00	6,49*	1,93*	11,48	2,94	103,04
		Inoculado	5,13	1,00	5,81	1,67	10,94	2,67	84,88

Valores médios de seis repetições. * F teste (p < 0,05).

De uma forma geral, híbridos comerciais de cana de açúcar respondem positivamente a aplicação de bactérias diazotróficas. Chaves et al., (2015) avaliaram o desenvolvimento inicial de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e concluíram que *N. amazonense* BR11145 aumentou índice de velocidade de germinação e número de brotação nas duas variedades. Estes autores concluíram também que a diferença entre genótipos influenciava a resposta da cana à inoculação.

No ranking dos 12 genótipos inoculados e 12 não inoculados podemos observar claramente a ordem de magnitude de massa seca da parte aérea do *S. spontaneum* US76-1319 inoculado em comparação com todos os outros tratamentos (Figura 4). Este ganho de massa advindo da diferença única da aplicação da bactéria no plantio não é uma característica comum no universo de plantas avaliada, visto que mesmo outros *S. spontaneum* estudados não se comportaram desta forma. Este ganho de massa refletiu em todos os outros parâmetros, sejam eles biométricos ou nutricionais. Os outros materiais inoculados foram distribuídos ao longo do eixo de análise, não formando grupamentos de resposta à inoculação.

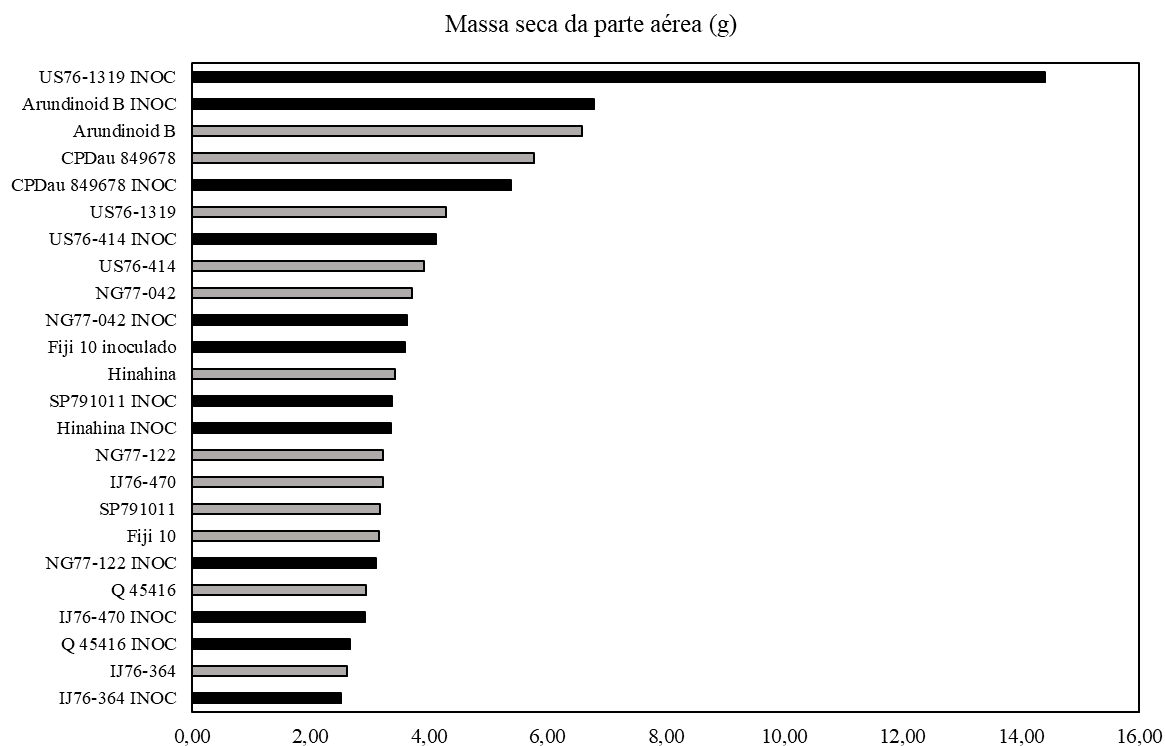


Figura 3. Ranking de ganho de massa seca da parte aérea (g) de 12 genótipos de cana inoculados ou não com Na-BR 11145, aos 109 dias após o plantio (n = 6).

Quanto ao ganho de massa radicular os padrões mudaram e um grupamento de plantas não inoculadas foi formado com valores superiores a 1 e 1,5 g, onde as plantas não inoculadas formaram um grupamento (Figura 5). Nas raízes o genótipo US76-414 inoculado apresentou o maior valor, sendo 1,31 vezes maior que seu controle não inoculado e 1,38 vezes superior ao US76-1319, veio em seguida. Neste último genótipo, o maior estímulo foi observado na parte aérea (Figura 4).

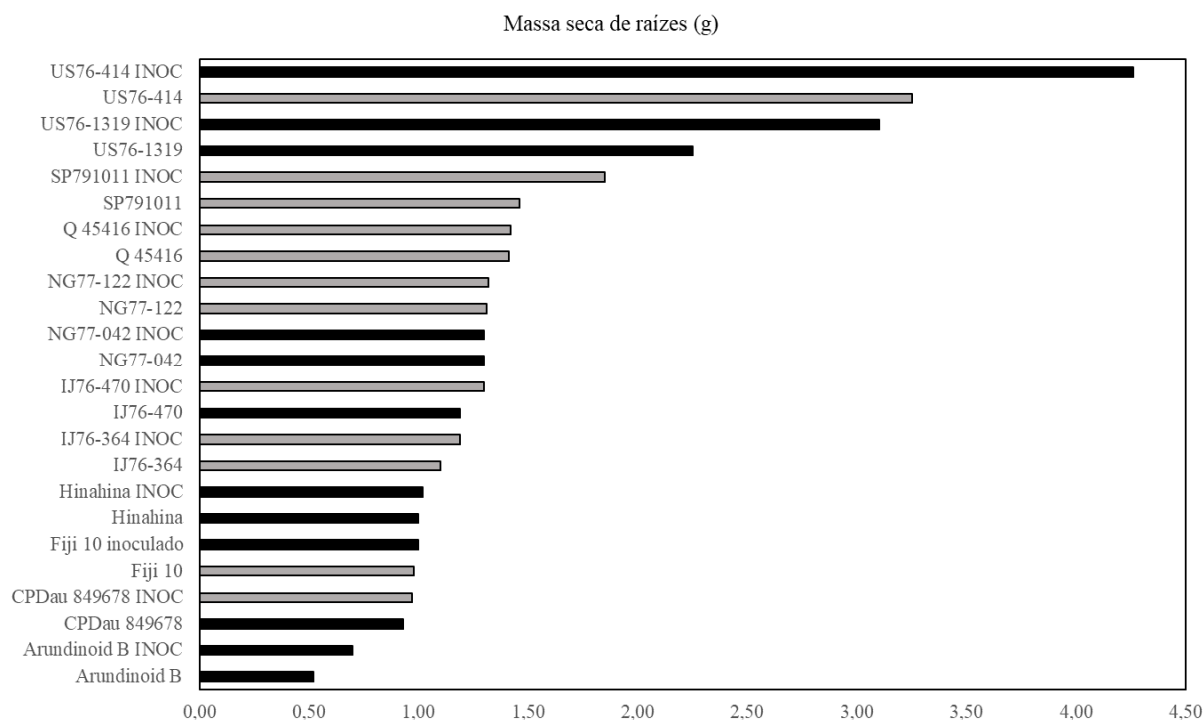


Figura 4. Ranking de ganho de massa seca de raiz (g) de 12 genótipos de cana inoculados ou não com Na-BR11145, 109 dias após o plantio (n = 6).

Quanto aos teores de macro elementos dos 12 genótipos os dados estão apresentados por cada elemento. Os teores de N foram descritos para todas as partes de planta crescida por 109 dias, incluindo os teores no mini-tolete remanescente que foi separado da raiz (Tabela 5). Esta forma de avaliação é diferente de se apresentar os dados apenas na raiz e na parte aérea das plantas, partes novas formadas a partir do N disponível no solo e do N presente na gema usada para a brotação em cada vaso.

Os dados descritos mostram que alguns materiais remobilizam grande parte da reserva oriunda do explante usado no plantio, como o caso da IJ76-364, que remanejou 59% do percentual de N disponível no início. Em sua grande maioria os teores não mudaram, mostrando que a planta explorou o solo e/ou outras fontes de N, como a FBN. Este mesmo genótipo de *S. arundinaceus*, o IJ76-364, respondeu à inoculação aumentando em 21% o teor de N na parte aérea das plantas inoculadas (Tabela 5). Da mesma forma o *S. robustum* Arundinoid B, em 25% e o *S. spontaneum* CPDau 849678, 67% mais N na parte aérea e 22 % nas raízes das plantas inoculadas em relação ao controle. O genótipo *Saccharum* sp. Q 45416, também aumento o teor de N radicular de 17% em relação ao controle. O genótipo Fiji 10 foi o único a aumentar o teor de N na parte aérea das plantas não inoculadas usadas como controle.

Tabela 3. Teor de N na raiz, parte aérea e nos toletes usados para o plantio de 12 genótipos de cana de açúcar pertencentes ao Complexo *Saccharum* inoculados ou não com N. amazonense BR11145, e avaliados aos 109 dias após o plantio.

Espécie	Genótipo	Inoculação	Tolete inicial	Tolete final	Raíz	Parte aérea	
			%				
<i>Miscanthus</i> sp	Figi 10	Controle	0,38	0,37	0,38	0,59*	
		Inoculado	0,38	0,32	0,43	0,49	
<i>S. arundinaceus</i>	IJ76-364	Controle	0,22	0,13	0,47	0,51	
		Inoculado	0,22	0,14	0,53	0,62*	
	IJ76 470	Controle	0,36	0,38	0,41	0,63	
		Inoculado	0,36	0,40	0,45	0,62	
<i>S. officinarum</i>	SP791011	Controle	0,29	0,36	0,47	0,57	
		Inoculado	0,29	0,39	0,44	0,56	
	Hinahina	Controle	0,17	0,14	0,39	0,66	
		Inoculado	0,17	0,17	0,37	0,80	
<i>S. robustum</i>	US76-414	Controle	0,34	0,29	0,46	0,59	
		Inoculado	0,34	0,29	0,41	0,56	
	US76-1319	Controle	0,41	0,31	0,44	0,52	
		Inoculado	0,41	0,31	0,36	0,52	
	Arundinoid B	Controle	0,33	0,28	0,31	0,49	
		Inoculado	0,33	0,28	0,31	0,44	
<i>S. spontaneum</i>	CPDau 849678	Controle	0,17	0,16	0,35	0,55*	
		Inoculado	0,17	0,15	0,31	0,46	
	NG77-042	Controle	0,17	0,13	0,38*	0,77*	
		Inoculado	0,17	0,18	0,30	0,64	
	NG77-122	Controle	0,16	0,14	0,37	0,51	
		Inoculado	0,16	0,16	0,34	0,61	
	<i>Sacharum</i> sp.	Q 45416	Controle	4,14	0,11	0,45	0,77
			Inoculado	4,14	0,15	0,45	0,72
Média		Controle	0,26	0,23	0,41	0,60	
		Inoculado	0,26	0,25	0,39	0,59	

Valores médios de seis repetições. * F teste ($p < 0,05$).

Em geral as plantas que cresceram em substrato não adubado, usando solo diluído em areia com apenas $0,2 \text{ g kg}^{-1}$ de N total, ficaram com teores muito baixos. Plantas saudáveis de cana, crescidas em solo com 10 vezes mais matéria orgânica (20 g dm^{-3}) por exemplo, apresentam valores de 19 a 20 g kg^{-1} de N na folha índice (folha +1) (FARONI et al., 2009), mostrando que as plantas foram nutricionalmente limitadas no crescimento nas condições deste ensaio.

Em variedades comerciais de cana de açúcar, a média de teores foliares de N de 17 a 18 g kg^{-1} na cana-planta fica abaixo da recomendação de Malavolta et al. (1997) que recomendaram valores de 20 a 22 g kg^{-1} para produtividades médias a altas. Espironelo et al. (1986) e Reis Júnior & Monnerat (2002) obtiveram valores de 12,4 a 15,9 e 13 a 15 g kg^{-1} , respectivamente, sendo estes teores classificados como adequado ao bom crescimento. Os teores de N encontrados nestes genótipos selvagens está no limite ou abaixo dos esperados para cana comercial.

Os teores de K variaram de 3,6 a $3,0 \text{ g kg}^{-1}$ entre o início e o término do ensaio em média nos toletes usados para o plantio.

Tabela 4. Teor de potássio na raiz, parte aérea e nos toletes usados para o plantio de 12 genótipos de cana de açúcar pertencentes ao Complexo Saccharum inoculados ou não com *N. amazonense* BR11145, e avaliados aos 109 dias após o plantio.

