

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

TESE

**Uso de Inoculante Polimérico contendo Bactérias
Diazotróficas na Cultura da Cana-de-açúcar**

Marinete Flores da Silva

2009



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

**USO DE INOCULANTE POLIMÉRICO CONTENDO BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS NA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR**

MARINETE FLORES DA SILVA

Sob a Orientação da Pesquisadora
Dra. Veronica Massena Reis

e Co-orientação dos Pesquisadores
**Dr. Gustavo Ribeiro Xavier e
Dra. Norma Gouveia Rumjanek**

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências em
Agronomia, Área de Concentração
em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ.

Fevereiro de 2009

633.61

S586u

T

Silva, Marinete Flores da, 1972-

Uso de inoculante polimérico contendo bactérias diazotróficas na cultura da cana-de-açúcar / Marinete Flores da Silva - 2009.

80 f. : il.

Orientador: Veronica Massena Reis.

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

Bibliografia: f. 63-75

1. Cana-de-açúcar - Cultivo - Teses. 2. Cana-de-açúcar - Inoculação - Teses. 3. Nitrogênio - Fixação - Teses. 4. Cana-de-açúcar- Adubos e fertilizantes - Teses. I. Reis, Verônica Massena, 1963-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

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

MARINETE FLORES DA SILVA

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo, como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** em Agronomia.

TESE APROVADA EM 13/02/2009

Veronica Massena Reis. Dra. Embrapa Agrobiologia
Orientadora

Jean Luís Simões. Dr. Embrapa Agrobiologia

Luis Henrique de Barros Soares. Dr. Embrapa Agrobiologia

Eduardo Lima. Dr. UFRRJ

Heroldo Weber. Dr. UFPR

DEDICATÓRIA

Á pequena e amada CAMILA

Razão maior para superar todos os desafios...

Como quis que você existisse!

AGRADECIMENTOS

A ciência, com seus respectivos cientistas, por sua inquietação e incansável sede de saber, transformando e melhorando o planeta e a humanidade.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos, pelo carinho constante.

Ao meu marido Elias pelo apoio, companheirismo e inúmeras contribuições com suas experiências na aérea científica e na vida.

À Dra. Veronica Massena Reis pela orientação, ensinamentos e críticas muito oportunas. Sou grata pela oportunidade do desafio proposto. Muito obrigada.

À Dra. Vera Lúcia Divan Baldani, pela sagacidade e alegria no dia-a-dia do trabalho no laboratório.

Ao Dr. Segundo Sacramento Urquiaga pela imensa colaboração nos trabalhos de campo e pelo apoio. Muito obrigada.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa concedida. Fiquei muito honrada por ter conquistado esta bolsa, pois ser bolsista do CNPq era um desejo e me fez sentir capaz.

Ao CPGA-CS, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, pela oportunidade da formação concedida. Foi mais uma realização, pertencer ao corpo discente deste curso.

À Prof.^a Lúcia Helena Cunha dos Anjos pelos ensinamentos, através das disciplinas ministradas, convívio e pela valiosa colaboração na correção do formato desta Tese.

À Embrapa-Agrobiologia, pelo apoio logístico para realização dos trabalhos e orientação, incluindo todos os funcionários, principalmente os do campo experimental e casa-de-vegetação, pois são peça chave para o nosso melhor desempenho. Obrigada por tudo Embrapa!!!

Ao Geraldo Baêta, pelas consideráveis ajudas, sempre disposto a nos auxiliar em absolutamente tudo. É um amigo e tanto!

Ao bolsista José Marcos Leite pela valiosa colaboração nos trabalhos de campo.

A todos os bolsistas do Laboratório de Gramíneas. Especialmente para aqueles que estiveram muito presentes, tornando nosso convívio alegre e polêmico. Vocês são demais: Salomão, Daniele, Liamara, Ricardo e Joilson.

E aos demais bolsistas do centro, com os quais pude conviver por um considerável e importantíssimo período da vida.

Aos Laboratoristas do prédio novo e especialmente para o Lúcio, Wilson e Luís Carlos.

Aos funcionários Claudinho, uma pessoa incrível, incansável e Rosinaldo que muito nos ajuda em nossos trabalhos.

BIOGRAFIA

Nascida aos 13 dias de junho de 1972 no município de Paracambi, RJ, filha de Milton Flores da Silva e Terezinha de J. da Silva Benevenuto, concluiu o ensino fundamental no Colégio Estadual Presidente Rodrigues Alves em 1987 e o ensino médio concluiu no Colégio Cenecista Paracambi em 1991. Ingressou no curso de Eng^a Agrônoma da UFRRJ e de 1995 a 1997 fez estágio no departamento de Solos da UFRRJ. De 1997 a 1999 fez estágio no laboratório de Micorrizas da Embrapa-Agrobiologia. Concluiu o curso de Agronomia em 1999 e de 1999-2001 fez estágio no laboratório de Gramíneas no projeto Pronex também pela Embrapa – Agrobiologia. De 2001 a 2003 fez Residência em Agronomia pela UFRRJ e Embrapa – Agrobiologia. De 2003 a 2005 fez o Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo pela UFRRJ. Em 2005 iniciou o Doutorado em Agronomia - Ciência do Solo pela UFRRJ concluindo-o em 2009.

RESUMO

SILVA, Marinete Flores. Uso de Inoculante Polimérico contendo Bactérias Diazotróficas na Cultura da Cana-de-Açúcar 2009 80f Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2009.

O objetivo foi avaliar a eficiência de inoculantes poliméricos a base de carboximetilcelulose (CMC) e amido como veículo de inoculação das bactérias diazotróficas endofíticas na cana-de-açúcar. Para isso foram realizados dois testes de sobrevivência das bactérias em laboratório e cinco experimentos, sendo dois na casa-de-vegetação e três no campo experimental da Embrapa-Agrobiologia, Seropédica-RJ. Foram testadas as variedades RB72454 e RB867515, sendo a primeira selecionada com potencial para fixação biológica de nitrogênio e a segunda, variedade recém lançada. As bactérias utilizadas foram BR11281, BR11335, BR11504, BR11145, BR11366. Como veículos poliméricos foram testadas uma proporção 60:40 de CMC e amido em concentrações IPC 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 gL⁻¹ compatibilizadas e não compatibilizadas com MgO 2% e IPC 2,2 não compatibilizada. Nos ensaios de laboratório foi avaliada a sobrevivência das bactérias nos veículos poliméricos; nos experimentos na casa-de-vegetação foi avaliado os inoculantes poliméricos contendo bactérias aplicadas em mini toletes da variedade RB72454 de cana; nos experimentos a campo foram avaliados os inoculantes poliméricos contendo as bactérias aplicadas nos toletes das variedades de cana-de-açúcar. Os resultados mostraram, no primeiro ensaio de laboratório, que o veículo polimérico IPC 0,8 compatibilizado ou não, apresentou sobrevivência das estirpes RB11281 e BR11145 ao redor de 10⁹ células mL⁻¹ até 120 dias de armazenamento. No segundo ensaio de laboratório o veículo polimérico IPC 0,8 não compatibilizado apresentou sobrevivência das estirpes individualizadas ao redor de 10⁸ células até 15 dias e no polímero IPC 2,2 a sobrevivência das células foi ao redor de 10⁸ até 60 dias de armazenamento. Nos experimentos na casa-de-vegetação as plântulas da variedade RB72454 apresentaram resposta quando inoculadas com os polímeros, onde foram observados aumentos médios de até 181% na produção de fitomassa seca e aumentos médios no nitrogênio total de 122% em relação ao controle não inoculado. Nos experimentos de campo foram observados efeitos positivos do uso dos polímeros contendo as bactérias sobre a produtividade na cana-planta, das variedades RB72454 e RB867515 de 50 Mg ha⁻¹ e 30 Mg ha⁻¹ respectivamente, em relação ao controle absoluto e na produção de fitomassa seca da variedade RB867515 um aumento de 18 Mg ha⁻¹ em relação ao controle. Na cana-soca a inoculação proporcionou um aumento sobre a produtividade de 24 Mg ha⁻¹ para a RB72454 em relação ao controle absoluto sendo estatisticamente igual ao tratamento adubado com 120 kg N ha⁻¹ indicando a existência da interação entre os fatores testados.

Palavras-chave: Poacea. Inoculante polimérico. Bactérias endofíticas.

ABSTRACT

SILVA, Marinete Flores da. **Use of Polymeric Inoculant with Diazotrophic Bacteria to Sugarcane Crop**. 2009 80f Tese (Doctor in Agronomy, Soil Science). Institute of Agronomer, Department of Soil, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2009.

The aim of this work was to evaluate the efficiency of polymer-based inoculants on carboxymethylcellulose (CMC) and starch as a vehicle for inoculation of endophytic diazotrophic bacteria in sugar cane. For that, two tests were performed to assess bacteria survival under laboratory conditions, and five inoculation trials, two in greenhouse and three in the field localized at Embrapa-Agobiologia, Seropédica-RJ. The varieties used were RB72454 and RB867515, the former was selected with the potential to BNF and the latter, a newly released variety. The bacteria used were BR11281, BR11335, BR11504, BR11145, BR11366. As polymeric vehicles, one tested different proportions IPC 0.2, 0.4, 0.6 and 0.8 g·L⁻¹ (CMC/starch ratio) compatibilised or not with 2% MgO and IPC 2.2 without compatibilisation. In the laboratory tests, the survival of bacteria in polymeric vehicles was evaluated. In the greenhouse conditions, the effect of the polymeric inoculant containing bacteria applied in the setts of RB72454 was evaluated. In the field experiments the effect of inoculants polymer containing the bacteria applied in the setts of two varieties of sugarcane were evaluated. The results of the first laboratory tests showed that the treatments with polymeric vehicle IPC 0.8 with or without compatibilisation maintained the survival of mixed strains BR11281 and BR11145 around 10⁹ cells mL⁻¹ per 120 days of storage. However, in the second laboratory tests the treatment with the polymeric vehicle IPC 0.8 maintained survivals of individual strains to around 10⁸ cells per 15 days and the polymer IPC 2.2 to survival of the cells was around 10⁸ per 60 days of storage. Under greenhouse conditions, the treatments inoculated with polymers vehicles increased the dry matter and total nitrogen of the plantlets by 181% and 122%, respectively, in comparison with the treatment without inoculation for RB72454 variety. In the field experiments, the treatment of inoculation with polymers increased productivity in plant-cane to 50 Mg ha⁻¹ and 30 Mg ha⁻¹, respectively for RB72454 and RB867515 varieties in comparison with absolute control. The treatment of inoculation with polymeric vehicles increased the dry matter in the cane-plant of 18 Mg ha⁻¹ in comparison with absolute control. In the ratoon crop inoculation with polymers increased productivity in 24 Mg ha⁻¹ for RB72454. These increments observed were statistically equal to the treatment fertilized with 120 kg N ha⁻¹ indicating existence of interaction between factors tested.

Key words: Poacea. Polymer inoculant. Endophytic bacteria.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A Cultura da Cana-de-Açúcar	3
2.2 Adubação Nitrogenada em Cana-de-açúcar	4
2.3 Bactérias Diazotróficas	5
2.4 Fixação Biológica do Nitrogênio	6
2.5 Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal	8
2.6 Inoculantes Agrícolas	9
2.6.1 Breve histórico	9
2.6.2 Definições	10
2.6.3 Fatores favoráveis	10
2.6.4 Características desejáveis para a comercialização	11
2.6.5 Formas disponíveis no mercado	11
2.6.6 Alternativas viáveis	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
PARTE I : Laboratório	13
3.1 Sobrevivência dos Microrganismos Endofíticos em Mistura nos Polímeros como Veículos de Inoculação	13
3.1.1 Preparo dos polímeros	13
3.1.2 Sobrevivência dos microrganismos no veículo polimérico líquido	13
3.1.3 Sobrevivência dos microrganismos no veículo polimérico gel	13
3.2 Preparo dos Inoculantes	14
3.2.1 Microrganismos utilizados	14
3.2.2 Preparo do Pré-inóculo bacteriano	14
3.2.3 Inóculo bacteriano	14
3.2.4 Inoculantes	14
PARTE II: Experimentos na casa-de-vegetação	15
3.3 Experimento I - Aplicação do Inóculo Misto, Polímero e a Mistura dos dois contendo Microrganismos Endofíticos nas Plântulas de Cana-de-açúcar	15
3.3.1 Condução do experimento	15
3.3.2 Produção de fitomassa seca total e acúmulo de nitrogênio total nas plântulas	15
3.3.3 Colonização das plântulas pelos microrganismos inoculados	15
3.4 Experimento II - Aplicação dos Polímeros contendo Microrganismos Endofíticos nas Plântulas de Cana-de-açúcar	16
3.4.1 Preparo dos inoculantes	16
3.4.2 Condução do experimento	16
3.4.3 Produção de fitomassa seca total e acúmulo de nitrogênio total nas plântulas	16
3.4.4 Colonização das plântulas pelos microrganismos inoculados	16
3.4.5 Análises estatísticas	16
PARTE III: Experimentos de campo	17
3.5 Experimento I – Aplicação dos Microrganismos Endofíticos na Cana-planta e Aplicação do Polímero contendo Microrganismos Endofíticos na Reinoculação da Cana-soca Cultivadas no Planossolo	17
3.5.1 Preparo dos inoculantes	17
3.5.2 Inoculação	17
3.5.3 Reinoculação	17

3.5.4	Localização, características do solo e delineamento da área experimental.....	18
3.5.5	Colheitas, produtividade de colmos, produção de fitomassa seca e acúmulo de nitrogênio das variedades de cana-de-açúcar.....	19
3.6	Experimento II – Aplicação dos Inoculantes Poliméricos contendo Microrganismos Endofíticos na Cana-de-açúcar Cultivada no Planossolo	20
3.6.1	Preparo dos inoculantes.....	20
3.6.2	Inoculação	20
3.6.3	Localização, características do solo e delineamento da área experimental.....	20
3.6.4	Colheita, produtividade de colmos, produção de fitomassa seca e acúmulo de nitrogênio das variedades de cana-de-açúcar.....	21
3.7	Experimento III – Aplicação dos Polímeros contendo Microrganismos Endofíticos na Cana-de-açúcar Cultivada no Argissolo	21
3.7.1	Preparo dos inoculantes.....	21
3.7.2	Inoculação	21
3.7.3	Localização, características do solo e delineamento da área experimental.....	22
3.7.4	Colheitas, produtividade de colmos e produção de fitomassa seca total de variedades de cana-de-açúcar.....	22
3.7.5	Análises estatísticas.....	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
	PARTE I: Laboratório.....	23
4.1	Sobrevivência dos Microrganismos Endofíticos em Mistura nos Polímeros como Veículos de Inoculação	23
4.2	Sobrevivência dos Microrganismos Endofíticos Individualizados nos Polímeros como Veículos de Inoculação	25
	PARTE II: Experimentos na casa-de-vegetação	28
4.3	Experimento I - Aplicação do Inóculo misto, Polímero gel e a Mistura dos dois contendo Microrganismos Endofíticos nas Plântulas de Cana-de-açúcar.....	28
4.3.1	Produção de fitomassa seca total e acúmulo de nitrogênio total nas plântulas	28
4.3.2	Colonização dos microrganismos endofíticos inoculados nas plântulas de cana-de-açúcar	30
4.4	Experimento II - Aplicação do Inóculo Misto e dos Polímeros contendo Microrganismos Endofíticos nas Plântulas de Cana-de-açúcar.....	35
4.4.1	Produção de fitomassa seca total e acúmulo de nitrogênio total nas plântulas	35
4.4.2	Colonização dos microrganismos endofíticos inoculados nas plântulas de cana-de-açúcar	36
	PARTE III: Experimentos de campo	38
4.5	Experimento I - Aplicação de Microrganismos Endofíticos na Cana-planta e do Polímero contendo Microrganismos Endofíticos na Reinoculação da Cana-soca Cultivadas no Planossolo.....	38
4.5.1	Produtividade de colmos de cana-de-açúcar	38
4.5.2	Produção de fitomassa seca de cana-de-açúcar	40
4.5.3	Acúmulo de nitrogênio na cana-de-açúcar.....	43
4.6	Experimento II - Aplicação dos Polímeros contendo Microrganismos Endofíticos na Cana-de-açúcar Cultivada no Planossolo.....	46
4.6.1	Produtividade de colmos de cana-de-açúcar após a inoculação.....	46
4.6.2	Produção de fitomassa seca e acúmulo de nitrogênio na cana-de-açúcar após a inoculação	47
4.7	Experimento III – Aplicação dos Polímeros contendo Microrganismos Endofíticos na Cana-de-açúcar Cultivada no Argissolo	50
4.7.1	Produtividade de colmos frescos de cana-de-açúcar após a inoculação.....	50
4.7.3	Acúmulo de nitrogênio na cana-de-açúcar após a inoculação.....	55
4.8	Análise Conjunta dos Experimentos de Inoculação dos Microrganismos Endofíticos a Campo.....	59
5	CONCLUSÕES.....	61
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
7	REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
8	ANEXO.....	76

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil apresenta-se como o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido por países de grande expressão como a Índia, China, Paquistão e México. No Brasil esta cultura proporciona a geração de cerca de 4 milhões de empregos diretos e indiretos, movimentando em torno de 41 bilhões de reais e recolhendo cerca de 12 bilhões de reais em impostos e taxas (Jornalcana, 2008).