Espécie	Genótipo	Inoculação	Tolete inicial	Tolete final	Raíz	Parte aérea
			%			
<i>Miscanthus</i> sp	Figi 10	Controle	0,27	0,25	0,77	1,20
		Inoculado	0,27	0,23	0,84	1,33*
<i>S. arundinaceus</i>	IJ76-364	Controle	0,20	0,31	0,86	1,41
		Inoculado	0,20	0,36	0,80	1,44
	IJ76 470	Controle	0,17	0,29	0,86	1,09
		Inoculado	0,17	0,35	0,82	1,18
<i>S. officinarum</i>	SP791011	Controle	0,11	0,19	0,63	1,21
		Inoculado	0,11	0,19	0,58	1,32
	Hinahina	Controle	0,28	0,37*	0,66	1,88*
		Inoculado	0,28	0,25	0,59	1,20
<i>S. robustum</i>	US76-414	Controle	0,18	0,40	0,52	1,27
		Inoculado	0,18	0,34	0,53	1,33
	US76-1319	Controle	0,34	0,28	0,55	1,47
		Inoculado	0,34	0,33	0,26	0,87
	Arundinoid B	Controle	1,30	0,40	0,52	1,28
		Inoculado	1,30	0,40	0,53	1,41
<i>S. spontaneum</i>	CPDau 849678	Controle	0,26	0,24	0,38	1,14
		Inoculado	0,26	0,26	0,38	1,23
	NG77-042	Controle	0,70	0,24	0,48	1,23*
		Inoculado	0,70	0,34	0,50	1,35
	NG77-122	Controle	0,35	0,24	0,52	1,18
		Inoculado	0,35	0,50	0,65*	1,76*
<i>Sacharum</i> sp.	Q 45416	Controle	0,13	0,14	0,51	1,32
		Inoculado	0,13	0,23	0,67*	1,54
Média		Controle	0,36	0,28	0,61	1,31
		Inoculado	0,36	0,32	0,60	1,33

Valores médios de seis repetições. * F teste ($p < 0,05$).

Desta forma o crescimento foi favorecido pelos teores de K no solo, que forneceram 13,7 g de K por vaso para o crescimento. O valor encontrado de K neste trabalho é adequado para Moura Filho et al. (2010). O potássio desempenha diversas funções na cana-de-açúcar, como a translocação de solutos, síntese de proteínas e fotossíntese, afetando todas as células da planta (ROSETTO, 2008).

Normalmente plantas crescidas em solo adubado com K apresentam teores na folha +1 de 13 g kg⁻¹, considerando uma planta bem nutrida. Podemos dizer que K não foi limitante ao desenvolvimento inicial dos 12 genótipos, ficando na média de solos com teores médios de matéria orgânica e adubados com doses crescentes de N fertilizante (Faroni et al., 2009). Nestes ensaios de curta duração o experimento apresentou limitação de N, que pode ter influenciado o ganho de massa das plantas e, portanto, apresentando teores mais altos. Para se ter uma melhor ideia do crescimento normal uma testemunha nitrogenada teria que estar acompanhando o experimento para cada material testado.

Os 12 genótipos avaliados apresentaram variabilidade inicial nos teores de K nos mini-toletes usados no plantio, por exemplo SP791011 iniciou com 1,1 g kg⁻¹ e terminou com 1,9 g kg⁻¹. Estes valores, embora corretos quanto a avaliação de K nos tecidos, sofreu com a utilização do tolete de outra planta ou parte que não a mesma usada no ensaio. Tirando este erro, que só foi observado ao final do experimento, pouco K foi remobilizado do explante inicial para o crescimento. Isto seria esperado pois o K está associado a valores mais altos nas folhas e menor nos colmos e estes materiais fibrosos de uma forma geral mantem os elementos nos tecidos que

estão foram sofrendo lenta decomposição ao longo dos 109 dias Tabela 6). A concentração de K na parte aérea destas plantas jovens foi 2 vezes maior na parte aérea que nas raízes, e em alguns materiais superior a isso como o NG77-122, que apresentou teor de K 2,7 vezes maior nas folhas que nas raízes das plantas inoculadas, uma diferença significativa advinda da aplicação de Na-BR11145 comparado com aumento de 1,8 nas plantas controle. Hinahina também aumentou o K na parte aérea das plantas inoculadas em 2,8 vezes maior que nas raízes, e diferente do controle que alocou 2,1 vezes mais na parte aérea. Apenas um genótipo diferiu no K radicular, o Q45416.

Diferente do K, P foi mobilizado para o crescimento das plantas oriundo do P nos minitoletes (Tabela 7). As plantas remobilizaram 61% do teor de P no período, atingindo valores de 1,85 g kg⁻¹ após 109 dias de crescimento em média na parte aérea e três vezes menos nas raízes. A inoculação aumentou o teor em apenas um genótipo, o *S. officinarum* IJ76-470 em 50% (Tabela 7). Entretanto este genótipo quando inoculado reduziu a massa seca da parte aérea, o que explica o maior teor de p nos tecidos, embora a redução de massa não tenha sido significativa (Tabela 4).

Tabela 5. Teor de fósforo na raíz, parte aérea e nos toletes usados para o plantio de 12 genótipos de cana de açúcar pertencentes ao Complexo Saccharum inoculados ou não com *N. amazonense* BR11145, e avaliados aos 109 dias após o plantio.

Espécie	Genótipo	Inoculação	Tolete inicial	Tolete final	Raíz	Parte aérea
			%			
<i>Miscanthus sp</i>	Figi 10	Controle	1,3	0,4	0,6	1,7
		Inoculado	1,3	0,4	0,6	1,7
<i>S. arundinaceus</i>	IJ76-364	Controle	0,5	0,2	1,1	1,3
		Inoculado	0,5	0,3	1,1	1,6
<i>S. officinarum</i>	IJ76 470	Controle	1	0,5	0,7	1,8
		Inoculado	1	0,5	0,7	2,7*
	SP791011	Controle	0,8	0,3	0,6	2,4
		Inoculado	0,8	0,4	0,6	2,4
	Hinahina	Controle	0,9	0,4	0,6	1,8
		Inoculado	0,9	0,3	0,6	2,2
<i>S. robustum</i>	US76-414	Controle	0,6	0,4	0,5	2,1
		Inoculado	0,6	0,5	0,5	2,3
<i>S. spontaneum</i>	US76-1319	Controle	0,5	0,3	0,6	1,5
		Inoculado	0,5	0,3	0,5	0,7
	Arundinoid B	Controle	1,2	0,5	0,5	1,4
		Inoculado	1,2	0,4	0,4	1,7
	CPDau 849678	Controle	0,7	0,2	0,5	1,5
		Inoculado	0,7	0,3	0,6	1,5
	NG77-042	Controle	1,8	0,5	0,5	1,9
		Inoculado	1,8	0,5	0,5	1,7
	NG77-122	Controle	0,9	0,2	0,5	2,1
		Inoculado	0,9	0,5	0,5	1,8
<i>Sacharum sp.</i>	Q 45416	Controle	0,4	0,1	0,6	2,2
		Inoculado	0,4	0,3	0,6	2,3
Média		Controle	0,9	0,3	0,61	1,8
		Inoculado	0,9	0,4	0,6	1,9

Valores médios de seis repetições. * F teste (p < 0,05).

Não se esperava que a aplicação de Na=BR11145 tivesse algum efeito solubilizador de P, mas como promotor de enraizamento. Mas nas condições deste ensaio, em vaso e sem nenhuma adubação adicional, um ganho advindo da maior exploração radicular não seria observado. Os menores teores de P foram observados no US72-1319 (Tabela 7) e em

contrapartida foi o de maior massa (Tabela 4), mostrando a eficiência de uso de nutrientes neste material rústico. Faroni et al., (2009) observaram teores de P na folha índice de 1,7 a 2,0 g kg⁻¹ em ensaios de campo plantados em três locais diferentes. No ensaio as plantas apresentaram teores inferiores a este valor em 8 das 24 médias de p na parte aérea, mostrando que as plantas acumularam P em quantidades satisfatórias para o período inicial onde o crescimento é lento nestes materiais rústicos.

Teores esperados de cálcio nos tecidos aéreas de cana ficam em torno de 2,8 a 3,0 g kg⁻¹ em plantas adultas e plantadas em solo adubado com N (FARONI et al., 2009). O teor de Ca variou mais que os de outros macros elementos avaliados, da mesma forma que os dados deste estudo, que iniciaram com valores de 0,9 chegando a 3,1 g kg⁻¹ nos mini-toletes e de 0,9 a 2,2 g kg⁻¹ após 109 dias (Tabela 8). Apenas 0,3 g kg⁻¹ foram utilizadas no crescimento no período, visto ser cálcio um componente estrutural sua remobilização é pequena nas plantas em geral.

Tabela 6. Teor de cálcio na raiz, parte aérea e nos toletes usados para o plantio de 12 genótipos de cana de açúcar pertencentes ao Complexo Saccharum inoculados ou não com N. amazonense BR1145, e avaliados aos 109 dias após o plantio.

Espécie	Genótipo	Inoculação	Tolete inicial	Tolete final	Raíz	Parte aérea
			%			
<i>Miscanthus</i> sp	Figi 10	Controle	3,1	2,7	1,5	2,1
		Inoculado	3,1	2,2	1,3	2,0
<i>S. arundinaceus</i>	IJ76-364	Controle	1,6	0,9	1,4	2,0
		Inoculado	1,6	1,1	2,4	1,6
<i>S. officinarum</i>	IJ76 470	Controle	1,7	1,8	1,7	2,3
		Inoculado	1,7	2,2	1,7	2,5
	SP791011	Controle	2,0	1,4	1,5*	3,3
		Inoculado	2,0	1,7*	1,3	3,2
	Hinahina	Controle	1,5	1,0	1,2	1,7
		Inoculado	1,5	1,3	1,3	2,3
<i>S. robustum</i>	US76-414	Controle	1,8	1,5	1,2*	2,8
		Inoculado	1,8	1,4	1,0	2,9
<i>S. spontaneum</i>	US76-1319	Controle	2,8	2,0	1,7	1,9
		Inoculado	2,8	1,3	1,4	1,6
	Arundinoid B	Controle	1,1	0,9	1,1	3,0
		Inoculado	1,1	0,8	1,1	2,5
	CPDau 849678	Controle	0,9	1,1	1,4	3,5*
		Inoculado	0,9	1,1	1,6	2,5
	NG77-042	Controle	1,0	0,8	1,2	2,8
		Inoculado	1,0	1,1	1,2	2,2
	NG77-122	Controle	1,2	1,4	1,1	2,2
		Inoculado	1,2	1,0	1,0	2,6
<i>Sacharum</i> sp.	Q 45416	Controle	2,0	0,9	1,4	3,3
		Inoculado	2,0	1,0	1,3	2,5
Média		Controle	1,7	1,4	1,4	2,6
		Inoculado	1,7	1,4	1,4	2,4

Valores médios de seis repetições. * F teste (p < 0,05).

Das 3,9 g kg⁻¹ usadas no crescimento na média dos 12 genótipos, 39% foram alocados nas raízes. Os teores de Ca nas plantas de cana, após 109 dias, foram superior ao de P, especialmente nas raízes (Tabela 8). Não houve nenhum efeito inoculante observado, pelo contrário, o Ca foi menor em três genótipos inoculados comparado ao controle, o que pode significar maior ganho de massa, diluindo o teor deste elemento como no US76-414 que apresentou 1,30 mg planta⁻¹ de massa seca de raiz no controle e 1,19 mg planta⁻¹ na média das plantas inoculadas, mas sem diferença estatística.

Em relação ao cálcio, o magnésio (Mg) é acumulado nos tecidos em menor quantidade, variando de 1,3 a 1,5 g kg⁻¹ na folha + 1 de plantas adultas e sem restrição de N (FARONI et al., 2009). Neste estudo as plantas acumularam valores superiores, mostrando que este elemento não foi restritivo ao crescimento (Tabela 9). As plantas utilizaram apenas 25% do Mg no crescimento, o que seria esperado pela fase que foram avaliadas. Das 3,5 g kg⁻¹ acumuladas após 109 dias, 37% foram alocadas nas raízes e o restante na parte aérea. Um genótipo acumulou mais nas plantas inoculadas, o Hinahina e o inverso no NG77-122 (Tabela 9).

O acúmulo de macro elementos nas raízes das plantas ao final dos 109 DAP manteve a ordem de grandeza esperada para cana de açúcar, isto é: K >> N > Ca = Mg > P (Tabela 10). O genótipo de *S. spontaneum* US72-1319 foi o que acumulou todos os nutrientes em maiores quantidades, especialmente na planta inoculada, diferindo do controle. Os outros 11 materiais não responderam à inoculação. Como as plantas foram limitadas pela baixa disponibilidade de N no solo, e sendo este um macro elemento requerido em quantidades elevadas, a resposta à inoculação também foi limitada. A única exceção foi este genótipo, que tudo indica obteve N via FBN para suplantar a limitação do solo.