Esta cultura apresenta grande importância no cenário econômico mundial, pois da sua industrialização são obtidos o açúcar e o álcool, além de ser referência para os demais países produtores destes produtos. Possui múltipla aplicabilidade podendo ser empregada sob a forma de forragem, para alimentação animal, ou como matéria-prima para a fabricação de rapadura, melado, aguardente e como derivados do açúcar, existem os produtos da sucroquímica, de onde se pode produzir glicose, frutose, ácidos, sorbitol e sucralose, entre outros. De processos fermentativos, podem-se obter acetonas, antibióticos (penicilina, tetraciclina), enzimas industriais (amilases, proteases), vitaminas (C, B2, B12), aminoácidos (lisina, fenilalanina) e insumos biológicos para a agricultura como os bioinseticidas e fertilizantes (Brasil, 2008). O etanol tem impulsionado o aumento da produção da cultura, com conseqüente aumento de área produzida, um biocombustível sustentável e reconhecidamente o mais benéfico na redução da emissão de gases causadores do efeito estufa, responsável pelo aquecimento global. A cultura apresenta melhor balanço energético e menor custo de produção, fazendo com que se torne uma matriz de energia renovável e que vem se consolidando cada vez mais como a cultura que pode proporcionar uma alternativa energética em substituição ao petróleo.

Os adubos minerais tiveram seu uso intensificado a partir da segunda guerra mundial e desencadeou elevada aplicação no setor agrícola com o advento da revolução verde, gerando os pacotes tecnológicos que impulsionaram o uso em larga escala de nitrogênio mineral, sem preocupação com os custos ambientais e tornando o agricultor dependente destes pacotes.

A aplicação de fertilizantes nitrogenados geralmente implica em perdas por lixiviação, volatilização e contaminação dos lençóis freáticos devido à liberação de nitrato e por fim na elevação do custo final da produção. E com o uso indiscriminado, estes fertilizantes provocaram elevado custo ambiental, principalmente no caso do nitrogênio, que é obtido do petróleo, recurso natural não renovável. A adubação nitrogenada tem destaque como uma das práticas culturais de maior demanda para a cana-de-açúcar, e os estudos sobre nitrogênio apresentam resultados variáveis para a cana-planta e mais constantes na cana-soca.

O uso de insumos biológicos visando reduzir a aplicação de adubos químicos agressores do ambiente está intimamente relacionado com a crescente demanda da sociedade pela produção de alimentos, associada à manutenção da qualidade ambiental que traz para este século um grande desafio que é a integração dos fatores biológicos nos sistemas de produção. Estudos de inoculação de bactérias diazotróficas em diferentes gramíneas entre elas a cana-de-açúcar, têm mostrado potencial para a produção de inoculantes com base nestes microrganismos, apesar de o efeito positivo estar mais relacionado à produção de fitohormônios do que à fixação biológica de nitrogênio propriamente dita. O gênero *Azospirillum* é um exemplo da possibilidade de aplicação destes microrganismos em culturas de interesse agrícola, sendo o mais estudado. Vários trabalhos foram conduzidos em diferentes países do mundo por mais de 20 anos com experimentos de inoculação de *Azospirillum* em campo e demonstram claramente o aumento da produção de culturas de importância agrônômica em diferentes solos e climas, com sucesso da ordem 60-70% e incrementos estatisticamente significantes em torno de 5-30% na produção (Okon &

Labandera-Gonzalez,1994), de modo que inoculantes a base de *Azospirillum* são comercializados.

As associações entre bactérias diazotróficas e as gramíneas, como cana-de-açúcar, arroz, milho, trigo, sorgo, entre outras, podem ser utilizadas como alternativa sustentável e economicamente viável no sentido da substituição parcial das adubações nitrogenadas. Estas associações não promovem formação de estruturas diferenciadas visíveis, como na simbiose entre *Rhizobium* leguminosas.

Estudos realizados em cana-de-açúcar têm mostrado que a utilização destes microrganismos pode fornecer quantidades significativas de nitrogênio, chegando a suprir cerca de 60 a 70% da demanda do nutriente pela planta, através da fixação biológica de nitrogênio. Entretanto a contribuição da FBN é bastante variável entre as variedades (Yoneyama et al., 1997, Biggs et al 2002).

Esta Tese está baseada na seguinte hipótese: o uso de veículo inoculante com diferentes propriedades físicas e químicas pode proporcionar respostas diferenciadas quanto à manutenção da população dos microrganismos diazotróficos de interesse, e estes poderão contribuir de forma diferenciada para a nutrição de plantas de cana-de-açúcar, reduzindo a necessidade de aplicação de fertilizantes nitrogenados o que conseqüentemente contribuirá para a adoção desta tecnologia simples para uso agrícola. Os objetivos foram:

a - Testar veículos poliméricos líquidos para verificar qual ou quais podem proporcionar maior viabilidade, no período de armazenamento de 120 dias, das estirpes BR11281 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, BR11335 de *Herbaspirillum seropedicae*, BR11504 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, BR11145 de *Azospirillum amazonense* e BR11366 de *Burkholderia tropica* em mistura, responsáveis também pela fixação biológica de nitrogênio, associadas à cana-de-açúcar;

b - Testar o veículo polimérico selecionado, no objetivo 1, o polímero gel e o inóculo misto para verificar qual ou quais podem proporcionar maior viabilidade, no período de armazenamento de 90 dias das estirpes individualizadas nos veículos;

c - Inocular e monitorar a população dos microrganismos inoculados nas plântulas de cana-de-açúcar;

d - Avaliar a aplicação dos inoculantes poliméricos contendo microrganismos endofíticos, em experimentos de curto prazo, sobre o acúmulo de fitomassa, brotações, altura e nitrogênio total nas plântulas cana-de-açúcar;

e - Avaliar a inoculação dos microrganismos endofíticos na cana-planta e utilização do inoculante polimérico gel IPC 2,2 na reinoculação da cana-soca sobre a produtividade dos colmos frescos, produção de fitomassa seca total e acúmulo total de nitrogênio na cana-de-açúcar e

f - Avaliar a utilização dos inoculantes poliméricos gel IPC 2,2 e o IPC 0,8 na forma líquida contendo microrganismos endofíticos, sobre a produtividade de colmos, fitomassa seca total e acúmulo total de nitrogênio na cana-de-açúcar.

O sucesso dessa tecnologia está relacionado ao eficiente estabelecimento da associação entre a planta e a bactéria, ação esta resultante de fatores como, condições edafoclimáticas, interação dos microrganismos de interesse com a biota do solo, estirpes selecionadas e por fim inoculantes de elevada qualidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Cultura da Cana-de-Açúcar

Originária da Nova Guiné, a cana-de-açúcar foi a primeira atividade agrícola no Brasil que atualmente é seu maior produtor mundial, seguido por países de expressão como Índia, China, Paquistão e México. Foi trazida para o Brasil por volta de 1532 por Martim Afonso de Sousa e passou a ter, desde então, significativa importância para o país. (Brasil, 2008).

A cana-de-açúcar é uma gramínea semiperene, membro da família *Poaceae* (anteriormente denominada Gramineae), tribo Andropogoneae e gênero *Saccharum*, sendo este gênero composto principalmente por *Saccharum officinarum* L., *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense* e *S. barberi*.

Até a década de 70 eram cultivadas entre cinco a seis espécies de cana-de-açúcar, sendo a mais difundida comercialmente no mundo a *Saccharum officinarum* L., ou cana nobre (Nogueira, 2001). Entretanto o número de variedades de cana sofreu enorme ampliação, pois atualmente existe cerca de 500 variedades produzidas através do melhoramento vegetal da cana, o que está diretamente relacionado com o crescimento agrícola da cultura sendo considerado como uma das medidas de avanço da agricultura no país (Nóbrega e Dornelas, 2006).

A cultura apresenta cerca de 8,0 milhões de hectares cultivados (Ibge, 2009), representando uma extensa área territorial, compreendida entre os paralelos 35° de latitudes Norte e Sul, apresentando melhor rendimento em climas tropicais, com uma produção brasileira que supera a marca de 387 milhões de toneladas, volume processado em 306 usinas - das quais 236 no Centro-Sul - e que faz do país o maior produtor mundial. A cultura encontra condições climáticas favoráveis para se desenvolver no Brasil (Unica, 2007).

Quase todos os estados brasileiros produzem cana, muito embora o maior estado produtor ainda seja São Paulo, com cerca de 60% da produção nacional.

O clima ideal para a produção da cana-de-açúcar é constituído por duas estações distintas: uma quente e úmida que visa proporcionar a germinação, perfilhamento e desenvolvimento vegetativo; seguida de outra fria e seca, para proporcionar a maturação e conseqüente acúmulo de sacarose.

Atualmente, a cana-de-açúcar tem sido plantada em três épocas distintas, fevereiro-maio, junho-agosto e setembro-novembro denominados respectivamente, cana de ano e meio, cana de inverno e cana de ano.

A principal destinação da cana-de-açúcar cultivada no Brasil é a fabricação de açúcar e álcool. A cana-de-açúcar é a matéria-prima que permite os menores custos de produção de açúcar e álcool, devido à energia consumida no processo ser proveniente dos seus próprios resíduos e pode apresentar ciclo de cinco anos, cinco cortes, produtividade de 85 Mg ha⁻¹ (120-65), rendimento de açúcar de 138 kg Mg⁻¹ e rendimento de álcool de 82 L Mg⁻¹ (Brasil, 2008).

No Brasil, sendo a cultura bem manejada pode contribuir com a redução de impactos ambientais como aquecimento global pela menor liberação de gases e aumento do seqüestro de carbono, constituindo-se num ciclo fechado, onde o CO₂ eliminado pela queima do álcool combustível (energia limpa) é consumido pelas plantas durante a fotossíntese. Por possuir metabolismo fotossintético C₄, a cana-de-açúcar, é considerada de alta eficiência na conversão de energia radiante em energia química, com taxas fotossintéticas calculadas em até 100 mg de CO₂ fixado por dm² de área foliar por hora ano (Rodrigues, 1995).

Nóbrega & Dornelas (2006) citam que por ser a cana sensível à luz (fotoperíodo) e responsiva a flutuações ambientais, mesmo de pequena magnitude, os genótipos apresentam comportamento diferenciado nas várias regiões. Quando genótipos de cana são avaliados em ambientes contrastantes, freqüentemente ocorrem variações no posicionamento relativo dos mesmos. Deste modo a interação entre genótipo e ambiente assume grande importância.

As maiores produtividades tem sido alcançadas atualmente com variedades como a RB72454, SP813250, SP911049, SP832847, IAC873396, RB867515 e as mais novas variedades lançadas pelo Programa Cana – IAC: IACSP933046, IACSP942101, IACSP942094, IACSP944004 (Landell et al. 2006).

2.2 Adubação Nitrogenada em Cana-de-açúcar

O ciclo do N apresenta uma dinâmica complexa, por sofrer várias transformações, por sua mobilidade no sistema solo-planta e os fertilizantes nitrogenados aplicados no solo passam por uma série de transformações químicas e microbianas, que podem resultar em perdas (Vitti et al, 2007). Stipp & Prochnow, 2008 relatam que os fertilizantes são primordiais para impulsionar a produção de alimentos no mundo, sendo o Brasil ocupante da quarta posição entre os maiores consumidores desses insumos e participando com apenas 2% na produção mundial. Dentre os fertilizantes nitrogenados, a uréia é o que apresenta o maior potencial de perdas de NH₃ por volatilização. Entretanto, alternativas de manejo propostas para reduzir ou mesmo eliminar as perdas de N por volatilização está a incorporação da uréia ao solo, a 0,05-0,10 m de profundidade seguido de irrigação ou chuva que podem favorecer maior incorporação do N ao solo.

De acordo com a literatura relacionada ao manejo do nitrogênio na cana-de-açúcar, existe falta de resposta da cana-planta ao nutriente, enquanto na cana-soca esse efeito é contrário, havendo resposta da planta a adução mineral nitrogenada. Na cana-planta, a adubação nitrogenada é com freqüência utilizada em diversas regiões produtoras de cana-de-açúcar. Embora, os efeitos da referida prática no rendimento agrícola seja discutível (Azeredo, 1986).

Vitti (2005) relata que a adubação nitrogenada varia de cana-planta para cana-soca, devido ao fato da cana-planta apresentar associação de bactérias fixadoras de nitrogênio do ar, em razão da presença de açúcar no tolete, além da mineralização da matéria orgânica do solo, dos restos culturais da própria cana, do sistema radicular mais vigoroso, contribuição do N contido no colmo-semente, lixiviação sofrida pelo elemento, enquanto na cana-soca não há mais associação entre as bactérias fixadores de N₂ e as raízes, devido à morte do sistema radicular e não mais presente o tolete sendo necessário à adubação nitrogenada. Estudos mostram que a extração do N pela cultura é grande, cerca de 100 a 130 kg ha⁻¹ de N, e as doses aplicadas como fertilizantes são de apenas 30 a 60 kg ha⁻¹ de N. Estima-se que possa haver resposta à adubação nitrogenada em 30% dos plantios de cana (Rossetto & Dias, 2005).

Azeredo et al. (1986) com o objetivo de avaliar a resposta das variedades CB45-3 e NA56-79 de cana-planta a quatro doses de nitrogênio 0, 60, 120 e 180 kg N ha⁻¹ aplicados de uma só vez no sulco de plantio e seis fracionamentos, sendo dois para cada dose, com aplicações no plantio, aos quatro meses e aos oito meses nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia verificaram que houve resposta da cana-planta a adubação mineral nitrogenada em 22% dos 135 ensaios, e que a aplicação do fertilizante totalmente no plantio, foi mais eficiente que o parcelamento.

Lima et al. (2006) estudando o efeito da adubação mineral (nitrogênio, fósforo e potássio) sobre a quantidade de perfilhos, teor de sacarose e produção de colmo das cultivares CB 45-3, NA 56-79 e SP 79-1011 de cana-de-açúcar verificaram que a adubação mineral com nitrogênio, fósforo e potássio não proporcionou efeito na melhoria da produção de colmo, no teor de sacarose e no perfilhamento das cultivares de cana-de-açúcar, realizada em agricultura

de sequeiro e que as cultivares de cana-de-açúcar NA 56-79 e SP 79-1011 foram as que apresentaram melhores respostas em produtividade nas condições do experimento.