Muito pouco se conhece sobre a inoculação destes materiais rusticos ou mesmo de cruzamentos utilizando genótipos do Complexo *Saccharum*. Por exemplo, o cruzamento de *Miscanthus x giganteus*, que é uma gramínea C4, rizomatosa e originária da China apresenta excelente crescimento em solos pobres em nutrientes podendo chegar a produzir de 15 a 25 Mg de massa seca ha⁻¹ ano⁻¹ em regiões temperadas (IQBAL et al., 2015). Estes materiais rusticos sobrevivem mais de 20 anos no mesmo local sem nenhuma adição de nutrientes (CADOUX et al., 2012). Liu & Ludewig (2020) estudaram a inoculação de *Herbaspirillum frisinguense* visando estimular o crescimento de gemas para a propagação de *Miscanthus x giganteus*, e observaram que o efeito enraizador foi prolongado permitindo o crescimento das gemas além de 100% de germinação dos brotos. Outro trabalho apresenta os dados de resposta positiva à inoculação de *Miscanthus floridulus* utilizando *Bacillus cereus* para utilização em solos contaminados com cádmio (WANG et al., 2023). Estes usos destas gramíneas rusticas tem ampla utilização em solos contaminados.

Dos 12 genótipos plantados em solo onde nenhuma adição de nutrientes suplementar foi realizada, apenas quatro responderam à inoculação com Ab-BR11145 (Tabela 10). IJ76 470 aumentou o acúmulo de P, no Hinahina houve maior acúmulo de Mg, e no NG77-122 ocorreu o maior acúmulo de K nas plantas inoculadas em relação ao controle e apenas um genótipo a resposta foi observada para todos os macronutrientes devido ao seu maior acúmulo de massa (Tabela 4), o US72-1319 (Tabela 10). Dois genótipos de *S. spontaneum* aumentaram o acúmulo de N nas plantas do controle, CP Dau 849678 e NG77-042 (Tabela 10).

Tabela 7. Teor de magnésio (Mg) na raiz, parte aérea e nos toletes usados para o plantio de 12 genótipos de cana de açúcar pertencentes ao Complexo Saccharum inoculados ou não com *N. amazonense* BR11145, e avaliados aos 109 dias após o plantio.

Espécie	Genótipo	Inoculação	Tolete inicial	Tolete final	Raíz	Parte aérea
			%			
<i>Miscanthus</i> sp	Figi 10	Controle	3,4	2,2	1,7	1,9
		Inoculado	3,4	1,6	1,6	1,7
<i>S. arundinaceus</i>	IJ76-364	Controle	0,7	0,6	1,2	1,8
		Inoculado	0,7	0,5	1,2	1,9
<i>S. officinarum</i>	IJ76 470	Controle	0,8	1,3	1,7	2,7
		Inoculado	0,8	1,3	1,5	2,9
	SP791011	Controle	1,1	0,9	1,4	3,2
		Inoculado	1,1	1,0*	1,2	3,3
	Hinahina	Controle	1,0	0,6	1,3	1,9
		Inoculado	1,0	1,1	1,1	2,7*
<i>S. robustum</i>	US76-414	Controle	1,4	1,1	1,5	2,6
		Inoculado	1,4	0,9	1,1	2,9
<i>S. spontaneum</i>	US76-1319	Controle	1,6	1,1	1,3	1,8
		Inoculado	1,6	0,6	1,2	1,9
	Arundinoid B	Controle	1,3	0,6	0,8	1,9
		Inoculado	1,3	0,5	0,7	2,0
	CPDau 849678	Controle	0,5	0,7	1,1	2,0
		Inoculado	0,5	0,6	1,0	1,9
	NG77-042	Controle	0,7	0,5	0,9	2,0
		Inoculado	0,7	0,7	1,0	2,1
	NG77-122	Controle	0,9	1,1	1,1	2,4*
		Inoculado	0,9	0,7	1,0	1,7
<i>Sacharum</i> sp.	Q 45416	Controle	0,7	0,3	1,1	2,4
		Inoculado	0,7	0,4	0,9	2,4
Média		Controle	1,2	0,9	1,3	2,2
		Inoculado	1,2	0,8	1,1	2,3

Valores médios de seis repetições. * F teste ($p < 0,05$).

O acúmulo de nutrientes parte aérea acompanhou os ganhos em suas diferentes partes da planta analisadas, isto é, o *S. spontaneum* US72-1319 foi o genótipo que mais respondeu à inoculação, destacando-se em todas as avaliações (Tabela 11). Podemos considerá-lo um genótipo de grande interesse no estudo de interação positiva entre a planta e a bactéria testada. CPDau 849678 e NG77-042 responderam acumulando mais N no controle e Hinahian mais K também no controle.

Estes materiais não sofreram melhoramento para acelerar a germinação e o crescimento como observado por Gírio et al. (2015) usando variedades comerciais. Ensaios de maior duração e com suplementação mineral poderiam explorar as diferenças entre os genótipos testados para comparar com dados de literatura.

Tabela 8. Acúmulo de macro nutrientes na planta (raiz e parte aérea) de 12 genótipos de cana de açúcar inoculados ou não com *N. amazonense* BR11145 aos 109 DAP.

Espécie	Genótipo	Inoculação	N	K	P	Ca	Mg
			mg vaso ⁻¹				
<i>Miscanthus</i> sp	Figi 10	Controle	13,46	27,27	4,43	4,65	4,35
		Inoculado	12,24	33,31	4,77	5,00	4,31
<i>S. arundinaceus</i>	IJ76-364	Controle	10,88	30,06	3,73	4,24	3,80
		Inoculado	12,28	28,95	3,72	3,13	3,89
<i>S. officinarum</i>	IJ76 470	Controle	12,64	22,27	4,29	4,72	5,53
		Inoculado	11,36	20,38	5,05*	4,16	4,86
	SP791011	Controle	11,54	23,61	5,29	6,33	6,25
		Inoculado	10,60	24,44	5,34	5,98	6,22
	Hinahina	Controle	13,31	37,87*	4,60	3,53	3,80
		Inoculado	16,68	24,83	5,28	4,84	5,63*
<i>S. robustum</i>	US76-414	Controle	13,66	29,15	5,37	6,28	6,04
		Inoculado	15,82	38,17	7,10	8,30	8,35
<i>S. spontaneum</i>	US76-1319	Controle	14,14	41,85	4,80	5,34	4,69
		Inoculado	44,16*	75,46*	7,87*	14,51*	16,89*
	Arundinoid B	Controle	21,13	55,50	7,86	13,26*	8,34
		Inoculado	16,89	54,14	8,13	9,33	7,38
	CPDau 849678	Controle	21,53*	44,26	6,96	13,67*	8,01
		Inoculado	15,57	41,56	6,50	8,32	6,50
	NG77-042	Controle	17,78*	39,68	5,62	7,16*	5,20
		Inoculado	15,83	32,43	4,71	5,20	5,01
	NG77-122	Controle	11,99	26,11	5,10*	4,76	5,20*
		Inoculado	10,94	34,26*	4,25	5,05	3,26
<i>Sacharum</i> sp.	Q 45416	Controle	8,48	25,15	4,67	6,37	4,71
		Inoculado	11,74	28,58	5,02	4,65	4,36
Média		Controle	14,21	33,57	5,23	6,69	5,49
		Inoculado	16,18	36,38	5,65	6,54	6,41

Valores médios de seis repetições. * F teste ($p < 0,05$).

Nos toletes utilizados no plantio (um gema), a média foi de N total foi de 11,6 mg de N gema⁻¹, variando de 3 a 20,8 mg gema⁻¹. Em se tratando de espécies diferente e sem seleção era de se esperar que a gema tivesse bastante impacto nesta fase inicial de crescimento. Destes 11,6 mg de N, 6,2 mg permaneceram e após 109 dias, isto é, 53% do N foi remobilizado para o crescimento da planta, em média dos 12 materiais testados (Tabela 9). Por exemplo, o Arundinoid B iniciou com 20,8 mg e terminou com 15,1 mg, mobilizando apenas 5,7 mg N planta⁻¹ no crescimento, o restante veio do solo. Figi 10 usou 8,5 mg para produzir raízes e parte aérea e a inoculação aumentou em 8,7% este acúmulo.

Mas outros materiais testados apresentaram grande variabilidade, e na maioria das repetições o N residual foi maior que na amostragem inicial, como no IJ76-364. Estes detalhes do procedimento de análise mostraram que o material vegetal usado para propagação interfere em todas as análises subsequentes, e que atenção especial deve ser dada na amostragem, retirando amostra inicial na mesma planta e na mesma altura do colmo para acompanhar de fato o uso da reserva.

Tabela 9. Acúmulo de macro nutrientes na parte aérea, de 12 genótipos de cana de açúcar inoculados ou não com *N. amazonense* BR11145 aos 109 DAP.

Espécie	Genótipo	Inoculação	N	K	P	Ca	Mg
			mg vaso ⁻¹				
<i>Miscanthus</i> sp	Figi 10	Controle	13,46	34,59	4,43	6,09	6,00
		Inoculado	12,24	42,37	4,77	6,38	6,06
<i>S. arundinaceus</i>	IJ76-364	Controle	10,88	36,82	3,73	5,37	4,77
		Inoculado	12,28	32,92	3,72	4,40	4,50
<i>S. officinarum</i>	IJ76 470	Controle	12,64	30,08	4,29	6,28	7,10
		Inoculado	11,36	27,58	5,05	5,65	6,20
	SP791011	Controle	11,54	30,91	5,29	8,12	7,81
		Inoculado	10,60	32,31	5,34	7,61	7,81
	Hinahina	Controle	13,31	47,78	4,60	5,31	5,64
		Inoculado	16,68	32,05	5,28	6,46	6,99
<i>S. robustum</i>	US76-414	Controle	13,66	34,15	5,37	7,58	7,61
		Inoculado	15,82	44,00	7,10	9,44	9,60
<i>S. spontaneum</i>	US76-1319	Controle	14,14	49,88	4,80	7,66	6,49
		Inoculado	44,16*	84,70*	7,87*	19,12*	21,22*
	Arundinoid B	Controle	21,13	73,11	7,86	16,96	10,90
		Inoculado	16,89	73,26	8,13	13,49	10,19
	CPDau 849678	Controle	21,53*	51,57	6,96	16,43	10,15
		Inoculado	15,57	50,71	6,50	12,21	8,82
	NG77-042	Controle	17,78*	47,37	5,62	9,15	6,73
		Inoculado	15,83	37,78	4,71	6,47	6,04
	NG77-122	Controle	11,99	31,09	5,10	5,86	6,28
		Inoculado	10,94	42,72	4,25	6,34	4,55
<i>Sacharum</i> sp.	Q 45416	Controle	8,48	29,65	4,67	7,60	5,71
		Inoculado	11,74	36,56	5,02	6,22	5,51
Média		Controle	14,21	41,42	5,23	8,53	7,10
		Inoculado	16,18	44,75	5,65	8,65	8,12

Valores médios de seis repetições. * F teste ($p < 0,05$).

Quanto ao efeito inoculante, que seria a promoção de crescimento das plantas advindo da bactéria diazotrófica, apenas Figi 10 (8,7%) Hinahina (19,8 %), SP791011 (19,5%), Arundinoid B (5,3%) e a grande excessão, o US72-1319 com 407,4% de aumento (Tabela 9). O restante dos materiais o efeito foi negativo, de -19% no IJ76-364, até -27% no IJ76-470 e -25,6% no US76-414. Nestes materiais as plantas inoculadas acumularam menos N que o controle. Como são materiais rustico, sem nenhum conhecimento prévio de dose resposta ou mesmo do estabelecimento da estirpe inoculante, podemos dizer que não houve nenhuma contribuição advinda da FBN ou mesmo o efeito promotor foi errático e raro, excetuando-se um único genótipo.

O genótipo de *S. spontaneum* quando inoculado utilizaram mais que a reserva inicial, acessando N de outras fontes. Quais fontes possíveis: N do solo e/ou N da FBN nativa ou adicionada pela bactéria inoculada. Dentro desta espécie houveram diferenças quanto à resposta a inoculação, sendo a US72-1319 a que obteve resposta significativa aumentando N na raiz e na parte aérea quando inoculada.

De uma maneira geral a inoculação avaliada aos 109 DAP, fase inicial de crescimento destas plantas e utilizando um substrato solo:areia (1:2 v/v) sem adição de fertilizantes e corretivos mostrou a rusticidade e diferenciou materiais quanto ao rendimento de massa e acúmulo de macronutrientes tempo pouca resposta à inoculação por estarem limitados pelo estresse nutricional. Na media geral das plantas inoculadas observa-se que a parte aérea começava a apresentar maiores acúmulos, mas a limitação do substrato pode ter nivelado à resposta de crescimento.

Quando ao balanço de n dos vasos cultivados por 109 dias podemos observar que o N total do solo foi de 457,6 mg e que o tolete inicial variou de 4,7 (NG77-122 até 32,82 mg no US76-414, mostrando a grande variabilidade nos teores iniciais. Mesmo com tanta variabilidade a maioria dos genótipos utilizou parte deste N inicial, vindo o restante da reserva do solo (Tabela 12). Ao final de 109 dias, o N que permanece neste reboło, que não foi utilizado no crescimento também foi muito variável. Por exemplo Figi 10 usou 25% do N inicial. Já o genótipo seguinte, IJ76-364 usou 54% da reserva inicial. Houve também muita variabilidade entre os tratamentos de inoculação. O uso do N inicial é uma característica ligada ao genótipo e pouco se conhece sobre a mobilização do n da reserva nestes genótipos rusticos nesta fase inicial de crescimento.