2.3 Bactérias Diazotróficas

As bactérias diazotróficas de vida livre, capazes de sobreviver no solo e também colonizarem plantas desde que o ambiente seja favorável à proliferação celular, foram as primeiras a serem reconhecidas, como é o caso de *Beijerinckia fluminensis* e *Beijerinckia indica*, isoladas da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar crescidas em solos tropicais, tendo sido demonstrado o seu potencial em se associar com gramíneas (Döbereiner & Ruschel, 1958; Döbereiner, 1959). Estas bactérias colonizam preferencialmente o rizoplano e a rizosfera de plantas de cana-de-açúcar, em que os exudados, principalmente açúcares, estão envolvidos nesta associação, pois as bactérias são encontradas principalmente em áreas onde estes compostos são liberados (Döbereiner & Alvahydo, 1959).

Bactérias diazotróficas associativas como os *Azospirillum* apresentam atualmente sete espécies e crescem amplamente na rizosfera de gramíneas (Kennedy & Tchan, 1992) Também são capazes de penetrar nas raízes e crescer endofiticamente nos espaços intercelulares (Sumner, 1990). *A. brasilense* e *A. lipoferum* são frequentemente encontradas colonizando a maioria das plantas de regiões tropicais e temperadas, tendo sido isoladas em gramíneas crescidas no Ártico. As espécies citadas e o *Azospirillum amazonense* têm sido isolados em milho, arroz, cana-de-açúcar, sorgo, palmeiras e fruteiras (Reis, 2006). Na cana-de-açúcar tanto o *A. brasilense* quanto o *A. lipoferum* são encontrados em raízes, colmos e folhas enquanto *Azospirillum amazonense* é encontrado em raízes e colmos (Reis et al., 2000).

Bactérias diazotróficas endofíticas como os *Herbaspirillum* apresentam atualmente cerca de onze espécies. Entretanto a primeira espécie descrita foi *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani et al., 1986) isolada da rizosfera, rizoplano e raízes desinfestadas de arroz, milho, sorgo e também isolada de raízes, folhas e colmos de cana de açúcar cultivada no Brasil (Baldani et al., 1996a) e na Austrália (Boddey et al., 1998), dendezeiro e pupunheira (Ferreira et al., 1995), bananeira (Cruz et al., 2001), capim elefante (Reis et al., 2000) e arroz inundado (Rodrigues, 2004; Brasil, 2005). *H. rubrisubalbicans* (Gillis et al., 1991; Baldani et al., 1996b) tem sido encontrada em associação com cana-de-açúcar e raízes de *Digitaria insularis* crescida no interior dos canaviais (Olivares et al., 1996) em capim elefante (Reis et al., 2000), em frutíferas como abacaxizeiros e bananeiras (Cruz et al., 2001). *H. frisingense* (Kirchhof et al., 2001) foi isolada de amostras de tecido de raízes e colmos de diversos genótipos de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) coletados no Brasil, e das gramíneas *Spartina pectinata*, *Miscanthus sinensis* e *M. sacchariflorus*, coletadas na Alemanha (Kirchhof et al., 2001), *H. lusitanum* (Valverde et al., 2003) foi isolada de nódulos de raízes de feijão coletados em Portugal.

Bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Gluconacetobacter* foram isoladas de raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar cultivada nos estados de Alagoas, Pernambuco e Minas Gerais (Cavalcante & Döbereiner, 1988), *Pennisetum purpureum* e batata doce (Paula et al. 1991), de café (Jimenez-Salgado et al, 1997) e também de variedades de cana-de-açúcar de países como Austrália (Li & Macrae, 1991), Cuba (Fuentes-Ramirez et al., 1993), Argentina (Dong et al., 1994), México (Bellone et al., 1997), novos isolados têm sido obtidos de arroz e chá na Índia (Dutta & Gachhui, 2006; Muthukumarasamy et al., 2005). Esta bactéria ocorre em números elevados no interior do colmo da cana-de-açúcar e é a mais estudada nesta cultura, possibilita a fixação de nitrogênio, mesmo na presença de nitrato absorvido do solo, já que não possui a redutase do nitrato. Foi encontrada em raízes, colmos, palhiço, solo da rizosfera e seiva do xilema de cana-de-açúcar (Reis, 1991; Perin, 2003). Além de fixar nitrogênio, estas bactérias produzem hormônios de crescimento como auxina e giberelina Fuentes-Ramirez et al. (1993); Madhaiyan et al. (2006). Até o momento foram

descritos 10 gêneros, embora somente três gêneros sejam fixadores de nitrogênio que são *Gluconacetobacter*, *Acetobacter* e mais recentemente *Swaminathania* (Pedraza, 2008).

A população nativa ou inoculada de *G. diazotrophicus* presente em plantas de cana-de-açúcar, diminui drasticamente com o avançar da idade da planta (Perin, 2003) e foi relatado também que a aplicação de nitrogênio afetou severamente *G. diazotrophicus*, provocando redução do número populacional em variedades de cana-de-açúcar cultivadas na Índia (Muthukumarasamy, 1999a). Com a técnica de imunocaptura em amostras de solo de canaviais e cafezal foi possível o isolamento de bactérias do gênero *Gluconacetobacter* de amostras de solo das plantas de café, mas não de amostras de solo de canaviais (Santos et al., 2006).

Bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Burkholderia* (Yabuuchi et al., 1992; Baldani et al., 1997) foram isoladas de arroz (Oliveira, 1992), mandioca (Balota, 1994), batata doce e posteriormente de cana-de-açúcar (Baldani et al., 1996b). São encontradas em associação com plantas da família das leguminosas, participando na formação de nódulos. As espécies *B. tuberum* e *B. phymatum* (Vandamme et al., 2002), foram isoladas de *Aspalathus carnosus*, na África do Sul e *Machaerium lunatum*, na Guiana Francesa. Entretanto existem diferenças entre as bactérias que nodulam plantas leguminosas, daquelas que se associam às não leguminosas (Vandamme et al., 2002). Outras espécies como *B. unamae* foi isolada de cana-de-açúcar, café e milho de diferentes localidades do México (Caballero-Mellado et al., 2004), *B. tropica* isolada de plantas de cana-de-açúcar no Brasil e África do Sul, solo nos EUA e milho (Reis et al., 2004) e *B. silvatlantica* sp, isolada de folhas de cana-de-açúcar e rizosfera de milho no Brasil (Perin et al., 2006). De amostras de cana-de-açúcar brasileiras e australianas foram obtidos vários isolados das espécies *B. tropica*, *B. kururiensis* e *B. caribensis* (Boddey, 2002).

As bactérias endofíticas apresentam afinidade pelo interior dos tecidos vegetais, o que lhes confere proteção contra altas taxas de oxigênio, inibitória para a atividade da enzima nitrogenase, e com fontes de carbono mais prontamente disponível atuando favoravelmente em relação à competição existente no solo (Olivares et al., 1996). A descoberta destes microrganismos, que colonizam em números elevados raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar e outras gramíneas, mudaram por completo o conceito de associações rizosféricas. Esta descoberta permitiu explicar o grande potencial da contribuição dos diazotrofos para o suprimento de nitrogênio às culturas de cana-de-açúcar, desde que os demais nutrientes e água não sejam fatores limitantes (Franco & Döbereiner, 1994) especialmente molibdênio, que é cofator da enzima nitrogenase responsável pela fixação biológica do nitrogênio, sendo, portanto componente chave (Boddey et al., 2001).

2.4 Fixação Biológica do Nitrogênio

Cerca de 78% do ar é constituído de N_2 e apesar da sua grande disponibilidade, as plantas não conseguem utilizá-lo, mas existem grupos filogenéticos de procariotos, altamente diversos que são capazes de expressar a enzima nitrogenase denominados diazotróficos, ou também conhecidos como bactérias fixadoras de nitrogênio (FBN) cuja capacidade de fixarem o nitrogênio atmosférico e este ser absorvido pelas plantas foi descrito pela primeira vez em 1888 (Reis et al., 2006).

Estima-se que a contribuição de nitrogênio fixado biologicamente seja de 139 milhões de Mg de N ano⁻¹, enquanto que a fixação química contribui com 49 milhões de Mg de N ano⁻¹ de modo que a substituição de fertilizantes químicos pela inoculação com bactérias que nodulam leguminosas do gênero *Bradyrhizobium*, nos campos de soja, representou uma economia de cerca de US\$ 3,3 bilhões para agricultura brasileira em 2006 (Moreira, 2008), principalmente em solos tropicais onde as perdas são mais elevadas constituindo-se assim num dos elementos mais limitantes para os vegetais.

Em plantas não leguminosas a fixação biológica do N₂ ocorre pelas bactérias diazotróficas em raízes, colmos e folhas de cereais como o milho, trigo, arroz, gramíneas forrageiras, palmeiras oleaginosas e cana-de-açúcar, entre outras. As primeiras observações feitas indicando interações, mais tarde chamadas associações, dos diazotróficos com plantas não leguminosas foram através de Beijerinck em 1925 sob o nome de *Spirillum lipoferum* e devido ao benefício da fixação de nitrogênio em leguminosas para a agricultura já bem estabelecida até o momento, seria esperado que a associação bactéria diazotrófica pudesse favorecer plantas não leguminosas na mesma intensidade (Dobbelaere, 2003).

Dobereiner & Duque, (1980) mostraram em suas pesquisas que a seleção de genótipos de plantas em solos fertilizados com fosfatos e microelementos, mas com baixo ou nenhuma aplicação de N, no Brasil, era um dos fatores-chave para as contribuições de FBN observadas a qual pode enriquecer em 70% o conteúdo de N da cana-de-açúcar e 50% os cereais. Com a continuidade dos estudos, perceberam-se um outro fator importante para os dados observados sobre a contribuição da FBN em gramíneas, referente à descoberta das bactérias fixadoras de N₂ nos tecidos internos, vasos condutores, e espaços intercelulares das gramíneas estimulando os estudos com estes microrganismos em associação com gramíneas (James et al., 1997).

Bashan & Holguin (1997) relatam que devido à capacidade do *Azospirillum* em fixar nitrogênio, produzir fitormônios, sideróforos, aumentando a absorção de minerais, a inoculação deste gênero tem contribuído para o aumento da produtividade de plantas. Mesmo obtendo sucesso com os experimentos usando *Azospirillum* spp. como inoculante, sua aplicação comercial em escala maior tem sido restrito, pois existem muitos obstáculos para seu uso como a imprevisibilidade e inconsistência nos resultados a campo. Entretanto, essas variáveis perpassam por fatores como condições edafoclimáticas e as interações com a biota do solo (Okon & Labandera-Gonzalez, 1994). Muthukumarasamy et al. (1999) demonstrou em seus trabalhos que a inoculação com *Azospirillum* aumentou significativamente o conteúdo de N nas folhas de cana em condições de casa-de-vegetação. Enquanto que aplicação de *Azospirillum* spp. no solo pode aumentar significativamente a produção de cana-planta e cana-soca no campo (Shankariah & Hunsigi, 2001). Estes autores obtiveram dados sobre aumentos na produção de cana-planta e cana-soca com médias entre 5 e 9 Mg ha⁻¹, respectivamente.

Oliveira et al. (2002, 2006) avaliaram o efeito da inoculação de misturas bacterianas nas variedades SP701143 e SP813250 micropropagadas e verificaram que houve efeito da inoculação sobre a FBN, cuja contribuição média foi ao redor de 30 % do nitrogênio acumulado quando inoculadas com a mistura de cinco bactérias diferentes, as que estão sendo utilizadas nesta tese, sugerindo que a combinação das espécies no inoculante é a melhor estratégia para aumentar a produção da cultura, que tem demonstrado ser dependente do processo. A RB72454 é uma das que conseguem bom desenvolvimento em condições de baixa fertilidade do solo, estando entre as cultivares comercialmente utilizadas e como uma das que se beneficia do processo de fixação biológica do nitrogênio (Xavier, 2006).

Outros experimentos estimaram que a contribuição da FBN pudesse ser amplamente variável entre cultivares de cana-de-açúcar, e qual ou quais bactérias é ou são as mais importantes na cultura da cana-de-açúcar associadas à fixação biológica do nitrogênio ainda é desconhecido. Embora *Gluconacetobacter diazotrophicus* tenha sido sugerida como forte candidata responsável pela FBN observada (Munõz-Rojas & Caballero-Mellado, 2003). Os mesmos autores, estudando a dinâmica populacional de três estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em cinco cultivares de cana micropropagada sob diferentes níveis de adubação e estágios de crescimento das plantas, mostraram que a população bacteriana caiu drasticamente em relação à idade da planta, ao nível de adubação nitrogenada, a estirpe inoculada e a variedade testada, sendo que a estirpe denominada BR11281 persistiu por um período maior e em altos números do que a estirpe PAL 3 dentro das plantas de todas as

variedades testadas. Neste mesmo trabalho os autores relatam que a inoculação de *G. diazotrophicus* pode ser benéfica para o crescimento de plantas de cana-de-açúcar, mas que esta resposta é dependente de ambos, estirpe e variedade e que a resposta mais promissora a inoculação foi observada com a combinação da estirpe BR11281 e a variedade MEX 57473. Embora o efeito positivo do crescimento da cana aparentemente ocorreu por mecanismos outros do que a FBN, os resultados mostram a importância da variedade para a persistência da interação planta-bactéria e poderia explicar as diferentes taxas da FBN estimada entre as cultivares de cana.

Existem algumas controvérsias sobre bactérias fixadoras versus adubação nitrogenada de modo que Li & Macrae (1992) encontraram altas populações de *Gluconactobacter diazotrophicus* isoladas de cana em campos comerciais, enquanto outros trabalhos mostraram alta fertilização nitrogenada reduzindo a população de bactérias fixadoras de nitrogênio (Fuentes-Ramirez et al. 1993, Perin et al. 2004, Medeiros et al. 2006). Por outro lado, estudos para avaliar o potencial da fixação biológica de nitrogênio em variedades de cana-de-açúcar brasileiras crescidas no campo apontam para a importância das condições ambientais favoráveis (solo e clima) para os melhores efeitos da FBN (Polidoro et al. 2001, Boddey et al., 2003). E em condições controladas, estudos de inoculação de bactérias como *Herbaspirillum* junto com substâncias húmicas em mini-toletes da variedade RB72454 de cana-de-açúcar tratados termicamente, mostraram efeito da inoculação, combinada ou não com substâncias húmicas, sobre o aumento populacional da bactéria inoculada, assim como na promoção do crescimento radicular induzido por ambos, inoculação da bactéria selecionada e do ácido húmico, sugerindo novos modelos de utilização das bactérias diazotróficas em plantas Marques et al. (2008). A co-inoculação de *Azospirillum* e o fungo micorrízico *Glomus clarum* em genótipos de milho promoveu incrementos na biomassa da planta, conteúdo de nitrogênio nas folhas e na concentração de fósforo verificado por Myauchi et al (2008).

2.5 Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal

Em décadas recentes, evidências apontam que os benefícios no uso de bactérias fixadoras de nitrogênio vão além da capacidade de fixar biologicamente o nitrogênio atmosférico, de modo que os efeitos observados parece ser uma consequência da complexa mistura de diferentes mecanismos, os quais podem incluir atividade da enzima nitrato redutase, produção de sideróforos, metabolismo/síntese e o transporte de fitormônios com liberação para as plantas, e desta forma atuando com importante papel na promoção do crescimento vegetal observada, sendo desta forma chamada de bactérias promotoras do crescimento vegetal (Cassán et al. 2001).

Além da contribuição da FBN por bactérias diazotróficas, algumas bactérias também podem promover o crescimento destas plantas devido à sintetização de fitormônios (Fuentes-Ramirez et al., 1993; Paula et al., 1991; Bastián et al., 1998; Maheshkumar et al., 1999; Sevilla et al., 1998). Entretanto, resta esclarecer quais mecanismos estão envolvidos no estabelecimento deste tipo de interação e qual de molécula medeia à sinalização entre planta e bactéria. Muito pouco se sabe sobre o papel da planta nesta associação (Nogueira et al, 2001).