De uma forma geral, partindo de 7 mg foram acumulados 20 mg de N por vaso durante estes intervalo de crescimento e não houve efeito inoculantes em 9 genótipos e apenas tr~es S. spontaneum o efeito inoculante foi significativo e advindo da inoculação da bactéria Na-BR 11145 (Tabela 12). Como observado previamente, o maior efeito inoculante foi observado no genótipo Hinahina, entretanto as diferenças de acúmulo não foram significativas e o balanço se deve pelo valor do N no tolete final e não pelo crescimento da planta. Esta discrepância advem do uso de uma amostra diferente da planta que foi crescida, causando distorções na Tabela 12.

Tabela 12. Balanço de N nos vasos contendo 12 genótipos de cana inoculados ou não com *N. amazonense* aos 109 DAP.

Espécie	Genótipo	Inoculação	Solo	Tolete inicial	Tolete final	N do Tolete mobiliado para a planta (NTM)	Raiz	Parte aérea	N acumulado em folhas e raízes (NAP)	Razão NAP/ NTP	Efeito inoculante
mg / vaso											
<i>Miscanthus</i> sp	Figi 10	Controle	457,56	14,65	4,52*	10,13	3,59	13,46	17,05	1,68	-0,18
		Inoculado	457,56	14,65	3,15	11,50	5,08*	12,24	17,32	1,51	
<i>S. arundinaceus</i>	IJ76-364	Controle	457,56	8,94	5,69	3,25	3,64	10,88	14,52	4,47	-1,50
		Inoculado	457,56	8,94	4,04	4,90	2,24	12,28	14,52	2,96	
<i>S. officinarum</i>	IJ76 470	Controle	457,56	31,14	5,17	25,97	3,87	12,64	16,51	0,64	-0,02
		Inoculado	457,56	31,14	6,25	24,89	3,92	11,36	15,28	0,61	
	SP791011	Controle	457,56	32,27	7,16	25,11	5,46	11,54	17,00	0,68	0,00
		Inoculado	457,56	32,27	8,02	24,25	5,81	10,60	16,41	0,68	
	Hinahina	Controle	457,56	7,24	3,49	3,75	5,59	13,31	18,90	5,04	5,42
		Inoculado	457,56	7,24	5,21	2,03	4,55	16,68	21,23	10,46	
<i>S. robustum</i>	US76-414	Controle	457,56	32,82	8,57	24,25	5,73	13,66	19,39	0,80	0,08
		Inoculado	457,56	32,82	9,51	23,31	4,57	15,82	20,39	0,87	
<i>S. spontaneum</i>	US76-1319	Controle	457,56	26,76	7,04	19,72	6,44	14,14	20,58	1,04	2,97
		Inoculado	457,56	26,76	12,68*	14,08	12,33*	44,16*	56,49	4,01	
	Arundinoid B	Controle	457,56	20,84	16,56	4,28	10,44	21,13	31,57	7,38	0,70
		Inoculado	457,56	20,84	17,36	3,48	11,23	16,89	28,12	8,08	
	CPDau 849678	Controle	457,56	14,01	7,44	6,57	6,73	21,53*	28,26	4,30	1,35
		Inoculado	457,56	14,01	9,98	4,03	7,20	15,57	22,77	5,65	
	NG77-042	Controle	457,56	8,94	4,36	4,58	5,07	17,78*	28,85	4,99	0,25
		Inoculado	457,56	8,94	5,19	3,75	3,83	15,83	19,66	5,24	
	NG77-122#	Controle	457,56	4,70	5,19	ND	3,96	11,99	15,95	ND	ND
		Inoculado	457,56	4,70	2,60	2,10	4,39	10,94	15,33	7,30	
<i>Sacharum</i> sp.	Q 45416	Controle	457,56	9,48	6,63	2,85	3,95	15,14	19,09	6,70	1,32
		Inoculado	457,56	9,48	7,50	1,98	4,39	11,48	15,87	8,02	
Média		Controle		17,65	6,82	11,86	5,37	14,77	20,14	3,43	
		Inoculado		17,65	7,62	10,03	5,80	16,15	21,95	4,62	

e ND – não foi calculado o balanço devido aos dados negativos destes materiais. (Planta inteira = tolete final + raiz + parte aérea) - tolete inicial = N extraído de outra fonte. Valores médios de 6 repetições. * F teste (p < 0,05).

Apenas o *S. spontaneum* US72-1319 apresentou efeito inoculante não só para N mas para todos os elementos de crescimento acumulados em uma massa seca superior. O restante o controle acumulou mias n como CP Dau 849678 e o NG77-042, neste caso não se pode inferir nenhum balanço pois o tolete final obteve maiores valores que o inicial, outro dado que não condiz com o crescimento das plantas e oriunda da forma de amostragem das plantas.

Urquiaga et al. (1992, 2012) utilizaram a metodologia de balanço para avaliar a contribuição da FBN em diferentes materiais sendo varios hibridos comerciais e um Krakatau (*S. spontaneum*) e Chuneo (*S. barberi*). Neste estudo Krakatau foi a que apresentou maior contribuição da FBN em plantas não inoculadas além do maior acúmulo de N total, superior a todos os hibridos testados e ao *S. barberi*. Este estudo vem colaborar com estas avaliações 20 anos depois. Existe contribuição efetiva da FBN que pode ser mensurada desde os primeiros dias de crescimento usando uma metodologia simples de balanço de N em sistema aberto, isto, vasos furados. Outra observação importante é que materiais pertencentes à espécie *S. spontaneum*, são importantes no quesito FBN, fato observado anteriormente por Urquiaga et al., (1992; 2012) mas quando inoculado com uma única estirpe de bactéria diazotrófica, pode modificar esta contribuição natural e resultar em ganhos significativos de biomassa em condições de extrema pobreza de nutrientes disponíveis no solo.

O balanço de K das plantas após o término do ensaio mostra a grande variabilidade oriunda do material originários de onde as gemas foram retiradas (Tabela 13). Embora a plantas utilizadas tenham sido plantadas no mesmo local, extraem K de forma diferente dos cilindros e consequentemente apresentam valores iniciais de 8,27 mg no genótipo IJ76-364 até o maior valor inicial observado no genótipo Arundinoid B, de 82,28 mg. Esta variabilidade do K acumulado nas plantas no início do experimento mostra que o Complexo *Saccharum* tem grande diversidade e, portanto, comparações só podem ser feitas em relação a inoculação.

Em média os toletes iniciais possuíam 21,8 mg de K e terminaram com 9,82 mg no final de 109 dias. Desta fonte inicial foram utilizados 12,5 mg de K no crescimento sendo o restante oriundo do solo (Tabela 1). Este balanço, embora seja possível de ser feito, utilizou gemas diferentes na análise de teores iniciais de nutrientes e não uma fatia da gema usada para o crescimento, trazendo dados negativos como o observado no IJ 76-364. Mesmo usando o maior valor de K observado nas amostras iniciais e não a média, os dados ainda focaram negativados. Das 43,1 mg de K retiradas do sistema solo planta na média dos 12 genótipos, como esperado 81,2% do K foi alocado na parte aérea das plantas (Tabela 13).

Independente desta variabilidade, o efeito inoculante foi observado no NG77-122, US72-1319, e o CPDau 849678, todos *S. spontaneum* e o inverso foi observado em Hinahina e IJ76-364 nas raízes, outros gêneros cuja inoculação reduziu o balanço de K acumulado nas plantas no período (Tabela 10). De todos os genótipos o maior efeito inoculante observado para K ocorreu no genótipo NG77-122, chegando a acumular 16,17 mais K que o tratamento controle. Seis genótipos podem ser considerados insensíveis a aplicação da bactéria. Devido a falta de amostras do Q 45416, o balanço não foi finalizado (Tabela 13).

Vale ressaltar que as plantas não foram adubadas e todo o K acumulado foi retirado do solo ou oriundo do material propagativo. Neste caso não se considera nenhuma outra entrada de K no sistema, diferente do N que pode ter adições advindas da contribuição da FBN. O elevado valor inicial de K no Arundinoid B, muito superior a todos os outros materiais, precisa ser visto com algo inusitado pois alterou o balanço geral deste material, mas não interferiu nos dados de efeito inoculante.

Tabela 10. Balanço de K nos vasos contendo 12 genótipos de cana inoculados ou não com *N. amazonense* aos 109 DAP.

Espécie	Genótipo	Inoculação	Solo	Tolete inicial	Tolete final	K do Tolete mobiliado para a planta (KTM)	Raiz	Parte aérea	K acumulado em folhas e raízes (KAP)	Razão KAP/KTM	Efeito inoculante
mg											
<i>Miscanthus sp</i>	Figi 10	Controle	35,17	10,15	3,07	7,08	7,32	27,27	34,59	4,89	0,56
		Inoculado	35,17	10,15	2,37	7,78	9,06	33,31	42,37	5,45	
<i>S. arundinaceus</i>	IJ76-364#	Controle	27,85	8,27	13,59	ND	6,76*	30,06	36,82		
		Inoculado	27,85	8,27	11,06	ND	3,97	28,95	32,92		
<i>S. officinarum</i>	IJ76 470	Controle	35,17	16,17	3,84	12,33	7,81	22,27	30,08	2,44	0,13
		Inoculado	35,17	16,17	5,44*	10,73	7,20	20,38	27,58	2,57	
	SP791011	Controle	35,17	12,31	3,68	8,63	7,30	23,61	30,91	3,58	0,33
		Inoculado	35,17	12,31	4,05	8,26	7,87	24,44	32,31	3,91	
	Hinahina	Controle	27,85	11,51	9,18	2,33	9,91	37,87*	47,78	20,51	-11,32
		Inoculado	27,85	11,51	8,02	3,49	7,22	24,83	32,05	9,18	
<i>S. robustum</i>	US76-414	Controle	35,17	18,30	11,59	6,71	5,00	29,15	34,15	5,09	0,72
		Inoculado	35,17	18,30	10,72	7,58	5,83	38,17	44,00	5,80	
<i>S. spontaneum</i>	US76-1319	Controle	35,17	24,41	5,96	18,45	8,03	41,85	49,88	2,70	4,67
		Inoculado	35,17	24,41	12,92*	11,49	9,24	75,46*	84,70	7,37	
	Arundinoid B	Controle	27,85	82,28	22,94	59,34	17,61	55,50	73,11	1,23	0,06
		Inoculado	27,85	82,28	25,48	56,80	19,12	54,14	73,26	1,29	
	CPDau 849678#	Controle	27,85	25,48	11,45	14,03	7,31	44,26	51,57	3,68	2,26
		Inoculado	27,85	25,48	16,93*	8,55	9,15*	41,56	50,71	5,93	
	NG77-042	Controle	27,85	31,21	8,51	22,70	7,69	39,68	47,37	2,09	-0,41
		Inoculado	27,85	31,21	8,72	22,49	5,35	32,43	37,78	1,68	
	NG77-122#	Controle	27,85	9,34	8,15	1,19	4,98	26,11	31,09	26,13	16,17
		Inoculado	27,85	9,34	8,33	1,01	8,46*	34,26*	42,72	42,30	
<i>Sacharum sp.</i>	Q 45416#	Controle	27,85	11,99	7,34	4,65	4,50	25,15	29,65	6,38	
		Inoculado	27,85	11,99	12,25	ND	7,98	28,58	36,56		
Média		Controle		21,79	9,11	14,31	7,85	33,57	41,42		
		Inoculado		21,79	10,52	13,82	8,37	36,38	44,75		

Genótipos cujos valores de K foram considerados os maiores e não a media, para fechar o balanço de massa. Este procedimento foi adotado pois as amostras iniciais eram de toletes diferentes daqueles plantados nos vasos. ND – não foi calculado o balanço devido aos dados negativos destes materiais. (Planta inteira = tolete final + raiz + parte aérea) - tolete inicial = N extraído de outra fonte. Valores médios de 6 repetições. * F teste (p < 0,05).

O balanço de P, em menor magnitude pois este elemento é requerido cerca de 10 vezes menos que N e K em cana, reflete os mesmos dados observados anteriormente (Tabela 14). Novamente o genótipo responsivo à inoculação, o US76-1319 seguido do IJ76-470, sendo este segundo um *S. arundinaceus*. A inoculação reduziu o P na parte aérea no genótipo NG77-122 e o IJ76-470. *Saccharum* sp. Q45416, embora não tenha diferido do controle apresentou o segundo maior valor de efeito inoculante (Tabela 14).