Indiretamente, um papel para os efeitos dos hormônios produzidos pelas bactérias na promoção do crescimento das plantas foi sugerido quando mutantes Nif⁻ de diferentes diazotróficos pareceram ser ainda capazes de estimular o crescimento das plantas. Barberi et al. (1986) mostrou um mutante Nif⁻ de *Azospirillum brasilense* Sp6, que é capaz de produzir ácido indol acético, emitindo uma resposta muito similar a uma estirpe não modificada geneticamente e usada para comparação, e verificaram aumento do número e o comprimento das raízes laterais. Essas bactérias também podem atuar protegendo as plantas contra o ataque de fungos fitopatogênicos do solo ou bactérias através de diversos mecanismos de ação como

produção de sideróforos, antibiose, quinases e glucanases (Whipps, 2001; Muthukumarasamy et al., 2000; Pinõn et al., 2002).

A prática da inoculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) em plantas não leguminosas foi adotado em alguns países e demonstram potencial para o agronegócio (Bashan, 1998; Kennedy et al., 2004). Infelizmente, a melhoria da produtividade alcançada com sua prática ainda apresenta alta variação (de 0 a 30%) e baixa reprodutibilidade para várias culturas (Dobbelaere et al., 2003; Okon & Labandera-Gonzalez, 1994).

Respostas positivas da inoculação com bactérias diazotróficas têm sido demonstradas em plantas de cana-de-açúcar crescidas sob condições de casa-de-vegetação e campo (Sevilla et al., 1998; Muthukumarasamy et al., 1999a; Sevilla et al., 2001; Mirza et al., 2001; Oliveira et al., 2002, Munõz-Rojas & Cabalero-Mellado, 2003; Oliveira et al., 2006.). Além da cana-de-açúcar, poaceas como o arroz tem se beneficiado da inoculação com diazotróficos, através dos homônimos bacterianos, demonstrando influência positiva sobre a produtividade, acúmulo de nitrogênio e altas contribuições da FBN de 11 a 18 % na cultura (Rodrigues et al. 2008).

Felice et al. (2008), avaliando a inoculação de *Bacillus subtilis* estirpe 101 combinado com *Azospirillum brasilense* Sp245 em tomate (*Lycopersicon esculentum*), demonstraram que a combinação das duas bactérias promotoras de crescimento vegetal, não teve efeito sinérgico sobre a biomassa da planta. Entretanto, *B. subtilis* causou alterações na arquitetura do sistema radicular, sugerindo diferente modo de ação na regulação do desenvolvimento radicular quando comparado a *A. brasilense*. Com os resultados neste ensaio, os autores sugerem que a redução no crescimento da planta e alterações no sistema radicular elicitado pela combinação microbiana, possa envolver rotas sinalizadoras independentes para as duas espécies bacterianas.

A inoculação de *Azospirillum brasilense* Sp245 em plântulas micropropagadas de *Prunus cerasifera* L., clone Mr. S 2/5, promoveu o aumento da biomassa radicular. Embora a presença da referida bactéria tenha efeito positivo sobre o enraizamento por produção de ácido indol butírico, ela também protege as plantas contra ataques de fitopatógenos como a *Rhizoctonia* spp. com taxas de sobrevivência da planta ao redor de 100% vs. 0% quando comparado ao controle. Esse efeito de biocontrole do *A. brasilense* Sp245 sobre a comunidade fúngica da rizosfera foi confirmado pelo perfil em um gradiente de desnaturação em gel de eletroforese (DGGE). Neste estudo os autores concluem que *A. brasilense* Sp245 poderia ser aplicado como ferramenta para biotecnologia de plantas (Russo et al. 2008).

2.6 Inoculantes Agrícolas

2.6.1 Breve histórico

Inoculantes têm sido usados por mais de um século com o surgimento da indústria de inoculantes para leguminosas em 1895, quando Nobbe e Hiltner introduziram uma cultura de rizóbio em crescimento laboratorial sob o nome de “Nitragin.” A produção dessa bactéria em laboratório para uso em escala maior foi realizada em 1896, iniciando-se a comercialização em 1898 (Elmerich, 2007).

No Brasil a produção de inoculante em nível industrial iniciou-se na década de 1950, Freire (1968), e a turfa tem sido utilizada como veículo inoculante, em sua grande maioria, apesar de se tratar de um recurso natural de longo período geológico de formação e, portanto, de difícil renovação, se tornando assim em recurso de pouca disponibilidade, ausente em alguns países e com grandes possibilidades de futuramente se tornar escasso.

O mercado de produção de inoculantes nacional é um dos maiores no mundo (Chueire et al., 2003) e na safra de 2003 foram comercializados cerca de 26,4 milhões de doses de

inoculantes, sendo a maior parte 99% foi para a cultura da soja e o 1% restante foi para 108 espécies Moreira (2008).

2.6.2 Definições

A definição de inoculante pode ser ampla e passível de modificações e ampliações à medida que o conhecimento sobre o assunto avança, de modo que Pandey & Maheshwari (2007) definem como uma preparação contendo uma ou mais estirpes bacterianas benéficas (ou espécies) num condutor fácil de usar, econômico, podendo ser orgânico, inorgânico, ou sintético. Do ponto de vista de Bashan (1998) inoculantes bacterianos são definidos como sendo formulações contendo um ou mais microrganismos benéficos, com capacidade de promover o crescimento vegetal por mecanismos como produção de fitormônios, simultaneamente ou não com a fixação biológica de nitrogênio e agentes do controle biológico.

Para o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, inoculante é o material que contenha microrganismos que atue favoravelmente no desenvolvimento das plantas entendendo-se como:

a) suporte: material excipiente e esterilizado, livre de contaminantes segundo os limites estabelecidos, que acompanha os microrganismos e tem a função de suportar ou nutrir, ou ambas as funções, o crescimento e a sobrevivência destes microrganismos, facilitando a sua aplicação e

b) pureza do inoculante: ausência de qualquer tipo de microrganismos que não sejam os especificados; (Brasil, 2009).

O inoculante tem também a função de servir como meio para transportar a bactéria do local de produção (indústria) até o local onde será aplicado na semente ou planta (Bashan, 1998).

2.6.3 Fatores favoráveis

Alguns fatores favoráveis num produto a ser empregado como inoculante devendo-se destacar: a) as características físicas e químicas, que devem ser uniformes; b) consistência na qualidade; c) ter afinidade pela água; d) ser de fácil produção; 5) não ser tóxico; 6) de fácil manejo e 7) apresentarem biodegradabilidade e não fornecer riscos ambientais (Bashan, 1998; Albareda et al., 2008).

Outro fator que deve ser considerado quando da utilização de inoculantes, refere-se à eficiência do processo da inoculação, que está diretamente relacionada com o número de células viáveis quando levados para o solo, e uma das estratégias utilizadas para aumentar o número de células viáveis e conferir proteção é através do uso de suplementação nutricional (Anandham et al, 2007).

Com relação ao estabelecimento do inoculante no sistema radicular e proteção contra estresses ambientais, foi desenvolvido uma nova matrix para imobilização de células microbianas por adsorção, proposto através da modificação da Zeolita natural com surfactante, o que permitiu a adsorção em 100% das células de *Azotobacter chroococcum*, mantendo sua sobrevivência e capacidade fixadora de nitrogênio (Joshi et al. 2007) e também o uso de estirpes de bactérias selecionadas para eficiência e tolerância a estresses (Reis, 2006).

A produção de biofertilizantes contendo cistos bacterianos, já testados para *Azospirillum*, pode representar um mecanismo pelo qual o microrganismo pode persistir na rizosfera durante condições desfavoráveis como dessecação, temperatura e limitação de nutrientes (Vendan & Thangaraju, 2007).

2.6.4 Características desejáveis para a comercialização

No que se refere à comercialização dos inoculantes, a viabilidade celular deve ser de 10^9 células por grama ou mililitro no produto até a data estabelecida pelo fabricante, que para os inoculantes turfosos contendo células de rizóbio é de 180 dias após a inoculação na turfa como preconizado pelo ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, no qual o decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004 aprova o Regulamento da Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes ou biofertilizantes destinados à agricultura (Brasil, 2009).

Como proposto por Stephens & Rask, (2000) para que se possa formular e produzir comercialmente os inoculantes é necessário à integração dos parâmetros físicos, químicos e biológicos, permitindo assim elevadas populações do microrganismo alvo e maior tempo de sobrevivência. Os mesmos autores relatam que formulações inadequadas são freqüentemente as barreiras mais comuns para a comercialização dos inoculantes.

2.6.5 Formas disponíveis no mercado

No mercado, os inoculantes estão disponíveis na forma sólida, líquida ou oleosa, sendo a turfa superior em relação aos demais inoculantes porque ela apresenta alta capacidade de retenção de umidade, não é tóxica para o microrganismo, é de fácil esterilização, tem capacidade de tamponamento de seu pH, além da facilidade de manufatura (Smith, 1992) apresenta baixo custo e de acordo com (Hungria et al. 2005) as melhores fontes de turfa são da Argentina e do Canadá com conteúdo de matéria orgânica variando entre 40-50%, mas para outras fontes de turfa pode-se adicionar húmus para melhorar sua qualidade. Entretanto a turfa é um recurso natural que requer longo período geológico de formação, sendo, portanto limitado e com possibilidades de se tornar escasso futuramente (Bucher & Reis, 2008).

Inoculantes líquidos tem sido aceitos como de fácil manuseio e que pode apresentar eficácia equivalente aos encontrados com a turfa (Hynes et al. 1995, Albareda et al. 2008). Com relação aos microrganismos, estes podem funcionar otimamente bem em condições de laboratório, mas a dificuldade está em se ajustar uma formulação para o inoculante de modo que o produto seja capaz de manter a população do microrganismo e proporcionar resultados equivalentes em condições de campo (Stephens & Rask 2000).

2.6.6 Alternativas viáveis

Veículos inoculantes de baixo custo e com potencial para aplicação no ambiente agrícola, tem sido alvo de intensas pesquisas, como por exemplo, bagaço de cana, serragem, turfa derivada de cacau, casca de arroz, farelo de trigo, carvão vegetal, fosfato de rocha, pós de carvão, lignita, entre outros a campo (Pandey & Maheshwari, 2007), mas de acordo com estes autores, ainda existem problemas com relação à viabilidade das células nos veículos e também inerente à tecnologia, pois precisam de ajustes, os problemas da eficácia do produto a campo estando, diretamente ligado ao sucesso do estabelecimento do inoculante no sistema radicular.

Abordagens alternativas têm sido apontadas na direção dos sistemas poliméricos biodegradáveis que se apresentam como uma tecnologia alternativa, como materiais ecologicamente seguros, pois podem ser degradados pela ação de microrganismos, tais como bactérias, fungos ou algas, sem causar danos ao meio ambiente. As aplicações tecnológicas destes materiais normalmente requerem melhorias nas suas propriedades mecânicas (Rosa et al, 2001).

Exemplo prático da aplicação de polímeros refere-se à utilização do alginato e goma xantana, sendo biodegradáveis e de baixo custo, que promovem o encapsulamento das células e só as libera após a degradação do material no ambiente e assim previnem as células de estresses ambientais, podendo favorecer a multiplicação e sobrevivência das células quando

aplicados no solo (Junger & Mugnier, 1982; Van Elsas et al. 1992; Denardin & Freire, 2000; Bashan et al., 2002). Goma arábica, metilcelulose e o polivinilpirrolidone (PVP) podem ser usados como adesivos para inoculantes turfosos contendo células de rizóbio, de modo a auxiliar na cobertura das sementes e assim proteger as células bacterianas contra a dessecação, conferindo proteção às células, durante a secagem a vácuo, aumentando a sobrevivência celular (Deaker et al., 2004, Deaker, 2007).

A cana-de-açúcar pode servir como fonte (matéria prima renovável) para a produção do polihidroxibutirato, que é composto basicamente por carbono, oxigênio e hidrogênio sendo um produto biocompatível e ecologicamente viável. É o biopolímero mais indicado para aplicação de injeção de moldes, compatível com tecidos vivos, não apresentando significativa rejeição no corpo humano, apresenta as mesmas propriedades reológicas dos polímeros convencionais, além de permitir baixas temperaturas de processamento (Filho & Brondi, 2006).

Polímeros como carboximetilcelulose e amido têm sido utilizados com veículos inoculantes para rizóbio (Fernandes Jr. 2006, Rohr, 2007). A carboximetilcelulose (CMC) é um polímero aniônico derivado da celulose, solúvel em água. É produzido, via reação de Williamson, pelo tratamento de celulose com ácido monocloroacético em presença de excesso de hidróxido de sódio. É um importante produto industrial, geralmente isolado e comercializado como sal de sódio, com múltiplas possibilidades de aplicação industrial (Fujimoto, 2002). O amido é um carboidrato de estrutura complexa, formado de monossacarídeos (glicose) ligados entre si. Os grânulos de amido são compostos por amilose e amilopectina, o que corresponde a 98–99% da massa seca dos grânulos, a razão entre os dois polissacarídeos depende da origem botânica do amido (Tester et al., 2004). É um material natural renovável e aplicado em produtos alimentares, em papel, têxteis, adesivos, material farmacêutico e nas indústrias petroquímicas (Van der Burgt et al., 1998).

O grupo de microrganismos fixadores de nitrogênio como o gênero *Azospirillum* tem sido amplamente investigado para formulação de inoculantes ou bioinoculante ou ainda biofertilizantes de modo que inoculantes comerciais contendo *Azospirillum brasilense* já foram lançados no mercado mundial para gramíneas (Glick, 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

PARTE I : Laboratório

3.1 Sobrevivência dos Microrganismos Endofíticos em Mistura nos Polímeros como Veículos de Inoculação

3.1.1 Preparo dos polímeros

Foram utilizados os polímeros carboximetilcelulose e amido na proporção 60% e 40%. A partir da proporção 60/40 (CMC e amido), foram preparadas as misturas poliméricas nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 (g L⁻¹) em água destilada (forma líquida) e testada sem compatibilizante e compatibilizadas com óxido de magnésio a 2%, e a mistura polimérica na forma gel, usando uma concentração de 2 g L⁻¹. Estas misturas poliméricas receberam a seguinte denominação: IPC 0,2, IPC 0,4, IPC 0,6; IPC 0,8 e IPC 0,2, (2%); IPC 0,4, (2%) IPC 0,6, (2%) e IPC 0,8; (2%) na forma líquida e IPC 2,2 na forma gel. As misturas poliméricas foram preparadas e fornecidas pelo Laboratório de Ciência e Tecnologia de Polímeros do Departamento de Engenharia Química, Instituto de Tecnologia da UFRRJ e está protegido por patente no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual, sob o título "Composições poliméricas contendo inoculante rizobiano, uso das mesmas e sementes tratadas com as composições" – nº da patente (PI0506338-8).

A seguir, o veículo foi transferido para sacos de polipropileno com gramatura de aproximadamente 0,05 mm, contendo 10 mL de cada veículo e selados. O veículo final foi autoclavado a 120° C por 20 min. Posteriormente cada saco foi inoculado com um mL de uma suspensão bacteriana contendo 10¹¹ células mL⁻¹ da mistura dos microrganismos descritos na Tabela 2. Ao final o inoculante foi armazenado a 24 °C por um período de até 120 dias.

3.1.2. Sobrevivência dos microrganismos no veículo polimérico líquido

A sobrevivência dos microrganismos foi testada nas misturas poliméricas na forma líquida, através das contagens das células viáveis que foram feitas aos 15, 30, 60, 90 e 120 dias após a inoculação, pelo método do número mais provável (Dobereiner et al., 1995). Foram utilizados os meios semi-sólidos LGI-P para BR 11281 e LGI para a estirpe BR 11145. Todos os meios de cultivo estão descritos (sua composição e preparação) nos anexos deste trabalho.

Ao final da avaliação aos 120 dias após a inoculação, o inoculante IPC 0,8 foi selecionado para nova avaliação da sobrevivência dos microrganismos, por ter apresentado sobrevivência e estabilidade dos microrganismos testados até 120 dias após a inoculação.