Em média os 12 materiais utilizaram 4,3 mg de P no crescimento sendo que o restante o solo supriu a demanda das plantas. Como o K, o P também foi alocado na parte aérea das plantas e a inoculação incrementou em 12 % o acúmulo de P no sistema (Tabela 14). Como *N. amazonense* não é descrita como uma bactéria que tenha ação na solubilização de P, podemos dizer que a inoculação apresentou uma resposta mínima no crescimento visto que as plantas ficaram limitadas pelos outros elementos como N e K (Tabelas 12 e 13).

Interessante notar que alguns genótipos realocaram praticamente todo o P oriundo do tolete original, como o *S. arundinaceus* IJ76-470 e o *S. officinarum* SP791011, o inverso do *S. robustum* Arundinoid B (Tabela 14).

A promoção de crescimento de plantas inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas pode ser atribuído a diferentes fatores. Alguns estudos atribuem os aumentos de produtividade aos efeitos na solubilização de fósforo, zinco, entre outros nutrientes (CRESPO et al. 2011; GLICK et al., 2012; CASSÁN et al. 2014; CHAVES et al. 2015; BERNABEU et al. 2016). O mais facilmente identificado, especialmente para espécies do gênero *Azospirillum* e outros que se originaram deste, como o *Nitrospirillum*, é a produção de auxinas (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993; CASSÁN et al. 2014).

Avaliando crescimento de raízes de cana-de-açúcar pré-germinadas inoculadas com bactérias diazotróficas, Santos et al., (2019) observaram que inoculação com estirpes selecionadas de bactérias diazotróficas beneficiou o crescimento inicial e a produção de mudas. Gírio et al., (2015) observaram que em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com uma mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas, incluindo a BR11145, apresentaram efeito fisiológico positivo no crescimento inicial das plantas. Eles também observaram que o inoculante usado não aumentou a massa seca nas raízes, porém, promoveu maior comprimento radicular.

Entre os doze materiais testados apenas o *S. officinarum* SP791011 foi plantada para a produção de açúcar em escala, sendo muito utilizada no estado de Minas gerais. Entretanto poucos estudos de inoculação a utilizaram por ter sido substituída nos últimos anos nos canaviais brasileiros por variedades mais produtivas. Esta variedade foi utilizada no estudo de inoculação usando uma estirpe do gênero *Acinetobacter*, estirpe ICB117 isolada desta mesma planta (KLEINGESINDS, 2010). A inoculação aumentou o número de folhas, massa de raízes e a assimilação máxima líquida de CO₂, mas não influenciou a altura, massa seca da parte aérea nem a atividade da nitrato redutase após 60 dias, prazo inferior ao avaliado neste trabalho.

Tabela 11. Balanço de P nos vasos contendo 12 genótipos de cana inoculados ou não com *N. amazonense* aos 109 DAP.

Espécie	Genótipo	Inoculação	Solo	Tolete inicial	Tolete final	P do Tolete mobiliado para a planta (PTM)	Raiz	Parte aérea	P acumulado em folhas e raízes (PAP)	Razão PAP/ PTM	Efeito inoculante
Mg / planta											
<i>Miscanthus</i> sp	Figi 10	Controle	13,37	4,92	0,50	4,42	0,54	3,89	4,43	1,00	0,05
		Inoculado	13,37	4,92	0,37	4,55	0,60	4,17	4,77	1,05	
<i>S. arundinaceus</i>	IJ76-364	Controle	14,12	2,01	1,11	0,90	088*	2,85	3,73	4,14	-0,82
		Inoculado	14,12	2,01	0,89	1,12	0,51	3,21	3,72	3,32	
<i>S. officinarum</i>	IJ76 470	Controle	13,37	9,66	0,61	9,05	0,64	3,65	4,29	0,47	0,09
		Inoculado	13,37	9,66	0,71	8,95	0,57	4,48*	5,05	0,56	
	SP791011	Controle	13,37	9,05	0,63	8,42	0,71	4,58	5,29	0,63	0,02
		Inoculado	13,37	9,05	0,78	8,27	0,77	4,57	5,34	0,65	
	Hinahina	Controle	14,12	3,68	0,92	2,76	0,93	3,67	4,60	1,67	0,21
		Inoculado	14,12	3,68	0,87	2,81	0,69	4,59	5,28	1,88	
<i>S. robustum</i>	US76-414	Controle	13,37	6,32	1,28	5,04	0,54	4,83	5,37	1,07	0,40
		Inoculado	13,37	6,32	1,47	4,85	0,53	6,57	7,10	1,46	
<i>S. spontaneum</i>	US76-1319	Controle	13,37	3,35	0,67	2,68	0,83	3,97	4,80	1,79	1,94
		Inoculado	13,37	3,35	1,24*	2,11	1,66	6,21*	7,87	3,73	
	Arundinoid B	Controle	14,12	7,71	3,10	4,61	1,57	6,29	7,86	1,70	0,11
		Inoculado	14,12	7,71	2,76	4,95	1,62	6,51	8,13	1,64	
	CPDau 849678	Controle	14,12	5,16	1,18	3,98	0,98	5,98	6,96	1,75	-0,17
		Inoculado	14,12	5,16	1,71	3,45	1,39	5,11	6,50	1,88	
	NG77-042	Controle	14,12	8,48	1,71	6,77	0,75	4,87	5,62	0,83	-0,33
		Inoculado	14,12	8,48	1,37	7,11	0,51	4,20	4,71	0,66	
	NG77-122	Controle	14,12	1,64	0,79	0,85	0,53	4,57*	5,10	6,00	-0,33
		Inoculado	14,12	1,64	0,89	0,75	0,69	3,56	4,25	5,67	
<i>Sacharum</i> sp.	Q 45416	Controle	14,12	3,15	0,60	2,55	0,51	4,16	4,67	1,83	1,45
		Inoculado	14,12	3,15	1,62	1,53	0,73	4,29	5,02	3,28	
Média		Controle		5,43	1,09	4,34	0,78	4,44	5,23	1,91	
		Inoculado		5,43	1,22	4,20	0,86	4,79	5,65	2,15	

*(Planta inteira = tolete final + raiz + parte aérea) - tolete inicial = N extraído de outra fonte. Valores médios de 6 repetições. * F teste ($p < 0,05$).

Continuando o balanço de nutrientes dos 12 genótipos, segue na Tabela 12 o balanço de cálcio (Ca) após 109 dias de crescimento (Tabela 15). Da mesma forma que o K, o Ca também apresentou alguns genótipos com valores negativos onde a quantidade inicial presente nos toletes foi menor que a remanescente nas plantas ao final dos 109 dias. O cálcio é um elemento estrutural e pouco móvel no tecido e desta forma permanece nas estruturas mais velhas em maior quantidade, é o caso dos toletes que só utilizaram cerca de 3,93 mg de Ca durante 109 dias, restando 7,2 mg ainda no tolete remanescente. O restante do Ca foi adquirido do solo mas em pequenas quantidades, aproximadamente 1,5 mg na média.

Dentro da diversidade de plantas avaliadas, três genótipos de *S. spontaneum* acumularam quantidades superiores a 13,5 mg de Ca na plantas, chegando a 19,12 mg no US79-1319. Este material vegetal, um *S. spontaneum* diferencia-se de todos os outros 11 genótipos pelo seu vigor e capacidade extrativa, podendo ser considerada uma planta ímpar e com a capacidade regenerativa de ser uma invasora de ambientes especialmente os mais restritivos (Tabela 15).

Hinahina apresentou um efeito inoculante para Ca, acumulando mais 1,41 mg deste elemento, isto é 2 vezes mais Ca nas plantas inoculadas em relação ao controle (Tabela 15). Outro genótipo de interesse é o NG77-122 que chegou a acumular 7,94 mg a mais nas plantas inoculadas.

O balanço de magnésio (Mg) mostra que dos 4,7 mg deste elemento utilizados no crescimento, cerca de 50% permaneceram no tolete remanescente (Tabela 16). Por ser pouco móvel assim como o cálcio e utilizado em menor quantidade que este, o solo supriu a demanda de Mg das plantas. Alguns materiais apresentaram dados menores no inicial devido ao erro da forma de amostrar as plantas, assim como os outros elementos. O comportamento dos genótipos responsivos a inoculação foi similar e da mesma forma Hinahina, US72-1319, CPDau 849678 e NG77-122 apresentaram efeito inoculante em diferentes magnitudes (Tabela 13).

De acordo com o crescimento limitado pela falta de N e a clorose desenvolvidas pelos materiais analisados (Figura 2), o Mg, que é estrutural e essencial para a clorofila, foi utilizado abaixo da necessidade da planta. Magnésio também é importante para a formação de raízes, o que explica que 27,9 % deste elemento foi alocado no sistema radicular. A inoculação aumentou seu acúmulo em 26% em relação ao controle mas dos 12 materiais testados, oito não responderam a inoculação.

De uma forma geral neste estudo exploratório algumas modificações devem ser feitas para melhorar a forma de análise. A primeira é tirar do material propagativo uma amostra antes do plantio para se medir exatamente na mesma planta o teor inicial dos nutrientes oriundos da planta mãe, o segundo fator é o tempo de crescimento que deve ser superior a três meses e utilizar solo adubado com todos os nutrientes sendo o N um tratamento. Assim o potencial de crescimento será avaliado e a resposta ao inoculante melhor dimensionada. Neste estudo, tirando o genótipo que produziu mais massa com a aplicação do inoculante, o US72-1319, o restante tiveram comportamentos similares, onde o inoculante não proporcionou uma resposta clara de seu efeito. Como são materiais rústicos, que pouco se conhece sobre a microbiota associada ou mesmo da demanda nutricional, novos experimentos podem ajudar a entender tanto a resposta positiva do US72-1319 como da resposta mediana do CPDau 849678, NG77-122 e Hinahina por exemplo para melhor classificar os materiais aqui testados.

Estudos de inoculação em genótipos não melhorados são raros ou nulos. A prioridade sempre é de aplicar a bactéria selecionada em materiais melhorados e em uso nos ambientes

de produção. Entretanto, estudos de genômica descrevem diferentes comunidades microbianas associadas a estas espécies do gênero *Saccharum*. Dong et al., (2018) avaliaram a comunidade de bactérias endofíticas em diferentes genótipos das espécies de cana aqui avaliadas e encontraram grande diversidade de sequências dos genes *16 S rRNA* e *nifH* nas raízes. Mesmo sem grandes informações sobre a origem dos materiais avaliados os autores separaram agrupamentos e baseado no dendrograma de similaridades (UPGMA) que as comunidades bacterianas de oito variedades de cana-de-açúcar e duas cultivares comerciais diferiram de um trabalho prévio usando outras maneiras de agrupar os resultados, neste caso com marcadores RFLP (LU et al., 1994), as comunidades bacterianas de *S. robustum* e *S. spontaneum* foram agrupados em dois grupos diferentes. Embora nenhuma avaliação microbiológica tenha sido realizada, os dados de crescimento foram influenciados pela inoculação de uma única estirpe, mostrando que estes materiais rústicos se beneficiam de forma diferenciada a aplicação de uma nova população.

Dentre as espécies do complexo *Saccharum* (DILLON et al., 2007), *S. spontaneum* é uma espécie silvestre com a distribuição mais ampla (TAI & MILLER, 2002), e a que provavelmente apresenta a maior fonte potencial de variação genética para lidar com a produção de biomassa em ambientes hostis (AITKEN & MCNEIL, 2010). Esta variabilidade genética confere a planta grande adaptabilidade, fato este que pode explicar que a resposta de crescimento nesta fase inicial de 109 dias foi melhor representada pelos genótipos deste gênero, especialmente pelo US72-1316, CPDau 849678 e NG77-122.

Notoriamente das espécies avaliadas neste estudo, o *S. spontaneum* tem o maior potencial para inserir variabilidade genética entre as espécies intimamente relacionadas à cana-de-açúcar sendo normalmente utilizada nos cruzamentos varietais (da SILVA et al. 2018). A cana chamada de “brava” (*S. spontaneum*) é uma gramínea que apresenta alta teor de fibra e de carbonohidratos e tem uma melhor tolerância à seca do que *S. officinarum* (AMALRAJ et al. 2008; CHANDEL et al. 2011). Portanto, a cana brava pode ser usada em programas de melhoramento de cana-de-açúcar para desenvolver tolerância à seca (MUNAWARTI et al. 2014). Estes resultados da parte do vegetal, podem explicar pelo menos em parte a resposta de crescimento da planta. Mas não explica a resposta da aplicação da estirpe Na-BR 11145 no US72-1319. Mas pode representar uma importante descoberta no que se refere à inoculação devido a magnitude da resposta observada no ganho de massa (Tabela 4). Como são materiais selvagens, um estudo mais aprofundado deve ser feito para confirmar as observações descritas nesta dissertação.

Tabela 12. Balanço de Ca nos vasos contendo 12 genótipos de cana inoculados ou não com *N. amazonense* aos 109 DAP.

Espécie	Genótipo	Inoculação	Solo	Tolete inicial	Tolete final	Ca do Tolete mobiliado para a planta (CaTM)	Raiz	Parte aérea	Ca acumulado em folhas e raízes (CaAP)	Razão CaAP/CaTM	Efeito inoculante
mg											
<i>Miscanthus sp</i>	Figi 10	Controle	534,40	11,74	3,27	8,47	1,44	4,65	6,09	0,72	
		Inoculado	534,40	11,74	2,30	9,44	1,38	5,00	6,39	0,68	-0,04
<i>S. arundinaceus</i>	IJ76-364	Controle	534,40	6,78	3,78	3,00	1,13	4,24	5,37	1,79	
		Inoculado	534,40	6,78	3,28	3,50	1,27	3,13	4,40	1,26	-0,53
<i>S. officinarum</i>	IJ76 470	Controle	534,40	16,07	2,44	13,63	1,56	4,72	6,28	0,46	
		Inoculado	534,40	16,07	3,45*	12,62	1,49	4,16	5,65	0,45	-0,01
	SP791011	Controle	534,40	22,28	2,85	19,43	1,79*	6,33	8,12	0,42	
		Inoculado	534,40	22,28	3,43	18,85	1,63	5,98	7,61	0,40	-0,01
	Hinahina	Controle	534,40	6,36	2,53	3,83	1,78	3,53	5,31	1,39	
		Inoculado	534,40	6,36	4,05	2,31	1,62	4,84	6,46	2,80	1,41
<i>S. robustum</i>	US76-414	Controle	534,40	18,38	4,47	13,91	1,30	6,28	7,58	0,54	
		Inoculado	534,40	18,38	4,58	13,80	1,14	8,30	9,44	0,68	0,14
<i>S. spontaneum</i>	US76-1319	Controle	534,40	16,90	4,58	12,32	2,32	5,34	7,66	0,62	
		Inoculado	534,40	16,90	5,06	11,84	4,61	14,51*	19,12	1,61	0,99
	Arundinoid B	Controle	534,40	6,78	5,29	1,49	3,70	13,26*	16,96	11,38	
		Inoculado	534,40	6,78	5,20	1,58	4,16	9,33	13,49	8,54	-2,54
	CPDau 849678	Controle	534,40	7,21	5,72	1,49	2,76	13,67*	16,43	11,03	
		Inoculado	534,40	7,21	7,08	0,13	3,89	8,32	12,21	93,92	82,90
	NG77-042	Controle	534,40	4,32	2,52	1,80	1,99	7,16	9,15	5,08	
		Inoculado	534,40	4,32	2,65	1,67	1,27	5,20	6,47	3,87	-1,21
	NG77-122	Controle	534,40	2,71	4,75*	-2,04	1,10	4,76	5,86	-2,87	
		Inoculado	534,40	2,71	1,46	1,25	1,29	5,05	6,34	5,07	7,94
<i>Sacharum sp.</i>	Q 45416	Controle	534,40	14,50	4,69	9,81	1,23	6,37	7,60	0,77	
		Inoculado	534,40	14,50	5,19	9,31	1,57	4,65	6,22	0,67	-0,11
Média		Controle	534,40	11,17	3,91	7,26	1,84	6,69	8,53	2,61	
		Inoculado	534,40	11,17	3,98	7,19	2,11	6,54	8,65	10,00	

Genótipos cujos valores de Ca foram considerados os maiores e não a media, para fechar o balanço de massa. Este procedimento foi adotado pois as amostras iniciais eram de toletes diferentes daqueles plantados nos vasos. (Planta inteira = tolete final + raiz + parte aérea) - tolete inicial = N extraído de outra fonte. Valores médios de 6 repetições. * F teste ($p < 0,05$).

Tabela 16. Balanço de Mg nos vasos contendo 12 genótipos de cana inoculados ou não com *N. amazonense* aos 109 DAP.

Espécie	Genótipo	Inoculação	Solo	Tolete inicial	Tolete final	Mg do Tolete mobiliado para a planta (MgTM)	Raiz	Parte aérea	Mg acumulado em folhas e raízes (MgAP)	Razão MgAP/MgTM	Efeito inoculante
mg											
<i>Miscanthus</i> sp	Figi 10	Controle	112,44	12,55	2,77	9,78	1,65	4,35	6,00	0,61	
		Inoculado	112,44	12,55	1,71	10,84	1,75	4,31	6,06	0,56	-0,05
<i>S. arundinaceus</i>	IJ76-364#	Controle	112,44	3,06	2,91	0,15	0,97	3,80	4,77	31,80	
		Inoculado	112,44	3,06	1,88	1,18	0,61	3,89	4,50	3,81	-21,99
	IJ76 470	Controle	112,44	7,34	1,73	5,61	1,57	5,53	7,10	1,27	
		Inoculado	112,44	7,34	2,09	5,25	1,34	4,86	6,20	1,18	-0,08
	SP791011	Controle	112,44	11,91	1,70	10,21	1,56	6,25	7,81	0,76	
		Inoculado	112,44	11,91	2,08	9,83	1,59	6,22	7,81	0,79	0,03
<i>S. officinarum</i>	Hinahina	Controle	112,44	4,47	1,56	2,91	1,84	3,80	5,64	1,94	
		Inoculado	112,44	4,47	3,33	1,14	1,36	5,63*	6,99	6,13	4,19
<i>S. robustum</i>	US76-414	Controle	112,44	13,97	3,24	10,73	1,57	6,04	7,61	0,71	
		Inoculado	112,44	13,97	3,05	10,92	1,25	8,35	9,60	0,88	0,17
	US76-1319	Controle	112,44	9,66	2,57	7,09	1,80	4,69	6,49	0,92	
		Inoculado	112,44	9,66	2,49	7,17	4,33	16,89*	21,22	2,96	2,04
	Arundinoid B	Controle	112,44	8,37	3,55	4,82	2,56	8,34	10,90	2,26	
		Inoculado	112,44	8,37	3,41	4,96	2,51	7,68	10,19	2,05	-0,21
	CPDau 849678	Controle	112,44	4,29	3,56	0,73	2,14	8,01	10,15	13,90	
		Inoculado	112,44	4,29	4,09	0,20	2,32	6,50	8,82	44,10	30,20
	NG77-042	Controle	112,44	3,17	1,82	1,35	1,53	5,20	6,73	4,99	
		Inoculado	112,44	3,17	1,78	1,39	1,03	5,01	6,04	4,35	-0,64
<i>S. spontaneum</i>	NG77-122#	Controle	112,44	2,01	3,74*	-1,73	1,08	5,20*	6,28	-3,63	
		Inoculado	112,44	2,01	0,82	1,19	1,29	3,26	4,55	3,82	7,45
<i>Sacharum</i> sp.	Q 45416	Controle	112,44	5,26	1,77	3,49	1,00	4,71	5,71	1,64	
		Inoculado	112,44	5,26	1,98	3,28	1,15	4,36	5,51	1,68	0,04
Média		Controle	112,44	7,17	2,58	4,60	1,61	5,49	7,10	4,76	
		Inoculado	112,44	7,17	2,39	4,78	1,71	6,41	8,12	6,03	

Genótipos cujos valores de Mg foram considerados os maiores e não a media, para fechar o balanço de massa. Este procedimento foi adotado pois as amostras iniciais eram de toletes diferentes daqueles plantados nos vasos. (Planta inteira = tolete final + raiz + parte aérea) - tolete inicial = N extraído de outra fonte. Valores médios de 6 repetições. * F teste (p < 0,05).

Finalizando os estudos de crescimento dos 12 genótipos foi usada a marcação natural de átomos de ^{15}N em excesso nas amostras de tecido tanto no tolete inicial como nas diferentes partes ao final do crescimento das plantas. O painço (*Panicum miliaceum*) foi usado como valor de referência do método, usado como testemunha não fixadora. Estes dados em teoria poderiam estimar se a inoculação promoveu alguma diluição significativa do N acumulado nas plantas e neste caso seria oriundo do ar. Como observamos na Tabela 17, a variabilidade de marcações foi bastante alta, e ao contrário do que se esperava, alguns materiais ficaram com valores altos de delta ^{15}N , especialmente no experimento 2 e na parte aérea (Tabela 17).

Mesmo refazendo as análises, o material usado para moagem foi todo passado ao mesmo tempo no moinho de rolo, não havendo forma de analisar uma outra amostra. Os valores acima de 20 deltas, não podem ser explicados e, portanto, inviabilizaram a análise de contribuição da FBN nos 12 materiais testados. Nos genótipos plantados no experimento 1, com valores dentro do esperado, não foi observada nenhuma diluição advinda da entrada do N atmosférico, portanto, podemos dizer que a aplicação do inoculante não foi eficiente para contribuir com N advindo da FBN nestes materiais rústicos e durante os primeiros 109 dias.

Com base nestes resultados, este estudo inicial de avaliação da inoculação dos genótipos de cana oriundos de espécies diferentes e não melhoradas como as variedades de cana no mercado, são fontes interessante que precisam ser testadas em ensaios de maior duração, usando solo corrigido para que o potencial da contribuição seja do efeito promotor ou da FBN sejam elucidados.

Tabela 13. Valores de delta ^{15}N dos 12 genótipos de cana inoculados ou não com N. amazonense aos 109 DAP e a marcação do solo usado nos dois experimentos e valor de referência da planta não fixadora (Painço).

Espécie	Genótipo	Inoculação	Tolete inicial	Tolete final	Raiz	Parte aérea
			Delta ¹⁵ N			
<i>Miscanthus</i> sp	Figi 10	Controle	9,46	8,59	10,33	7,95
		Inoculado	9,46	9,14	10,60	7,99
<i>S. arundinaceus</i>	IJ76-364	Controle	6,74	6,11	12,32	21,85
		Inoculado	6,74	7,34	12,49	16,35
<i>S. officinarum</i>	IJ76 470	Controle	9,46	5,46	10,33	7,44
		Inoculado	9,46	6,97	8,15	8,51
	SP791011	Controle	15,96	9,56	10,84	9,41
		Inoculado	15,96	8,28	9,30	9,53
	Hinahina	Controle	7,88	6,50	12,98	25,79
		Inoculado	7,88	9,00	13,93	28,94
<i>S. robustum</i>	US76-414	Controle	11,44	7,68	9,07	8,00
		Inoculado	11,44	8,89	8,87	9,19
<i>S. spontaneum</i>	US76-1319	Controle	17,58	7,77	9,40	7,58
		Inoculado	17,58	8,80	10,81	9,22
	Arundinoid B	Controle	7,07	6,29	15,80	23,22
		Inoculado	7,07	5,79	14,67	25,41
	CPDau 849678	Controle	6,95	10,91	14,74	37,85
		Inoculado	6,95	11,36	12,86	28,61
	NG77-042	Controle	5,93	9,74	14,29	25,86
		Inoculado	5,93	9,18	15,32	31,44
	NG77-122#	Controle	16,05	10,12	15,02	32,48
		Inoculado	16,05	11,60	14,72	32,58
<i>Sacharum</i> sp.	Q 45416	Controle	6,76	9,88	17,68	42,40
		Inoculado	6,76	9,93	14,96	30,92
Média		Controle	10,11	8,22	12,73	20,82
		Inoculado	10,11	8,86	12,22	19,89

Continua...

Continuação da **Tabela 17.**

Valores delta ¹⁵ N	
Solo	10,6
Planta referência - Painço	
Raiz	2,58
Parte aérea	3,02

Valores médios de quatro repetições.

5. CONCLUSÕES

Dos 12 genótipos inoculados com *Nitrospirillum amazonense* estirpe BR 11145, apenas o genótipo US79-1316, pertencente a espécie *Saccharum spontaneum*, aumenta o ganho da massa e acúmulo de nutrientes nas plantas inoculadas em relação ao controle. Este genótipo quando inoculado cresceu 2,1 vezes mais que o segundo genótipo no ranking dos materiais avaliados em relação ao ganho de massa, o Arundinoid B inoculado. Este maior ganho de massa seca da parte aérea reflete no maior acúmulo de nutrientes.

O crescimento das plantas durante 109 dias em substrato pobre em nutrientes, especialmente nitrogênio (0,02%), limitou o crescimento da maioria das plantas.

Não há evidências da contribuição da fixação biológica de nitrogênio nos 12 materiais avaliados.

A promoção de crescimento, que pode atuar na fase de desenvolvimento inicial destas plantas, não foi evidenciada na maioria dos genótipos testados, com resposta positiva apenas no ganho de massa da parte aérea e raízes do *S. spontaneum* UD76-1319 e na massa seca de raízes dos genótipos NG77-122 e de *Miscanthus* genótipo Fiji 10.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, K. S.; MCNEIL, M. Diversity analysis. In: HENRY, R. J.; KOLE, C. (Eds.) **Genetics, genomics and breeding of sugarcane**. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. P. 19-42; 2010.
- ALVIM, K. R. T. **Seleção de progênies de cruzamentos entre *Saccharum spontaneum* e cana-de-açúcar para produção de bioenergia**. 55 f. 2015. Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2015.
- ALMALRAJ, V. A.; BALASUNDARAM, N. On the taxonomy of the members of *Saccharum* complex. **Genetic Resources and Crop Evolution** v. 53, p. 35-41, 2006.
- AMALRAJ, A.; RAKKIYAPPAN, P.; NEELAMATHI, D.; CHINNARAJ, S.; MANIAN, S. Wild cane as a renewable source for fuel and fibre in the paper industry. **Current Science** 95: 1599-1602, 2008.
- AMARAL, A. L.; SANTOS, J. M.; BARBOSA, G. V. S. Denominação de cultivares de cana-de-açúcar como suporte à documentação e utilização do germoplasma conservado. **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Documents (INFOTECA-E)**, 2015.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 549-579, 2005.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; 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, J. I.; POT, B. KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. Nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 802-810, 1996.
- BALDANI, I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H., BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v. 384, p. 413-431, 2014.
- BERNABEU, P. R.; GARCÍA, S. S.; FERREYRA, G. G.; GUIDI, V. I; GALAR, M. L.; BOIARDI, J. L.; LUNA, M. F. Mineral phosphate solubilization in *Burkholderia tropica* involves PQQ-Glucose dehydrogenase. **British Microbiology Research Journal**, v.13, p. 1-8, 2016.
- BODDEY, R. M.; POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Use of ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugar cane and others grasses. **Australian Journal of Agricultural Research** v. 28, p. 889-895, 2001.