3.1.3. Sobrevivência dos microrganismos no veículo polimérico gel

A sobrevivência dos microrganismos foi testada de forma individual na mistura polimérica na forma líquida, selecionada na 1ª avaliação (IPC 0,8) e nos demais veículos a seguir. Nesta avaliação foi testada a mistura polimérica gel IPC 2,2 preparadas e fornecidas pelo Laboratório de Ciência e Tecnologia de Polímeros do departamento de Engenharia Química, Instituto de Tecnologia da UFRRJ, e como controle foi utilizado o inóculo misto dos microrganismos. As estirpes foram crescidas em meio mínimo modificado (anexo 1) e posteriormente inoculadas nos sacos conforme descrito no subitem 3.1.2.

As contagens das células viáveis no polímero líquido (IPC 0,8), gel (IPC 2,2) e inóculo misto foram feitas aos 15, 30, 60 e 90 dias após a inoculação, utilizando o método do número mais provável (NMP) de acordo com Dobereiner et al. (1995).

3.2 Preparo dos Inoculantes

Os inoculantes foram preparados como descrito a seguir:

3.2.1 Microrganismos utilizados

Foram utilizadas estirpes puras dos padrões dos microrganismos diazotróficos endofíticos como descrito na Tabela 1.

As cinco estirpes utilizadas nesta Tese foram inicialmente testadas e selecionadas por Oliveira (2003) em seus estudos de inoculação das plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar variedades SP701143 e SP813250, em diferentes ambientes de produção como Seropédica-RJ, Piracicaba-SP e Jaú-SP.

Tabela 1. Microrganismos endofíticos e partes da planta de cana-de-açúcar de obtenção das estirpes

Espécies	Estirpe	Partes da Planta	Cana-de-açúcar
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	BR 11281	Raízes	<i>Saccharum</i> sp. (híbrido)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	BR 11335	Raízes	SP701143
<i>H. rubrisubalbicans</i>	BR 11504	Colmos	SP701284
<i>Azospirillum amazonense</i>	BR 11145	Colmos	CB453
<i>Burkholderia tropica</i>	BR 11366	Perfilhos	SP711406

Todas as estirpes estão depositadas na coleção de culturas da Embrapa-Agrobiologia.

3.2.2. Preparo do Pré-inóculo bacteriano

As estirpes (Tabela 1) foram crescidas em tubos de ensaio contendo meio líquido, LGI-P + 10 mM de NH_4SO_4 pH 5,5 para BR 11281, JNFb + 1 g NH_4Cl pH 5,8 para BR 11335 e BR 11504, LGI + 1 g de KNO_3 pH 6,0-6,2 para BR 11145 e JMV + 10 mM de Glutamato de sódio pH 5,0 para BR 11366, sob agitação de 175 rpm a 30°C por 24 h.

3.2.3. Inóculo bacteriano

Foram utilizadas 1,0 mL das suspensões celulares descritas no subitem 3.2.2 e inoculados em 100 mL de meio líquido NFb modificado (Burdman et al., 1998) contendo (g L^{-1}): 5 g de sacarose e pH 6,0-6,2 para o isolado BR 11145, 100 g de sacarose e pH 5,5 para o isolado BR 11281 5,0 g de manitol e pH 5,0-5,4 para o isolado BR 11366, 5,0 g de ácido málico e pH 5,8 para os isolados BR 11335 e BR 11504. Porém, antes da inoculação dos isolados foi adicionado 1,0 mL de frutose 0,7 % (1:10) em tampão fosfato 0,5 M esterilizado em filtro Millipore® 0,2 μm ao meio de cultura esterilizado. Estes foram mantidos a 175 rpm a 30 °C por 24 h.

3.2.4. Inoculantes

Posteriormente ao crescimento dos microrganismos no subitem 3.2.3, foi feita leitura das absorbâncias a 436 nm e utilizando câmara de Neubauer para contagem das células, que foram ajustadas para 10^9 células mL^{-1} por estirpe. Posteriormente foram adicionados 75 mL dos microrganismos em 175 mL do veículo polimérico em gel (IPC 2,2) e em 175 mL do meio de crescimento (para compor o inóculo misto) e incubados por 24 h a 30 °C.

PARTE II: Experimentos na casa-de-vegetação

3.3 Experimento I - Aplicação do Inóculo Misto, Polímero e a Mistura dos dois contendo Microrganismos Endofíticos nas Plântulas de Cana-de-açúcar

3.3.1 Condução do experimento

Para avaliar a eficiência do polímero e do meio de cultivo como veículo de inoculação das estirpes BR11281, BR11335, BR11504, BR11145 e BR11366, foi realizado experimento com substrato areia e vermiculita esterilizado (2:1) em uma casa de vegetação da Embrapa - Agrobiologia na BR 465 km 7 do município de Seropédica-RJ.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com seis repetições, quatro tratamentos [1: inóculo misto, 2: inoculante polimérico em gel (IPC 2,2), 3: mistura dos dois inoculantes e 4: controle]. Foram utilizados mini toletes, contendo uma gema, da variedade RB72454 de cana-de-açúcar, estes foram tratados termicamente a 52°C por 30 min. tratamento curto, normalmente utilizado para controle da *Leifsonia xili* subsp. *xili* (Nogueira, 2006).

Em seguida foram armazenados em caixas com capacidade para 12 kg onde permaneceram por 24 h à temperatura ambiente. Posteriormente os toletes foram imersos em 4 L de inóculo misto, 4 L de polímero em gel (IPC 2,2), e a mistura dos dois (2 L de inóculo misto mais 2 L de polímero gel) diluídos 1:100 (concentração final, ao redor, de 10^7 células mL^{-1}) em água deionizada por 30 min. Foram plantados seis toletes por caixa preenchida com 12 kg de substrato estéril e aos 50 dias após o plantio foi feita à coleta.

3.3.2 Produção de fitomassa seca total e acúmulo de nitrogênio total nas plântulas

Aos 50 dias após a inoculação, as plântulas de cana-de-açúcar foram retiradas das caixas, lavadas em água corrente, em seguida foram separadas em mini tolete, parte aérea e raízes.

O material foi levado à estufa de secagem a 65 °C até estabilização de seus pesos onde foi determinada a matéria seca das plântulas. Após esta etapa o teor de nitrogênio total foi determinado em amostras de 200 mg do material seco e moído, por digestões sulfúricas, seguidas de destilação e titulação pelo método semi-micro Kjeldahl.

3.3.3 Colonização das plântulas pelos microrganismos inoculados

Para monitorar a população dos microrganismos inoculados, foram feitas coletas das plântulas de cana-de-açúcar da variedade RB72454 com três repetições por tratamento no momento do plantio (tempo zero) aos 15, 30 e 50 dias após o plantio pelo método do número mais provável (NMP) (Dobereiner, et al., 1995). Foram pesados um grama de raízes, parte aérea e toletes que foram macerados em 9,0 mL de solução salina e os extratos submetidos a diluições seriadas para contagem das células viáveis (10^{-2} a 10^{-7} células mL^{-1}). As três últimas diluições foram inoculadas em triplicata nos meios semi-seletivos LGI pH 6,0-6,2 para a estirpe BR11145; LGI-P pH 5,5 para a estirpe BR11281; JMV pH 5,0-5,4 para a estirpe BR11366 e para quantificar separadamente as estirpes BR11335 e BR11504, foi feita uma substituição da fonte de carbono (ácido málico) do meio JNFb segundo Olivares et al. (1993). Para a estirpe BR 11335 foi utilizado a fonte de carbono N-acetilglucosamina e para a estirpe BR 11504 foi utilizado a fonte meso-eritritol, diluídas em tampão fosfato de potássio 3 mM pH 6,0 (Souto-Padrón, 1998), esterilizadas por filtração em Miliporo® 0,2 μm e preparadas para uma concentração final no meio de cultura de 0,5 % e incubaram por 7 dias a 30 °C. Constatado a presença das células viáveis, através da presença de película característica, presente na superfície dos meios de cultivo foi utilizado a tabela de McCrady para quantificar a população de diazotróficos presentes no material vegetal.

3.4 Experimento II - Aplicação dos Polímeros contendo Microrganismos Endofíticos nas Plântulas de Cana-de-açúcar

3.4.1 Preparo dos inoculantes

Como descrito nos ensaios de sobrevivência (subitem 3.2)

3.4.2 Condução do experimento

Foi em substrato areia e vermiculita esterilizado (2:1) em uma casa de vegetação da Embrapa - Agrobiologia na BR 465, km 7 do município de Seropédica-RJ. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com seis repetições e quatro tratamentos [1: inoculante meio de cultivo, 2: inoculante polimérico em gel (IPC 2,2), 3: inoculante polimérico líquido (IPC 0,8), 4: controle]. Os mini toletes de cana-de-açúcar da variedade RB72454 receberam tratamento térmico a 52 °C por 30 min.

Em seguida foram armazenados em caixas com capacidade para 12 kg onde permaneceram por 24 h à temperatura ambiente. Posteriormente os toletes foram imersos em 4 L do meio de cultivo, o mesmo volume para o polímero (IPC 0,8) em gel e o polímero (IPC 0,8) líquido, todos diluídos 1:100 (concentração final de 10^7 células mL⁻¹) em água deionizada por 30 min. Foram plantados seis toletes por caixa preenchida com 12 kg de substrato estéril e aos 50 dias após o plantio foi feita a coleta.

3.4.3 Produção de fitomassa seca total e acúmulo de nitrogênio total nas plântulas

Como descrito no experimento I, na casa-de-vegetação (subitem 3.3.2).

3.4.4 Colonização das plântulas pelos microrganismos inoculados

Como descrito no experimento I, na casa-de-vegetação. Com exceção para o número de coletas que neste caso, foi feito uma aos 50 dias após a inoculação.

3.4.5 Análises estatísticas

Depois de verificado a validade da análise de variância quanto às pressuposições de normalidade e homogeneidade de variâncias dos erros, as médias das variáveis foram submetidas à análise de variância, recorrendo-se ao teste de Skott-Knott, com p 0,1 para comparação entre médias das demais variáveis. As análises foram realizadas utilizando os programas estatísticos SAEG[®], da Universidade Federal de Viçosa e SISVAR[®], da Universidade Federal de Lavras. Os dados para a população bacteriana foram ajustados usando a função logaritmo em base 10.

No ensaio de colonização, referente ao experimento I na casa-de-vegetação, foi ajustado os logaritmos em base 10 do número de células g⁻¹ de massa fresca avaliadas entre os tratamentos de inoculação utilizados. No ensaio de colonização, referente ao experimento II na casa-de-vegetação, os dados foram transformados em logaritmo em base 10. As análises foram realizadas utilizando os programas estatísticos SAEG[®] e SISVAR[®]

PARTE III: Experimentos de campo

3.5 Experimento I – Aplicação dos Microrganismos Endofíticos na Cana-planta e Aplicação do Polímero contendo Microrganismos Endofíticos na Reinoculação da Cana-soca Cultivadas no Planossolo

3.5.1 Preparo dos inoculantes

Como descrito nos ensaios de sobrevivência (subitem 3.2)

3.5.2 Inoculação

Foram utilizados toletes, contendo três gemas, das variedades RB72454 e RB867515 de cana de açúcar, que foram imersos por 30 min. no meio de cultivo bacteriano, diluídos 1:100 (concentração final de 10^7 células mL^{-1}) em água limpa. Foram utilizadas caixas com capacidade para 100 L de inoculante (Figura 1).

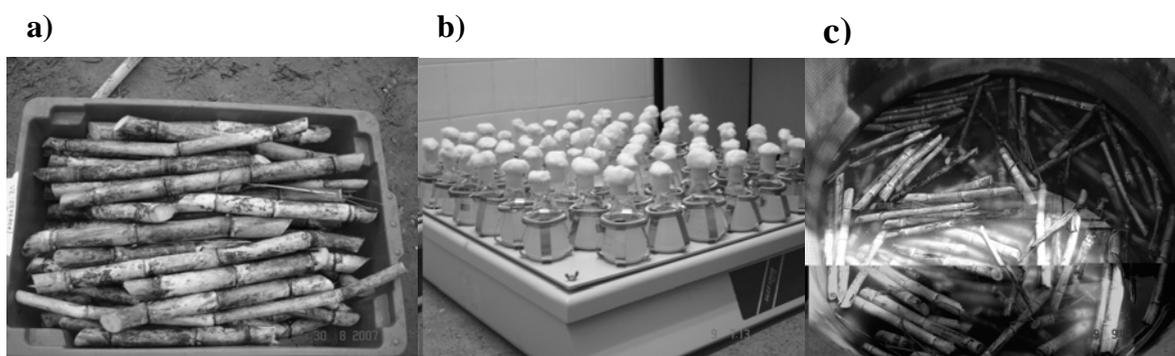


Figura 1. a) Toletes de cana contendo três gemas; b) meio de cultivo e c) toletes em imersão no meio de cultivo contendo microrganismos endofíticos por 30 minutos

3.5.3. Reinoculação

Foi utilizado o inoculante polimérico gel IPC 2,2, diluído 1:100 (concentração final ao redor de 10^7 células mL^{-1}) em água limpa num trator tanque com capacidade para 400 L de inoculante. A reinoculação foi feita através de pulverização das parcelas com regador, adicionando-se 1 L de inoculante por metro linear aos 40 dias após o corte da cana-planta.

Foram reinoculados apenas os tratamentos que receberam o inóculo misto na cana-planta (Figura 2).



Figura 2. a) Inoculante polimérico gel IPC 2,2 contendo microrganismos endofíticos; b) Trator tanque utilizado para o preparo da diluição do inoculante e c) Reinoculação sobre as plântulas na linha de plantio

3.5.4 Localização, características do solo e delineamento da área experimental

O experimento foi conduzido em condições de campo de 9 de março de 2006 a 28 de agosto de 2007 em solo classificado como Planossolo série Ecologia, de baixa fertilidade natural especialmente N, na área experimental da Embrapa-Agrobiologia, no km 7 da BR 465, município de Seropédica-RJ. Sua localização geográfica se dá no paralelo 22° 45' de latitude sul e o meridiano 43° 39' de longitude em uma altura de 26 m em relação ao nível do mar.

As características climáticas da região indicam que há um clima quente e úmido, sem inverno pronunciado sendo o regime pluviométrico caracterizado por um período chuvoso no verão e estiagem no inverno. Na figura 3, são apresentados dados da precipitação pluviométrica nos anos de 2006 e 2007, caracterizando o período seco (junho a setembro) e chuvoso (outubro a maio) no Rio de Janeiro, RJ.