BODDEY, R. M.; SOARES, L. H. B.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Bioethanol production in Brazil. In: PIMENTEL, D. (Ed.). **Renewable energy systems: Environmental and Energetic Issues**. 1. ed. New York: Springer, 2008. p. 321-356.

BOLONHEZI, D.; MUTTON, M. A. Plant growth-promoting bacteria and nitrogen fertilization effect on the initial growth of sugarcane from pre-sprouted seedlings. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, p. 33-43, 2015.

BOWEN, G. D.; ROVIRA, A. D. The rhizosphere and its management to improve plant growth. **Advances in Agronomy** v. 66, p. 1-102, 1999.

BOUFFAUD, M.; POIRIER, M.; MULLER, D.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Root microbiome relates to plant host evolution in maize and other Poaceae. **Environmental Microbiology**, v. 16, p. 2804-2814, 2014.

BROWN, J. S.; SCHNELL, R. J.; POWER, E. J.; DOUGLAS, S. L.; KUHN, D. N. Analysis of clonal germplasm from five *Saccharum* species: *S. barberi*, *S. robustum*, *S. officinarum*, *S. sinense* and *S. spontaneum*. A study of inter- and intra species relationships using microsatellite markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, p. 627-648, 2007.

BUYER, J. S.; KAUFMAN, D. D. Microbial diversity in the rhizosphere of corn grown under conventional and low-input systems. **Applied Soil Ecology**, v. 5, n. 1, p. 21-27, 1997.

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

CAVALCANTE, V. A., DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil** v. 108, p. 23-31, 1988. doi: 10.1007/BF02370096

CADOUX, S.; RICHE, A. B.; YATES, N. E.; MACHET, J. M. Nutrient requirements of *Miscanthus x giganteus*: conclusions from a review of published studies. **Biomass Bioenergy**, v. 38, p. 14-22, 2012.

CHANDEL, A. K.; SINGH, O. V.; CHANDRASEKHAR, G.; RAO, L. V.; NARASU, M. L. Bioconversion of novel substrate, *Saccharum spontaneum*, a weedy material into ethanol by *Pichia stipitis* NCIM3498. **Bioresource Technology** 102: 1709-1714, 2011.

CHAVES, V. A., DOS SANTOS, S. G., SCHULTZ, N., PEREIRA, W., SOUSA, J. S., MONTEIRO, R. C., REIS, V. M. Desenvolvimento inicial de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 39(6), 1595-1602, 2015.

CLEMENTS, H. F. **Sugarcane: Crop Logging and Crop Control. Principles and Practices**. Chapter 1. p. 17-47. 1980. The University Press of Hawai.

COLETI, J. T.; CASAGRANDE, J. C.; STUPPIELO, J. J. L. RIBEIRO, L. D.; OLIVEIRA, G. R. Remoção de macronutrientes pela cana-planta e cana-soca, em Argissolos, variedades

RB835486 e SP81-3250. In: Congresso Nacional da STAB, 8, Recife, 2002. **Anais...** Recife: SATB, p. 316-332. 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - (CONAB) **Acompanhamento da Safra Brasileira - Cana-de-açúcar Safra 2021/22** Observatório Agrícola. 2021.

CRESPO, J. M., BOIARDI J. L., LUNA, M. F. Mineral phosphate solubilization activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus* under P-limitation and plant root environment. **Agricultural Sciences**, v. 2, p. 16-22, 2011.

DANIELS, J.; SMITH, P.; PANTON, N.; WILLIAMS, C. A. The origin of the genus *Saccharum*. *Sugarcane Breed. News* 36: 24-39, 1975.

DILLON, S. L.; SHAPTER, F. M.; HENRY, R. J.; CORDEIRO, G.; IZQUIERDO, L.; LEE, L. S. Domestication to crop improvement: genetic resources for sorghum and *Saccharum* (Andropogoneae). **Annals of Botany** 100: 975-989, 2007.

DONG, M.; YANG, Z.; CHENG, G.; PENG, L.; XU, Q.; XU, J. Diversity of the Bacterial Microbiome in the Roots of Four *Saccharum* Species: *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, and *S. officinarum*. **Frontiers in Microbiology** 9:267. doi: 10.3389/fmicb.2018.00267. 2018.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA [EMBRAPA]. **Manual de laboratórios: solo, água, nutrição animal e alimentos**.

EDME, S.J.; MILLER, J. D.; GLAZ, B.; TAI P. Y. P.; COMSTOCK, J. C. Genetic contribution to yield gains in the Florida sugarcane industry across 33 years. **Crop Science** v. 45, p. 92-97, 2005.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology** v. 67, p. 5285-5293, 2001.

ESPIRONELO, A.; GALLO, J. R.; LAVORENTI, A.; IGUE, T.; HIROCE, R. Efeitos da adubação NPK nos teores de macronutrientes das folhas de cana-de-açúcar (cana-soca). **Bragantia**, v. 45, p. 377-382, 1986.

FARONI, C. E.; TRIVELIN, P. C. O.; FRANCO, H. C. J.; VITTI, A. C.; OTTO, R.; CANTARELLA, H. Estado nutricional da cultura de cana-de-açúcar (cana-planta) em experimentos com ¹⁵N. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1919-1927, 2009.

FERREIRA, D.; FRANCO, H. C. J.; OTTO, R.; VITTI, A. C.; FORTES, C.; FARONI, C. E.; GARSIDE, A. L.; TRIVELIN, P. C. O. Contribution of N from green harvest residues for sugarcane nutrition in Brazil. **GCB Bioenergy** v. 8, p. 859-866. 2016.

FERREIRA, G. O. **Caracterização citogenética e molecular em acessos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 2021. - Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2021. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/214331>.

FERREIRA, N. T. S.; OLIVEIRA, P. S.; OLIVEIRA, D. J. A.; SANTANA, A. E. G.; RIFFEL, A. Identificação dos Metabólitos Orgânicos Voláteis (MOVs) em diferentes acessos do BAG de cana e o seu papel na resistência a *Diatraea saccharalis*. In: Seminário de iniciação científica e pós-graduação da embrapa tabuleiros costeiros, 8, 2018, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2018. Editor técnico: Ronaldo Souza Resende.

FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. O.; FARONI, C. E.; VITTI, A. C.; OTTO, R. Stalk yield and technological attributes of planted cane as related to nitrogen fertilization. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 5, p. 579-590, 2010.

FRANCO, H. C. J.; OTTO, R.; FARONI, C. E.; VITTI, A. C.; OLIVEIRA, E.C.A.; TRIVELIN, P. C. O. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, v.121, p. 29-41, 2011.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R.; CABALERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indole-acetic producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, v.154, p.145-150, 1993.

GÍRIO, L. A. DA S., DIAS, F. L. F., REIS, V. M., URQUIAGA, S., SCHULTZ, N., 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*. **Journal Plant Growth Regulators** v. 33, p. 440-459, 2015.

GLASSOP, D.; PERROUX, J.; RAE, A. Differences in sugarcane stool branching within *Saccharum spontaneum* genotypes and compared to *Saccharum officinarum* and commercial varieties. **Euphytica** v. 217, p. 217,250, 2021.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2, p. 1-15, 2012.

D'HONT, A.; GLASZMANN, J. C. Sugarcane genome analysis with molecular markers - a first decade of research. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology**, v. 24, p.556-559, 2001.

GAVA, G. J. C.; SCARPARE, F. V.; CANTARELLA, H.; KÖLLN, O. T.; RUIZ-CORRÊA S. T.; ARLANCH, A. B.; TRIVELLIN, P. C. O. Nitrogen source contribution in sugarcane-inoculated plants with diazotrophic bacteria under urea-N fertigation management. **Sugar Tech**, v. 21, p. 462-470, 2019.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology** v. 5, p: 122-127, 2001.

HAYASHI, F.; ANNA, S. Estudo da bactéria promotora de crescimento vegetal. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Centro de Biotecnologia. n. 51, p. 33086078, 2011.

HERRIDGE, David F.; PEOPLES, Mark B.; BODDEY, Robert M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, n. 1-2, p. 1-18, 2008.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. **Embrapa Soja**, v. 325, p. 36, 2011.

IQBAL, Y.; GAUDER, M.; CLAUPEIN, W.; GRAEFF-HÖNNINGER, S.; LEWANDOWSKI, I. Yield and quality development comparison between miscanthus and switchgrass over a period of 10 years. **Energy**, v. 89, p. 268-276, 2015.

IRVINE, J. E. *Saccharum* species as horticultural classes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, p. 186-194. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s001220051057>. 1999.

ISHERWOOD, K. E. **O uso de fertilizantes minerais e o meio ambiente**. Ed. traduzida. International Fertilizer Industry Association, Paris, 2000, 63p.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 785-797, 1997. doi: 10.1093/jxb/48. 3.785. 1997.

KAUR, C.; SELVAKUMAR, G.; GANESHAMURTHY, A. N. Draft genome sequence of phosphate-solubilizing bacterium *Paraburkholderia tropica* Strain P-31 isolated from pomegranate (*Punica granatum*) rhizosphere. **Genome Announcement**. 4:e00844-16. doi: 10.1128/genomeA.00844-16. 2016.

KLEINGESINDS, C.K. **Efeito da inoculação de uma bactéria endofítica fixadora de nitrogênio (*Acinetobacter* sp. ICB117) no desenvolvimento de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. variedade SP791011)**. Dissertação de Mestrado, 2010. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

LAVOURA. **Variedade de cana-de-açúcar produz ácido natural que ataca sua principal praga** - A Lavoura. Acesso em 10/08/2022.

LI, H-B., SINGH, R.K., SINGH, P., SONG, Q-Q., XING, Y-X., YANG, L.T., LI, Y-R. Genetic diversity of nitrogen-fixing and plant growth promoting *Pseudomonas* species isolated from sugarcane rhizosphere. **Frontiers in Microbiology**, 8:1268, DOI: 10.3389/fmicb.2017.01268. 2017.

LIMA, E.; BODDEY, R. M.; DOBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using ¹⁵N aided nitrogen balance. **Soil Biology Biochemistry**, v. 19, p. 165-170, 1987.

LIMA, J. E.; SEREZINO, L. H. D.; ALVES, M. K.; TAGLIAFERRO, A. L.; VITTI, M.; CRESTE, S.; RIÑO-PACHÓN, D. M.; DOS SANTOS, R. V.; FIGUEIRA, A. Root nitrate uptake in sugarcane (*Saccharum* spp.) is modulated by transcriptional and presumably posttranscriptional regulation of the NRT2.1/ NRT3.1 transport system. **Molecular Genetic and Genomics**, v. 297, p.1403-1421, 2022.

LIN, S. Y.; HAMEED, A.; ARUN, A. B. Description of *Noviherbaspirillum malthae* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-contaminated soil, and proposal to reclassify *Herbaspirillum soli*, *Herbaspirillum aurantiacum*, *Herbaspirillum canariense* and *Herbaspirillum psychrotolerans* as *Noviherbaspirillum soli* comb. nov., *Noviherbaspirillum aurantiacum* comb. nov.,

Noviherbaspirillum canariense comb. nov. and *Noviherbaspirillum psychrotolerans* comb. nov. based on polyphasic analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 4100-4107, 2013.

LIU, Y.; LUDEWIG, U. Improved establishment of *Miscanthus* × *giganteus* stem propagation by *Herbaspirillum* inoculation, **Industrial Crops and Products**, v. 150 artigo 112339, 2020.

LU, Y. H.; D'HONT, A.; WALKER, D. I. T.; RAO, P. S.; FELDMANN, P.; GLASZMANN, J. C. Relationships among ancestral species of sugarcane revealed with RFLP using single copy maize nuclear probes. **Euphytica** v. 78, p. 7-18, 1994.

MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. E. A. R. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 7, p. 582-595, 2008.

MAGALHAES, F. M.; BALDANI, J. L.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÔBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**. V. 55, p. 417-430, 1983.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: ABPPF, 319p. 1997.