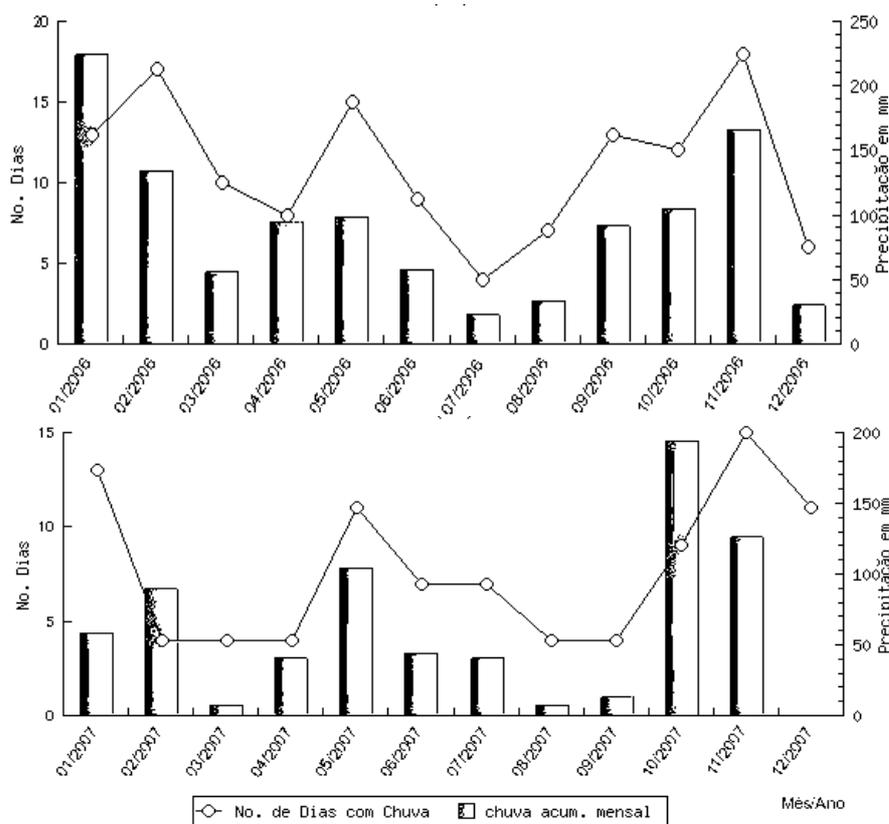


Figura 3. Chuva acumulada x número de dias com chuvas para o ano 2006 (a) e 2007 (b) no Rio de Janeiro, RJ. Fonte: www.inmet.gov.br/html/observacoes.php?lnk=Capitais

Foi adotado um delineamento em blocos ao acaso com quatro repetições, em esquema fatorial 4x2 nas parcelas. Na parcela foram testados 4 níveis de tratamentos (controle absoluto, controle adubado com 120 kg de N (uréia) ha⁻¹, inóculo misto e inoculação “In vitro”. O material vegetal inoculado “in vitro” foi preparado e fornecido pela Estação Experimental Dr. Leonel de Miranda, campus da UFRRJ, e está sediado em Campos dos Goytacazes, na região norte fluminense e na fase de cana-planta, os colmos foram utilizados nesta Tese. Foram testadas duas variedades RB72454 e RB867515 de cana-de-açúcar (características na Tabela 2).

Cada parcela foi composta de 4 linhas de 4 m linear, com espaçamento de 1,10 m entre linhas totalizando 32 parcelas de 17,6 m². A área útil de cada parcela (8,8 m²) foi composta de 2 linhas centrais.

Tabela 2. Características agroindustriais das variedades RB72454 e RB867515

Características da cultivar	RB72454	RB867515
Brotação	Boa	Boa
Perfilhamento	Bom	Médio
Porte	Ereto	Alto
Produção agrícola	Alta	Alta
Brotação das socas	Muito boa	Boa
Florescimento	Ocasional	Eventual
Maturação	Média	-
Teor de açúcares	Alto	Alto
Carvão	Intermediário	Resistente
Ferrugem	Resistente	Resistente
Solo	Sem restrições	Baixa restrição

Fontes: Características da variedade RB72454 adaptadas da Dissertação de Mestrado de Prado Jr, 2008 e variedade RB867515 da equipe do programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar PMGCA/UFV (Universidade Federal de Viçosa).

Análise de solo, realizada de acordo com Embrapa (1997), indicaram na amostra de 0-20 cm: pH em água 4,7; 0,7 cmol_c Ca²⁺.dm⁻³; 0,4 cmol_c Mg²⁺.dm⁻³; 0,2 cmol_c Al³⁺.dm⁻³; 7,1 mg P.dm⁻³; 40,2 mg K.dm⁻³, 0,63 %, carbono orgânico (C.O.), 1,09 % matéria orgânica (M.O.) e 0,00 % N. O solo foi arado e gradeado, optando-se por aplicar, a lanço, 500 kg calcáreo mineral® 100% PRNT ha⁻¹ devido aos valores de Al³⁺ trocáveis e baixos valores de Ca + Mg observados na análise do solo. Os fertilizantes foram colocados no fundo do sulco, nas doses de 100 kg P₂O₅ ha⁻¹ como superfosfato simples, 80 kg K₂O ha⁻¹ como cloreto de potássio e 50 kg de micronutrientes FTE BR12. Foram plantadas 12 gemas por metro linear. No tratamento adubado foram efetuadas três aplicações em cobertura de 40 kg N ha⁻¹ como uréia aos 30, 90 e 120 DAI (dias após a inoculação). Para a adubação de manutenção (cana-soca) os adubos foram colocados ao lado da linha de plantio, nas doses de 100 kg P₂O₅ ha⁻¹ como superfosfato simples, 100 kg K₂O ha⁻¹ como cloreto de potássio, 50 kg de FTE BR12 e 400 g de molibdato de amônio. No tratamento adubado foram efetuadas duas aplicações em cobertura 60 kg N ha⁻¹ como uréia aos 60 e 120 dias após o corte da cana-planta. O adubo foi colocado ao lado da linha de plantio, incorporado ao solo e em seguida foi feita irrigação.

3.5.5 Colheitas, produtividade de colmos, produção de fitomassa seca e acúmulo de nitrogênio das variedades de cana-de-açúcar

A primeira colheita do experimento (cana-planta) foi realizada de 27 a 30 de agosto de 2007 aos 18 meses após o plantio, a segunda colheita (cana-soca) foi de 1 a 4 de julho de 2008 aos 10 meses após a reinoculação da cana. Durante a colheita da cana foram consideradas as duas linhas centrais de cada parcela (área útil), totalizando 8,8 m² sendo que, a parte aérea das plantas de cana-de-açúcar foi separada em colmo, ponteiros (folhas verdes) e palha (folhas secas). Estimou-se a produtividade da lavoura (rendimento de colmos frescos), fitomassa fresca dos ponteiros e da palha, através de pesagem em campo. Em seguida foram retiradas amostras que foram pesadas, levadas à estufa de secagem a 65 °C até estabilização de seus pesos, as amostras foram novamente pesadas para determinação da matéria seca e N-total em cada parte, sendo o nitrogênio analisado pelo método semi-micro Kjeldahl (Alves et al., 1994).

3.6 Experimento II – Aplicação dos Inoculantes Poliméricos contendo Microrganismos Endofíticos na Cana-de-açúcar Cultivada no Planossolo

3.6.1 Preparo dos inoculantes

Como descrito nos ensaios de sobrevivência (subitem 3.2)

3.6.2 Inoculação

Foram utilizados toletes, contendo três gemas previamente selecionadas (Figura 4a), das variedades RB867515 e RB72454 de cana de açúcar que foram tratados termicamente a 52 °C por 30 min (Figura 4b). Em seguida os toletes foram armazenados em caixas com capacidade para 24 kg onde permaneceram por 24 h à temperatura ambiente. Posteriormente os toletes foram imersos por 30 min nos inoculantes líquido (IPC 0,8) e gel (IPC 2,2) diluídos 1:100 (concentração final ao redor de 10^7 células mL^{-1}) em água limpa (Figura 4c). Foram utilizadas caixas com capacidade para 500 L de inoculante.

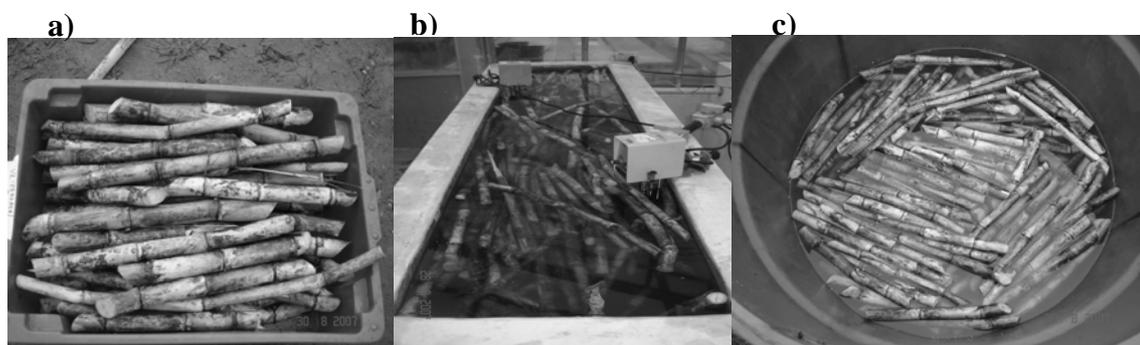


Figura 4. a) Toletes contendo três gemas; b) Tratamento térmico curto (52°C por 30 min) e c) Toletes em imersão no inoculante por 30 min.

3.6.3 Localização, características do solo e delineamento da área experimental

O experimento foi conduzido em condições de campo de 1 de setembro de 2007 a 14 de agosto de 2008 numa área próxima ao experimento I. As características climáticas indicam clima quente e úmido, sem inverno pronunciado sendo o regime pluviométrico caracterizado por um período chuvoso no verão e estiagem no inverno. Na figura 5, são apresentados dados da precipitação pluviométrica nos anos de 2007 e 2008, caracterizando o período seco (maio a setembro) e chuvoso (outubro a abril) no Rio de Janeiro, RJ.

Foi adotado um delineamento em blocos ao acaso com quatro repetições com fatorial 4x2 nas parcelas. Na parcela o fatorial consistiu de 4 níveis de tratamentos (controle absoluto, controle adubado com 120 kg de N (uréia) ha^{-1} , inoculante polimérico líquido (IPC 0,8) e o inoculante polimérico gel (IPC 2,2) e duas variedades RB72454 e RB867515 de cana-de-açúcar. Cada parcela foi composta de 5 linhas de 5 m linear, com espaçamento de 1,10 m entre linhas totalizando 32 parcelas de 27,5 m^2 . A área útil de cada parcela (16,5 m^2) foi composta de 3 linhas centrais.

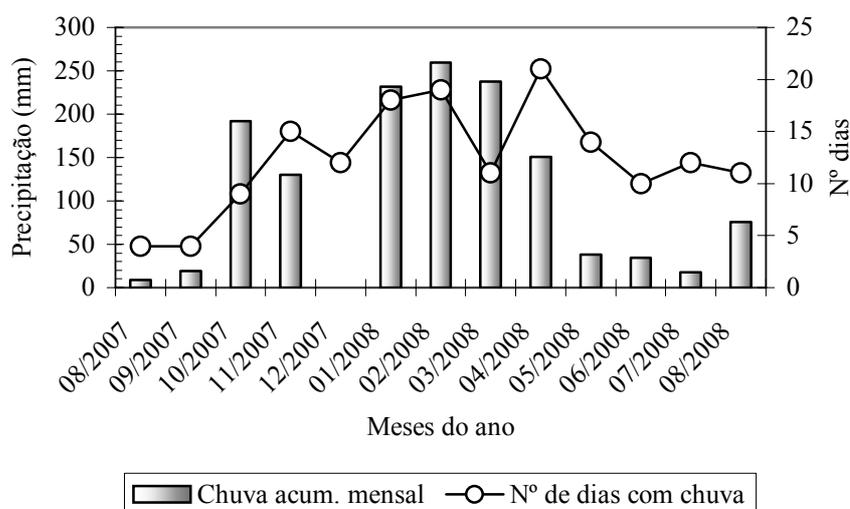


Figura 5. Chuva acumulada x número de dias com chuvas para o ano 2007 e 2008 no Rio de Janeiro, RJ. Fonte: Instituto nacional de meteorologia (Inmet)

Análise de solo, realizada de acordo com Embrapa (1997), indicaram na amostra de 0-20 cm: pH em água 5,4; $1,1 \text{ cmol}_c \text{ Ca}^{2+} \text{ dm}^{-3}$; $0,2 \text{ cmol}_c \text{ Mg}^{2+} \text{ dm}^{-3}$; $0,1 \text{ cmol}_c \text{ Al}^{3+} \text{ dm}^{-3}$; $26,1 \text{ mg P} \cdot \text{dm}^{-3}$; $27,0 \text{ mg K} \cdot \text{dm}^{-3}$, 0,48 %, carbono orgânico (C.O.), 0,83 % matéria orgânica (M.O.) e 0,043 % N. O solo foi arado e gradeado, optando-se por aplicar 500 kg calcário mineral ha^{-1} devido aos valores de Al^{3+} trocáveis e baixos valores de $\text{Ca} + \text{Mg}$ observados na análise do solo. Os fertilizantes foram colocados no fundo do sulco, nas doses de $100 \text{ kg P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$ como superfosfato simples, $100 \text{ kg K}_2\text{O ha}^{-1}$ como cloreto de potássio e 50 kg de FTE BR12 e $0,4 \text{ kg}$ de molibdato de amônio. Foram plantadas 12 gemas de cana por metro linear. No tratamento adubado foram efetuadas uma aplicação de 20 kg N ha^{-1} no plantio e duas aplicações em cobertura com 40 e 60 kg N ha^{-1} como uréia aos 60 e 90 DAI. O adubo foi colocado ao lado da linha de plantio, incorporado ao solo e em seguida foi feita irrigação.

3.6.4 Colheita, produtividade de colmos, produção de fitomassa seca e acúmulo de nitrogênio das variedades de cana-de-açúcar

A colheita do experimento foi realizada de 11 a 14 de agosto de 2008, aos 11 meses após o plantio. A produtividade de colmos, produção de fitomassa e acúmulo de nitrogênio das variedades de cana-de-açúcar foram realizados conforme descrito no experimento I de campo (subitem 3.5.5), com modificações apenas no que se refere à área útil das parcelas que neste caso foi composta de três linhas centrais ($16,5 \text{ m}^2$).

3.7 Experimento III – Aplicação dos Polímeros contendo Microrganismos Endofíticos na Cana-de-açúcar Cultivada no Argissolo

3.7.1 Preparo dos inoculantes

Como descrito nos ensaios de sobrevivência (subitem 3.2)

3.7.2 Inoculação

Como descrito no experimento II de campo (subitem 3.6.2)

3.7.3 Localização, características do solo e delineamento da área experimental

O experimento foi conduzido em condições de campo de 6 de setembro de 2007 a 21 de agosto de 2008 em um solo classificado como Argissolo de textura média, muito pobre em nutrientes, especialmente nitrogênio, na área experimental da Embrapa-Agrobiologia, BR 465 km 7 no município de Seropédica-RJ. Sua localização geográfica se dá no paralelo de 22° 45' de latitude sul e o meridiano 43° 40' de longitude em uma altitude de 26 m em relação ao nível do mar.

Foi adotado um delineamento em blocos ao acaso com quatro repetições, em esquema de parcelas subdivididas no tempo com fatorial 4x2 nas parcelas. Na parcela o fatorial consistiu de 4 níveis de tratamentos (controle absoluto, controle adubado com 120 kg de N (uréia) ha⁻¹, inoculante polimérico líquido (IPC 0,8) e o inoculante polimérico gel (IPC 2,2) e duas variedades RB72454 e RB867515 de cana-de-açúcar e nas subparcelas, casualizadas dentro de cada parcela, foram avaliadas 4 épocas (3, 6, 9 e 11 meses após a inoculação).

Cada parcela foi composta de 6 linhas de 6 m linear, com espaçamento de 1,10 m entre linhas totalizando 32 parcelas de 39,60 m². A área útil de cada parcela (26,4 m²) foi composta de 4 linhas centrais e foi subdividida em 4 subparcelas com 1 linha, cada uma referente a uma época de colheita.

Análises de solo, realizadas de acordo com Embrapa (1997), indicaram na amostra de 0-20 cm: pH em água 6,1; 3,2 cmol_c Ca²⁺.dm⁻³; 1,0 cmol_c Mg²⁺.dm⁻³; 0,1 cmol_c Al³⁺.dm⁻³; 4,1 mg P.dm⁻³; 81,0 mg K.dm⁻³ 0,6 % C.O.; 1,03 % M.O. e 0,09 % N. O solo foi arado e gradeado, optando-se por não aplicar calcário devido ao baixo valor de Al³⁺ trocável e adequado valor de Ca + Mg observados na análise do solo. Os fertilizantes foram colocados no fundo do sulco, nas doses de 100 kg P₂O₅ ha⁻¹ como superfosfato simples, 100 kg K₂O ha⁻¹ como cloreto de potássio, 50 kg FTE BR12 e 0,4 kg de molibdato de amônio. Foram plantadas 12 gemas de cana por metro linear. No tratamento adubado foram efetuadas duas aplicações em cobertura 60 kg N ha⁻¹ como uréia aos 30 e 90 DAI. O adubo foi colocado ao lado da linha de plantio, incorporado ao solo e em seguida foi feita irrigação.

3.7.4 Colheitas, produtividade de colmos e produção de fitomassa seca total de variedades de cana-de-açúcar

As colheitas do experimento foram realizadas aos 3, 6, 9 e 11 meses após a inoculação sendo a primeira coleta realizada de 3 a 4 de dezembro de 2007, a segunda de 10 a 14 de março de 2008, a terceira de 18 a 21 de junho de 2008 e a última foi de 21 a 25 de agosto de 2008, aos 11 meses após o plantio.

A produtividade de colmos, produção de fitomassa seca total e acúmulo de nitrogênio total das variedades de cana-de-açúcar foram realizados conforme descrito no subitem 3.4.4, com modificações apenas no que se refere à área útil das parcelas que neste caso foi composta de quatro linhas centrais (26,4 m²) e das subparcelas (6,6 m² linha⁻¹).

3.7.5 Análises estatísticas

Depois de verificado a validade da análise de variância quanto às pressuposições de normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variâncias dos erros (teste de Cochran), as médias das variáveis foram submetidas à análise de variância, recorrendo-se ao teste de Scott-Knott, com p 0,1 para comparação entre médias das demais variáveis. As análises foram realizadas nos programas estatísticos SAEG[®], da Universidade Federal de Viçosa e SISVAR[®], da Universidade Federal de Lavras.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE I: Laboratório

4.1 Sobrevivência dos Microrganismos Endofíticos em Mistura nos Polímeros como Veículos de Inoculação

Os resultados obtidos através da contagem do número de células presentes no inoculante polimérico líquido nas formas IPC 0,2; IPC 0,4; IPC 0,6 e IPC 0,8, compatibilizadas ou não com MgO (Óxido de Magnésio) na proporção 2%, considerando as estirpes BR11281 e BR11145 que foram avaliadas neste ensaio por apresentarem características fisiológicas distintas, o que permitiu maior confiança na quantificação das células viáveis, quando da aplicação do método do número mais provável (NMP) utilizada neste ensaio. As demais estirpes não foram consideradas nesta avaliação, devido ao crescimento cruzado nos diferentes meios semi-sólidos e semi-seletivos utilizados no método NMP.

As estirpes avaliadas demonstraram um perfil homogêneo com relação à manutenção das células viáveis nos polímeros, indicando que a sobrevivência das células não foi dependente do veículo de inoculação na menor ou maior concentração do polímero, compatibilizada ou não com MgO (Figura 6).

De modo geral, as bactérias sobreviveram com número de células viáveis ao redor de 10^9 células mL^{-1} nos veículos IPC 0,2, 0,4 e 0,6 aos 15 dias, apesar de apresentarem ligeira flutuação ao longo do período de avaliação, e de 10^8 células mL^{-1} aos 120 dias de armazenamento. Entretanto, o mesmo comportamento não foi verificado para o veículo polimérico IPC 0,8, considerando a estirpe BR11281 onde a viabilidades celular foi de 10^9 células mL^{-1} no inoculante ao longo do período de avaliação até 120 dias. Para a estirpe BR11145 foi observado sobrevivência celular ao redor de 10^9 células mL^{-1} no inoculante até 30 dias, apresentou ligeira flutuação ao longo do período de avaliação, e de 10^9 células mL^{-1} aos 120 dias de armazenamento, compatibilizada ou não com MgO. O veículo polimérico IPC 0,8 não compatibilizado foi então utilizado nas fases subsequentes do trabalho.

Fernandes Jr, (2006) avaliando a sobrevivência *Bradyrhizobium japonicum* estirpe BR3267 em composição polimérica, verificou uma população 10^8 células g^{-1} no veículo aos 90 dias após a inoculação.

Possíveis alterações na composição físico-química dos polímeros, causada por efeitos físicos da autoclavagem como, na viscosimetria também pode ter contribuído negativamente para a sobrevivência dos microrganismos em estudo, como observado por Oliveira (2006) sobre a influencia da esterilização por radiação gama nas propriedades físico-químicas do polímero natural PHB (polihidroxitirato) e seu copolímero (polihidroxitirato-co-hidroxitirato), verificando a formação de grupos terminais insaturados, induzidas pela radiação gama e ocorrência de cisões preferencialmente nos grupos ésteres do polímero.

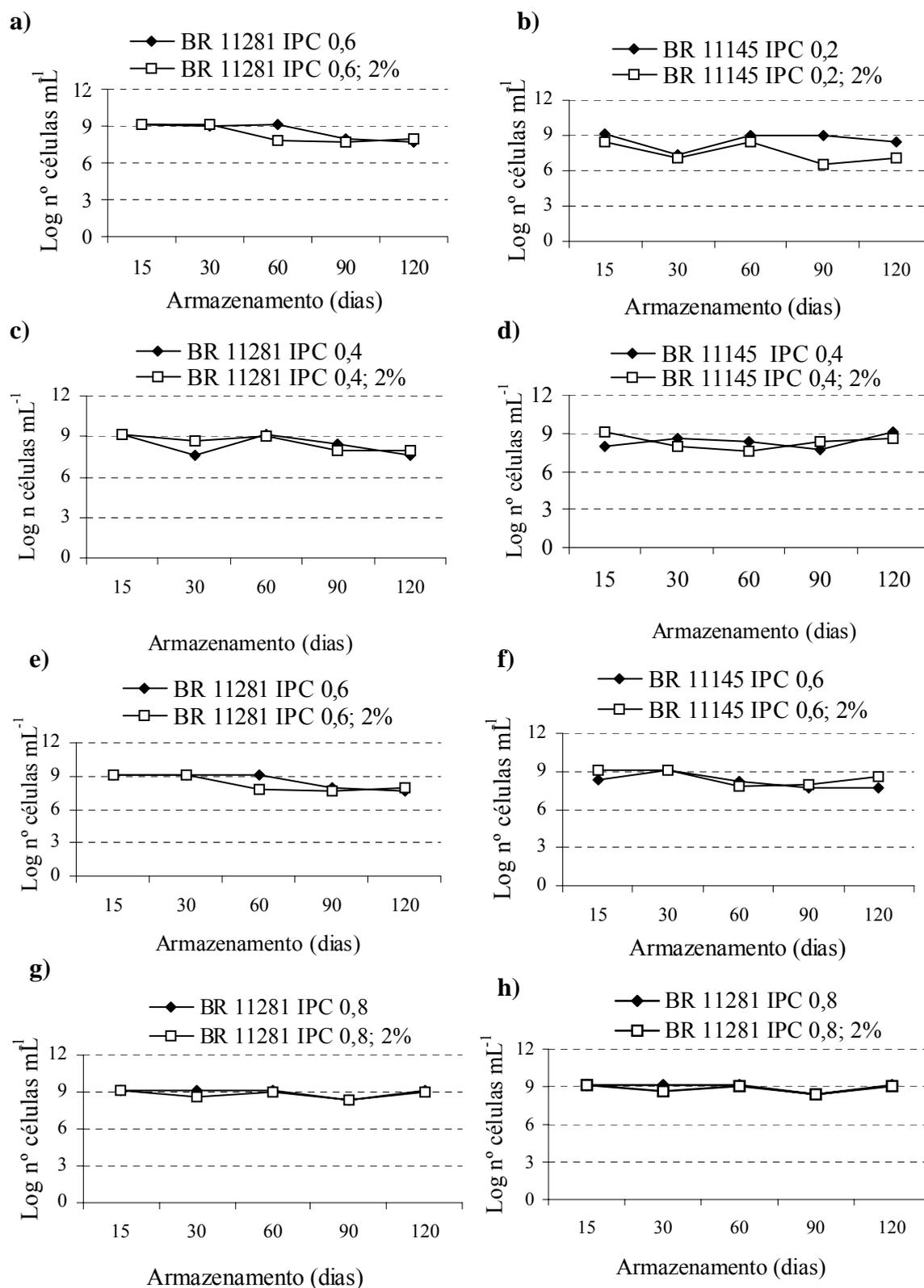


Figura 6. Sobrevivência das bactérias endofíticas BR11281 e BR11145 no veículo inoculante polimérico IPC 0,2 (a), IPC 0,4 (c), IPC 0,6 (e) e IPC 0,8 (g) sem e com compatibilizante MgO a 2%, por um período de armazenamento de até 120 dias após a inoculação a 24°C

Rohr, (2007) estudando a sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* estirpe BR 3267 na mistura polimérica, carboximetilcelulose e amido, por um período de 90 dias após a inoculação da bactéria sugere que para um melhor desempenho da sobrevivência dos microrganismos em veículos poliméricos deve-se melhorar a estabilidade dimensional e a compatibilidade dos polímeros com os microrganismos, estudando a adição de novas substâncias como surfactantes e íons estratégicos como, molibdênio e estanho. Neste mesmo estudo as misturas poliméricas foram compatibilizadas com ZnO e MgO e esterilizados por autoclavagem onde o autor sugere como proposta de futuros estudos, a observação sobre possível formação de novas substâncias químicas após autoclavagem das amostras, devendo ser avaliada.

De acordo com Rohr, (2007) a carboximetilcelulose (CMC) é um polímero modificado da celulose com características de polieletrólitos, com associações e interações específicas entre as suas cadeias e o solvente (água), além de formar gel. O amido é um polímero natural formado por duas estruturas distintas: amilose, cadeia linear, e a amilopectina, cadeia ramificada, forma gel e apresenta o fenômeno de retrogradação que é o agrupamento das cadeias após um tempo de sua solubilização. O amido e a CMC são polímeros distintos entre si com relação a sua estrutura, tipos de interações, solubilização e características reológicas. Assim a mistura entre esses polímeros com água, forma com o passar do tempo um sistema heterogêneo indicando uma imiscibilidade. Esse problema pode ser contornado adicionando à mistura entre eles, íon, como o MgO que promove interações no sistema de modo que ocorra uma compatibilidade no sistema.

Pandey & Maheshwari, (2007) estudando uma bioformulação contendo diferentes espécies bacterianas como *Burkholderia* sp, estirpe MSSP, *Sinorhizobium meliloti* estirpe PP3, *Rhizobium leguminosarum* estirpe Pec e *Bacillus* sp. estirpe B1, verificaram que, a presença de outras bactérias na bioformulação não promoveu efeito deletério para a viabilidade da estirpe MSSP de *Burkholderia* sp. nos veículos de baixo custo.

4.2 Sobrevivência dos Microrganismos Endofíticos Individualizados nos Polímeros como Veículos de Inoculação

Baseado nos resultados anteriores, com melhor desempenho da mistura das estirpes BR11281 e BR11145 no veículo polimérico IPC 0,8 por manter o número de células viáveis em relação às diversas misturas poliméricas ao redor de 10^9 células mL⁻¹ do inoculante até 120 de armazenamento, este foi selecionado para a segunda fase de testes. Neste caso, como a sobrevivência variou no tempo quando as estirpes foram aplicadas em conjunto, este ensaio testou cada componente do inoculante de forma individual (Tabela 3).

Foi verificado que a estirpe BR11281 apresentou viabilidade das células em torno de 10^9 com pH variando de 2,8 a 6,9 nos veículos inoculantes testados até 30 dias de avaliação. A partir deste período, os valores populacionais por grama ou mililitro dos três inoculantes apresentaram queda populacional ao redor de 10^8 células g⁻¹ com valores de pH na faixa de 3,8 a 6,6 aos 60 dias de avaliação. Foi observado queda populacional mais acentuada no veículo polimérico líquido para 10^6 células mL⁻¹ com pH 6,5 e nos demais veículos testados os valores populacionais foram ao redor de 10^7 a 10^8 com pH 5,7 a 6,9 aos 90 dias.

Para a estirpe BR11335 foi observado viabilidade das células superior a 10^9 com valores de pH entre 7,1 a 8,2 dependendo do veículo inoculante testado aos 15 dias. Foi observado declínio populacional mais acentuado com valores populacionais ao redor de 10^8 no veículo polimérico gel pH 7,6 e inóculo misto pH 8,7, para o veículo polimérico líquido a viabilidade foi ao redor de 10^6 com pH 7,9 até 60 dias. A partir deste período foi observado aumento populacional ao redor de 10^8 e pH 8,1 no veículo polimérico líquido e população ao redor de 10^8 e pH 7,5 para o veículo polimérico gel, entretanto a viabilidade das células ficou

abaixo do nível de detecção do método empregado (NMP) e elevado valor de pH 9,2, no veículo inóculo misto.

Para a estirpe BR11504 os valores populacionais foram superior a 10^9 para os veículos polímero gel e inóculo misto com pH 7,1 e 8,3, respectivamente. Entretanto a viabilidade das células foi ao redor de 10^8 e pH 7,8 para o polímero líquido aos 15 dias. A partir deste período os valores populacionais apresentaram queda mais acentuada por mililitro ou grama dos inoculantes até 90 dias. Com relação à estirpe BR11145, esta apresentou viabilidade das células superior a 10^9 para os veículos polímero gel pH 6,6 e inóculo misto pH 6,0. Para o veículo polimérico líquido a viabilidade das células foi em torno de 10^8 e mantida nestes valores apenas até os 15 dias após a inoculação. A partir deste período, os valores populacionais por grama ou mililitro dos dois inoculantes apresentaram queda mais acentuada até os 90 dias após a inoculação.

A estirpe BR11366 apresentou viabilidade das células ao redor de 10^9 para os veículos polímero gel pH 6,5 e inóculo misto pH 5,3, no veículo polimérico líquido a viabilidade das células foi em torno de 10^7 e mantida nestes valores apenas até os 15 dias após a inoculação. A partir deste período, os valores populacionais dos inoculantes apresentaram flutuação com queda mais acentuada até os 90 dias após a inoculação.

No que se refere ao pH do meio de crescimento, a maioria das bactérias apresenta caráter neutrófilo crescendo na faixa que vai de 6,0 a 8,0. *Gluconacetobacter diazotrophicus* que faz parte do grupo das bactérias do ácido acético, consegue sobreviver em pH em torno de 3,0 (Dobereiner et al., 1995). A sobrevivência desses microrganismos em ampla faixa de pH requer a secreção de diferentes enzimas, que possam tornar o pH do ambiente a ser colonizado, ideal para o seu crescimento (Gomes, 2003).

Embora a sobrevivência de células em substratos utilizados como veículo de bactérias esteja relacionado com a composição do substrato e o metabolismo celular de cada microrganismo, devem ser consideradas as características de cada microrganismo no processo de maturação e estocagem do inoculante (Roughley & Vincent, 1967).

As relações entre as estirpes testadas nos diferentes veículos de inoculação foram demonstradas por Sparrow & Ham (1983) quando avaliaram a viabilidade de duas estirpes de *Rhizobium phaseoli* (CIAT75 e CIAT3644) em seis veículos de inoculação estocados à temperatura ambiente e a 4°C. A estirpe CIAT75 apresentou maior viabilidade no inoculante quando o armazenamento foi feito à temperatura ambiente, enquanto a viabilidade da estirpe CIAT3644 em inoculantes estocados a 4°C não diferiu daquela observada à temperatura ambiente.

Tabela 3. Sobrevivência dos microrganismos endofíticos em Log do número de células g⁻¹ ou mL⁻¹ nos veículos poliméricos líquido IPC 0,8, gel IPC 2,2 e do inóculo misto por um período de armazenamento de 90 dias após a inoculação (DAI) a 24°C.