MALVIYA, M. K.; LI, C-N.; LAKSHMANAN, P.; SOLANKI, M. K.; WANG, Z.; SOLANKI, A. C.; NONG, Q.; VERMA, K. K.; SINGH, R. K.; SINGH, P.; SHARMA, A.; GUO, D-J.; DESSOKY, E. S.; SONG, X-P.; LI, Y-R. High-Throughput Sequencing-Based Analysis of Rhizosphere and Diazotrophic Bacterial Diversity Among Wild Progenitor and Closely Related Species of Sugarcane (*Saccharum* spp. Inter-Specific Hybrids). **Frontiers in Plant Sciences** 13:829337. doi: 10.3389/fpls.2022.829337. 2022.

MARCONI, T. G.; MARCONI, B., SOLÍS-GRACIA, E. J. S.; PARK, N. J.; GLYNN, N. C. Agronomic and molecular characterization of wild germplasm *Saccharum spontaneum* for sugarcane and energy cane breeding purposes. **Scientia Agricola** 75: 329-338, 2018.

MARQUES JÚNIOR, R. B.; CANELLAS, L. P.; SILVA, L. G. D.; 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.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. Sugarcane underground organs: going deep for sustainable production. **Tropical Plant Biology** v. 4, p. 22-30, 2011.

MELLONI, M. N. G. **Caracterização molecular, citogenética e fenotípica de acessos do Complexo *Saccharum* para fins de introgressão genética**. 2014. v, 135 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2014.

MILLER, A. J.; FAN, X.; ORSEL, M.; SMITH, S. J.; WELLS, D. M. Nitrate transport and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 2297-2306, 2007.

MOURA FILHO, G.; ALBUQUERQUE, A. W. D.; MOURA, A. B.; DOS SANTOS, A. C.; OLIVEIRA FILHO, M. D. S.; SILVA, L. C. D. Diagnose nutricional de variedades de cana-de-açúcar em argissolos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, p. 1102-1109, 2014.

MUNAWARTI, A.; TARYONO, T.; SEMIARTI, E.; SISINDARI, S. Morphological and biochemical responses of Glagah (*Saccharum spontaneum* L.) accessions to drought stress. *Journal of Tropical Life Science* 4: 61-66, 2014.

MUNOZ-ROJAS, J.; CABALLERO-MELLADO, J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. **Microbial Ecology** v. 46, p. 454-464, 2003.

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. Manual de laboratório: solo, água, nutrição vegetal, **nutrição animal e alimentos**. São Carlos-SP: **Embrapa Pecuária Sudeste**, 2005. 313p.

OLIVARES, J.; BEDMAR, E. J.; SANJUÁN, J. Biological nitrogen fixation in the context of global change. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 5, p. 486-494, 2013.

DE OLIVEIRA, M. W.; SANTOS, G. C. S.; OLIVEIRA, T. B. A.; DE FREITAS SANTOS, D.; DA COSTA SOARES, E.; TENÓRIO, T. M. Produção e composição química da forragem de três variedades de cana-de-açúcar. **Conjecturas**, v. 22, n. 8, p. 431-448, 2022.

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**, 242: 205-215, 2002.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; SILVA, E. E. REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil under different moisture levels. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 35, p. 295-299, 2004.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. D.; 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.

OTTO, R.; CASTRO, S. A. Q.; MARIANO, E.; CASTRO, S. G. Q.; FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. O. Nitrogen use efficiency of sugarcane-biofuel production: what is next? **Bioenergy Research**, v. 9, p. 1272-1289, 2016.

OTTO, R.; VITTI, G. C.; LUZ, P. H. D. C. Manejo da adubação potássica na cultura da cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, n.4, p.1137-1145, 2010.

PEREIRA, W.; LEITE, J. M.; HIPÓLITO, G. D. S.; SANTOS, C. L. R. D.; 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.

RAMOS, M. G.; VILLATORO, M. A. A.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to tropical green manure

crops and the residual benefit to a subsequent maize crop using ^{15}N -isotope techniques. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 105-115, 2001.

REIS JÚNIOR, R. A.; MONNERAT, P. H. DRIS norms validation for sugarcane crop. **Pesquisa Agropecuária do Brasil**, v. 38, p. 379-385, 2003.

REIS, V. M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, 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 nitrogenfixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

REIS, V. M.; RIOS, F. A.; BRAZ, G. B. P.; CONSTANTINI, J.; HIRATS, E. S.; BIFFE, D. F. Agronomic performance of sugarcane inoculated with *Nitrospirillum amazonense* (BR11145). **Revista Caatinga**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 918-926, 2020.

ROACH, B. Origin and improvement of the genetic base of sugarcane. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology**, v. 11, p. 34-47, 1989.

ROACH, B. T. Nobilisation of sugarcane. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology**, v. 4, p. 206-216, 1971.

ROBINSON, N.; BRACKIN, R.; VINALL, K.; SOPER, F.; HOLST, J.; GAMAGE, H.; PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; RENNENBERG, H.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **PLoS ONE**. 6:e19045, 2011.

ROSETTO, R.; DIAS, F. L. F.; VITTI, A. C. **Fertilidade do solo, nutrição e adubação**. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (ed.). In: **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. p. 221-238.

DE SANTIS SICA, P.; SHIRATA, E. S.; RIOS, F. A.; BIFFE, D. F.; BRANDÃO FILHO, J. U. T.; ESTRADA, K. R. F. S.; OLIVEIRA JR.; R. S. O. Impact of N-fixing bacterium *Nitrospirillum amazonense* on quality and quantitative parameters of sugarcane under field condition. **Australian Journal of Crop Science** v. 14, p. 1870-1875, 2020.

SANTOS, S. G.; CHAVES, V. A.; RIBEIRO, F. S.; ALVES, G. C.; REIS, V. M. Rooting and growth of pre-germinated sugarcane seedlings inoculated with diazotrophic bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 133, p. 12-23, 2019.

SANTOS, J. P.; GUIMARÃES, V. S.; MARAFON, A. C. Caracterização de acessos do Complexo *Saccharum* quanto às características morfofisiológicas e isotópicas relacionadas com a tolerância à restrição hídrica. In: Seminário de iniciação científica e pós-graduação da Embrapa Tabuleiros Costeiros, 9., 2019, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros; Brasília, DF: Embrapa, 2019. Editor Técnico: Ronaldo Souza Resende.

SCHULTZ, N.; SILVA, J. A.; SOUSA, J. S.; CASSADOR, R. M.; OLIVEIRA, R. P.; CHAVES, V. A.; PEREIRA, W.; SILVA, M. F.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M. REIS, V.

M.; URQUIAGA, S. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 2, p. 407-414, 2014.

SCHWAB, S.; TERRA, L. A.; BALDANI, J. I. Genomic characterization of *Nitrospirillum amazonense* strain CBAmC, a nitrogen-fixing bacterium isolated from surface-sterilized sugarcane stems. **Molecular Genetic Genomics** v. 293, p. 997-1016, 2018.

SCHWAB, S.; HIRATA, E. S.; AMARAL, J. C. A.; SILVA, C. G. N.; SILVA, L. V.; ROUWS, J. R. C.; ROUWS, L. F.; BALDANI, J. I.; REIS, V. Quantifying and visualizing *Nitrospirillum amazonense* strain CBAmC in sugarcane after using different inoculation methods. **Plant and Soil** 2023. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-05940-9>. 2023.

SEABRA, J. E. A.; MACEDO, I. C.; CHUM, H. L.; FARONI, C. E.; SARTO, C. A. Life cycle assessment of Brazilian sugarcane products: GHG emissions and energy use. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, v. 5, p. 519-532, 2011.

SHEARER, G.; KOHL, D.H. N₂ fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.13, p.699-756, 1986.

SCHEIDT, W. S. P.; PIOVEZAN, I. C.; FONTANA, J.; MELEIRO, L. A.; SOARES, L. H. B.; REIS, V. M. Optimization of culture medium and growth conditions of the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* BR11417 for its use as an agricultural inoculant using response surface methodology (RSM). **Plant and soil**, v. 451, p. 75-87, 2019.

SILVA, R. G.; DELBONI, C.; GONÇALES FILHO, M. Reconhecimento da escassez de investigação científica sobre a produção da cana-de-açúcar no setor sucroenergético. **Brazilian Journal of Production Engineering**, v. 6, p. 143-156, 2020.

SILVA, F. C. (Ed.). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2009.

SILVA, J. A. G.; COSTA, P. M. D. A.; MARCONI, T. G.; BARRETO, E. J. D. S.; SOLÍS-GRACIA, N.; PARK, J. W.; GLYNN, N. C. Agronomic and molecular characterization of wild germplasm *Saccharum spontaneum* for sugarcane and energycane breeding purposes. **Scientia Agricola**, v. 75, p. 329-338, 2018.

SILVEIRA, L. C. I.; BRASILEIRO, B. P.; KIST, V.; DAROS, E., PETERNELLI, L. A. Genetic diversity and coefficient of kinship among potential genitors for obtaining cultivars of energy cane. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 2, p. 358-368, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20150015>. Acesso em: 27 out. 2021.

SILVEIRA, L. C. I. da. **Melhoramento genético da cana-de-açúcar para obtenção de cana energia**. 2014. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/37056>. Acesso em: 27 out. 2021.

SILVEIRA, W. H. R. D. **Uso de bactérias promotoras de crescimento em cana-de-açúcar: uma abordagem para a sustentabilidade da cultura**. 6 f. 2021. - Instituto Federal Goiano, [s. l.], 2021. Disponível em: <http://repositorio.ifgoiano.edu.br/handle/prefix/1866>. Acesso em: 27 out. 2021.

SINGH, R. K.; SINGH, P.; SHARMA, A.; GUO, D-J.; UPADHYAY, S. K.; SONG, Q-Q.; VERMA, K. K.; LI, D-P.; MALVIYA, M. K.; SONG, X-P.; YANG, L-T.; LI, Y-R. Unraveling Nitrogen Fixing Potential of Endophytic Diazotrophs of Different *Saccharum* Species for Sustainable Sugarcane Growth. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, 6242. <https://doi.org/10.3390/ijms23116242>. 2022.

SOUZA, R. S. C.; OKURA, V. K.; ARMANHI, J. S. L.; JORRÍN, B.; LOZANO, N.; SILVA, M. J. D.; GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; DE ARAÚJO, L. M.; VERA, N. C.; BAGHERI, H. C.; ARRUDA, P. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Scientific Reports**, 6:28774. doi: 10.1038/srep28774. 2016.

SUZUKI, T.; ENISHI, O.; PONRAGDEE, W.; SANSAYAWICHAI, T.; PHAOWPHAISAL, I.; NARMSILEE, R.; PHOLSEN, P.; TERAJIMA, Y.; MATSUOKA, M. Nutritional evaluation of *Erianthus* spp., *Saccharum spontaneum*, and *Saccharum* spp. hybrids as feed. **Japan Agriculture Research Quarterly** 49(1): 73-78, 2015.

TAI, P. Y. P.; MILLER, J. D. Germplasm diversity among four sugarcane species for sugar composition. **Crop Science** 42: 958-964, 2002.

THAKURIA, D.; TALUKDAR, N. C.; GOSWAMI, C.; HAZARIKA, S.; BORO, R. C.; KHAN, M. R. **Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam**. [S.l.: s. n.], 2004. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/24109284>>. Acesso em: 5 out. 2020.

TRIVELIN, P. C. O.; LARA, C. W.; VICTORIA, R. L.; REICHARDT, K. Evaluation of a ¹⁵N plot design for estimating plant recovery of fertilizer nitrogen applied to sugar cane. **Scientia Agricola**, v. 51, p. 226-234, 1994.

USDA United States Department of Agricultura - Foreign Agricultural Service. **Brazil Sugar Annual USDA**. [S. l.: s. n.], 2021.

URQUIAGA, S. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** v. 38, p. 407-414, 2014.

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

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S. E.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, p. 105-114, 1992.

VIEIRA-MEGDA, M. X.; MARIANO, E.; LEITE, J. M.; FRANCO, H. C. J.; VITTI, A. C.; MEGDA, M. M.; KHAN, S. A.; MULVANEY, R. L.; TRIVELIN, P. C. O. Contribution of fertilizer nitrogen to the total nitrogen extracted by sugarcane under Brazilian field conditions. **Nutrient Cycling and Agroecosystems**, v. 10, p. 241-257, 2015.

WANG, X.; LUO, S.; CHEN, Y.; ZHANG, R.; LEI, L.; LIN, K.; QIU, C.; XU, H. Potential of *Miscanthus floridulus* associated with endophytic bacterium *Bacillus cereus* BL4 to remediate cadmium contaminated soil. **Science Total Environment** v. 20, artigo 857(Pt 1):159384, 2023. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.159384. 2022.

YEOH, Y. K., PAUNGFOOLONHIENNE, C., DENNIS, P. G., ROBINSON, N., RAGAN, M. A., SCHMIDT, S., HUGENHOLTZ, P. The core root microbiome of sugarcane cultivated under varying nitrogen fertilizer application. **Environmental Microbiology** v. 18, p. 1338-1351, 2016.