Estirpes	Veículos inoculante e pH					
	Líquido (IPC 0,8)	pH	Gel (IPC 0,8)	pH	Meio de cultivo	pH
15 DAI						
BR 11281	8,95	5,1	9,06	6,4	8,60	2,9
BR 11335	9,95	7,5	10,48	7,1	9,60	8,2
BR 11504	8,40	7,8	10,78	7,1	9,65	8,3
BR 11145	8,40	5,8	10,60	6,6	9,60	6,0
BR 11366	7,78	4,8	9,60	6,5	8,95	5,3
30 DAI.						
BR 11281	8,95	6,7	9,06	6,9	9,15	2,8
BR 11335	7,60	7,8	8,95	7,6	8,60	8,7
BR 11504	8,60	7,9	8,85	7,4	7,60	8,8
BR 11145	8,48	6,0	8,65	6,7	7,60	6,2
BR 11366	8,95	4,8	8,60	6,6	9,40	5,5
60 DAI.						
BR 11281	8,60	6,5	7,60	6,6	7,98	3,8
BR 11335	6,40	7,9	8,60	7,4	6,95	8,8
BR 11504	7,60	7,9	8,95	7,3	7,60	8,8
BR 11145	8,85	6,0	8,60	6,4	7,60	6,3
BR 11366	8,40	4,9	8,40	6,3	8,98	5,5
90 DAI.						
BR 11281	6,48	6,5	7,48	6,9	8,18	5,7
BR 11335	7,95	8,1	7,88	7,5	0	9,2
BR 11504	6,10	8,1	7,98	4,4	0	9,0
BR 11145	0	6,0	7,78	6,8	7,60	6,2
BR 11366	7,95	4,7	7,30	6,7	8,65	5,5

Legenda: O valor 0 indica abaixo do nível de detecção.

Fernandes Jr. (2006) avaliou a sobrevivência de células de *Bradyrhizobium japonicum* estirpe BR 3267 por um período de noventa dias a temperatura ambiente, inoculadas em mistura polimérica a base de carboximetilcelulose (CMC) e amido em diferentes proporções, com e sem agente compatibilizante (1% ZnO e MgO). Neste ensaio o autor observou que a sobrevivência do microrganismo foi de 9,0 unidades logarítmicas de células g⁻¹ do produto para duas misturas distintas, compatibilizadas com 1% de MgO até 90 dias de avaliação.

Vendan & Thangaraju, (2007) com a produção de um bioinoculante líquido baseado na formação de células císticas de *Azospirillum* verificaram que o bioinoculante promoveu a sobrevivência das células por 390 dias de avaliação com uma população de 9,0 unidades logarítmicas por mililitro do produto.

Ferreira et al. (2003) selecionando os veículos turfoso, oleoso e caldo bacteriano para inoculante com estirpes previamente selecionadas de *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 (BR11417) e *Burkholderia* spp. Estirpe M130 (BR11340) e as variedades de arroz IR42 e IAC4440, verificaram que o número de células viáveis ficou em torno de 10⁸ células g⁻¹ ou mL⁻¹ para o inoculante turfoso e oleoso, respectivamente aos 110 dias de armazenamento e o caldo bacteriano apresentou valor inferior aos 30 dias após o preparo.

PARTE II: Experimentos na casa-de-vegetação

4.3 Experimento I - Aplicação do Inóculo misto, Polímero gel e a Mistura dos dois contendo Microrganismos Endofíticos nas Plântulas de Cana-de-açúcar

4.3.1 Produção de fitomassa seca total e acúmulo de nitrogênio total nas plântulas

A análise de variância revelou para as variáveis analisadas aos 50 dias após a inoculação efeito significativo ($p < 0,1$), contribuindo para o incremento da fitomassa seca, nitrogênio total acumulado e número de brotações (Tabela 4). A aplicação do inóculo misto, polímero gel (IPC 2,2) e a mistura dos dois promoveu acúmulos significativos da fitomassa seca por caixa, da parte aérea e de raízes em relação às plântulas controle. Entretanto o mesmo comportamento não foi observado para o acúmulo de fitomassa seca nos mini toletes quando comparados ao controle. Para o número de brotações foi observado que a aplicação dos tratamentos de inoculação proporcionou maior número de brotações quando comparado ao controle. Com relação ao nitrogênio total, foi verificado que os tratamentos de inoculação proporcionaram acúmulos significativos nos mini toletes e na parte aérea, mas sem efeito para o nitrogênio nas raízes. Para a altura das plântulas não foi verificado diferença entre os tratamentos aplicados. Os feitos observados após a inoculação podem ter sido facilitados pelo tratamento térmico dos mini toletes, que além de contribuir para diminuição dos microrganismos fitopatogênicos, promove uma redução da microbiota associada aos toletes (Reis et al, 1994), embora favoreça a diminuição da taxa de germinação de algumas variedades (Kimati et al., 2005).

Tabela 4. Aplicação do inóculo misto, polímero gel (IPC 2,2) e a mistura dos dois sobre a fitomassa seca, brotações, altura e nitrogênio total acumulado nas plântulas da var. RB72454 de cana-de-açúcar aos 50 dias após a inoculação

Tratamentos	Fitomassa seca (g caixa ⁻¹)			Brotações (nº caixa ⁻¹)
	Mini toletes	Parte aérea	Raízes	
Controle	54,3*	3,3 b	2,2 b	4,2 b
Inóculo misto	53,6	5,3 a	4,8 a	5,0 a
Polímero gel (IPC 2,2)	56,6	6,2 a	5,1 a	5,3 a
Mistura dos dois	52,0	6,5 a	4,9 a	5,7 a
c.v. (%)	9,3	22,3	16,7	14,5
Tratamentos	Nitrogênio total (mg caixa ⁻¹)			Altura (cm)
	Mini toletes	Parte aérea	Raízes	
Controle	565 b	1,99 b	39 *	42 *
Inóculo misto	606 a	2,42 a	43	38
Polímero gel (IPC 2,2)	632 a	2,45 a	50	44
Mistura dos dois	658 a	2,47 a	38	38
c.v. (%)	18,9	5,4	2,2	31,0

Médias seguidas por diferente letra minúscula na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, $p < 0,1$. Dados de fitomassa seca dos mini toletes foram transformados por $\text{Log}_{10}(Y)$; * = não significativo

A inoculação de bactérias fixadores de nitrogênio e promotoras do crescimento vegetal tem promovido o aumento na produção de matéria seca e absorção de nitrogênio (Nayak et al. 1986; Murty & Ladha. 1988; Gunarto et al. 1999). Suman et al. (2005) verificaram que a

inoculação das estirpes ISI100, 107, 111, 112, 113, 120 e 121 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* por imersão dos mini toletes da variedade CoSe92423 de cana-de-açúcar durante 24 h influenciou positivamente a germinação, brotação e altura das plântulas aos 90 dias após a inoculação, onde os valores de germinação ficaram ao redor de 10,89% a 23,66%, os números de brotações foram de 16,8 a 54,16% e altura das plantas de 26,0-0,32% acima do controle.

Diferentes concentrações de inóculo bacteriano misto podem expressar diferentes respostas sobre a promoção do crescimento das plantas de cana-de-açúcar como observado por Canuto (2008) quando testou mini toletes da variedade RB72454 de cana-de-açúcar tratados termicamente a 50°C por 30 min e inoculados por imersão, durante duas horas com as concentrações 10^3 , 10^6 e 10^9 células por mL do inóculo e avaliadas aos 45 dias após a inoculação. O autor observou que as plantas que receberam o inóculo misto na concentração 10^3 células mL⁻¹ tiveram seu crescimento superior as demais concentrações de bactérias aplicadas à variedade.

Recente estudo realizado por Marques Jr et al. (2008) verificaram que mini toletes tratados termicamente e imersos por 12 h em meio de cultura Dyg's líquido contendo *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54 (10^8 células mL⁻¹) e ácidos húmicos (20 mg L⁻¹ de C de AH isolados de vermicomposto) promoveram o crescimento, aumento da biomassa da parte aérea e das raízes das plântulas em relação ao controle do cultivar RB72454 de cana-de-açúcar.

Além da cana-de-açúcar, a inoculação com estirpes selecionadas de *Azospirillum amazonense* estirpes BR11755, BR11746, BR 11833 e BR11752 promoveram o crescimento da planta, o acúmulo de nitrogênio e a contribuição para a FBN na cultura do arroz (Rodrigues et al 2008). Na figura 7 está apresentado o crescimento radicular promovido pela aplicação dos polímeros contendo bactérias endofíticas nas plântulas e aspectos internos dos mini-toletes após a inoculação comparados ao controle sem inoculação da variedade RB72454 de cana-de-açúcar.

a)



b)



c)



Figura 7. a) Crescimento radicular das plântulas de cana-de-açúcar promovido pela aplicação do polímero contendo bactérias endofíticas, b) Aspecto interno do mini tolete após a aplicação do polímero contendo bactérias endofíticas, c) Aspecto interno do mini tolete controle

4.3.2 Colonização dos microrganismos endofíticos inoculados nas plântulas de cana-de-açúcar

a) *Gluconacetobacter diazotrophicus* BR 11281

A colonização de *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe BR11281 nas plântulas inoculadas e avaliadas em diferentes épocas de coletas até 50 dias após a inoculação, está apresentada na Figura 8.

Foi observado que o tratamento de inoculação utilizando a mistura dos inoculantes proporcionou uma colonização ao redor de 5,5 unidades logarítmicas g⁻¹ de massa fresca para a estirpe BR11281 no momento da inoculação com ligeiro crescimento atingindo um valor populacional ao redor de 6,0 unidades logarítmicas aos 30 dias, se estabilizando aos 50 dias após a inoculação. Esse comportamento pode ser explicado pela presença de fontes de carbono prontamente disponíveis, advindas dos veículos inoculantes como a carboximetilcelulose, amido e sacarose e que durante a colonização das bactérias tenha ocorrido síntese de amilases e celulasas tendo favorecido a degradação das fontes de carbono e assim estimulando a multiplicação e sobrevivência celular. Esses resultados sugerem que *G. diazotrophicus* é uma espécie que tem capacidade de sobreviver e manter populações elevadas mesmo em condições de limitação nutricional da planta, se desenvolvendo apenas com as reservas do próprio colmo através da quebra dos açúcares. Comportamento semelhante foi verificado quando aplicado o tratamento de inoculação utilizando o inóculo misto. Entretanto com menores valores populacionais. Para o tratamento de inoculação utilizando o polímero gel foi observada uma população da estirpe BR11281 ao redor de 5,5 unidades logarítmicas no momento do plantio tendendo a crescimento populacional provavelmente devido a fatores já mencionados, seguido de queda e tendendo a crescimento populacional. Essa flutuação populacional pode ter sido causada pela presença das demais estirpes empregadas nos inoculantes (BR11335, BR11145, BR11504, BR11145 e BR11366).

No controle foi observado que o tratamento térmico promoveu redução da carga bacteriana naturalmente presente e demonstra que a carga microbiana inicial de *Gluconacetobacter* deve ser alta nos colmos de cana-de-açúcar. Entretanto a população bacteriana se manteve presente e estável ao longo das avaliações. Essa presença de *G. diazotrophicus* no controle, mesmo após tratamento térmico, demonstra que esta espécie pode ser resistente ao tratamento térmico curto (52°C por 30 min). Observações semelhantes foram feitas por Reis (1991) com tratamento térmico curto em toletes das variedades CB453, NA5679, SP711406, CO997 e SP701143 de cana-de-açúcar, demonstrando que este tipo de prática fitossanitária não afetou a presença do referido gênero, ficando entre 10⁴ e 10⁶ células por grama de raízes e parte aérea das plântulas aos 10 dias após o plantio.

Estudos realizados por Perin (2003) sobre a colonização de *G. diazotrophicus* em diferentes variedades de cana-de-açúcar mostraram uma população da referida bactéria em torno de 10⁵ e 10⁶ células g⁻¹ de plântulas dos 30 aos 88 dias após o plantio, cujo declínio populacional foi observado dos 117 aos 152 dias após o plantio, onde se conclui que o provável motivo para a queda do número de células observado pode estar relacionado com o estado nutricional da planta.

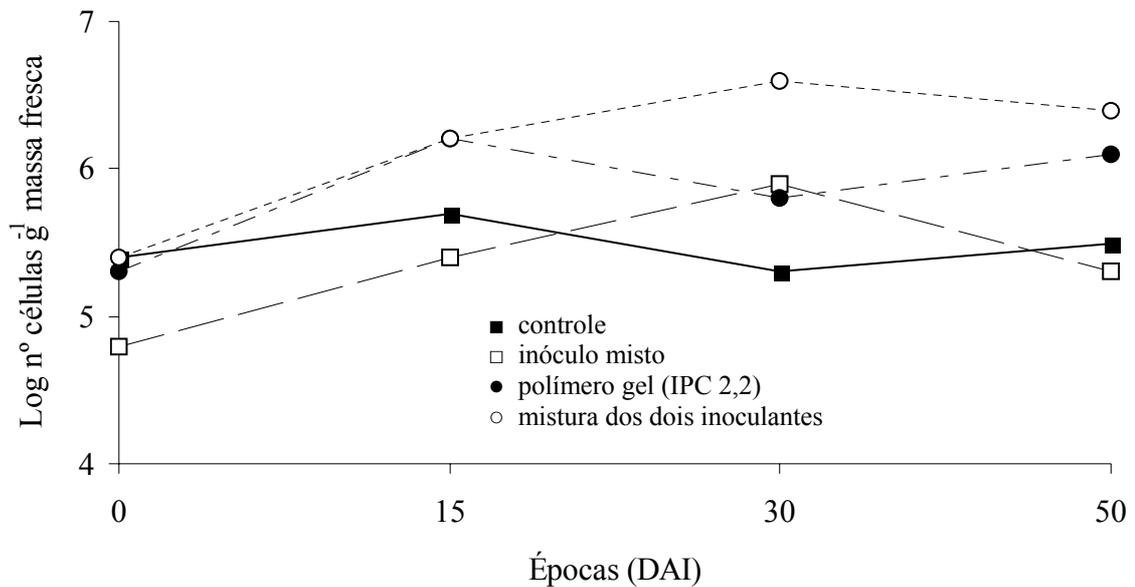


Figura 8. Contagem do número de células de *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe BR 11281 por grama de massa fresca (Log) de cana-de-açúcar, var. RB72454, até 50 dias após a inoculação. Valores médios de três repetições

Suman et al. (2005) testaram mini toletes da variedade CoSe92423 de cana-de-açúcar da Índia, inoculados com estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* na concentração de 10^8 células mL⁻¹ por um período de 24 h e adubadas com 3 níveis de nitrogênio, 0, 75 e 150 kg, por um período de 90 dias após a inoculação e verificaram que a população de *G. diazotrophicus*, medida pela técnica do NMP, aumentou de 10^2 a 10^4 vezes nos tecidos das plantas inoculadas quando comparadas ao controle, e que a população da bactéria foi maior no tratamento utilizando 75 kg de nitrogênio quando comparados aos tratamentos utilizando 0 e 150 kg de nitrogênio ha⁻¹.

b) *Herbaspirillum seropedicae* BR11335

A colonização de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe BR11335 nas plântulas inoculadas e avaliadas em diferentes épocas até 50 dias após a inoculação, está apresentada na Figura 9. A colonização da espécie de *Herbaspirillum seropedicae*, independente do tratamento, apresentou menor valor populacional no momento da inoculação, com exceção para a mistura dos inoculantes que proporcionou maior valor populacional ao redor de 5,0 unidades logarítmicas g⁻¹ massa fresca, provavelmente devido a uma maior carga bacteriana favorecida pela mistura dos dois inoculantes, em seguida apresentou crescimento populacional aos 15 dias após a inoculação, e novamente a mistura dos inoculantes apresentou maior valor populacional que foi ao redor de 6,0 unidades logarítmicas g⁻¹ massa fresca, mantendo-se estável ao longo das coletas, independente do tratamento aplicado, provavelmente devido à presença de fontes de carbono prontamente disponível.

O tratamento não inoculado apresentou colonização de *Herbaspirillum* inferior apenas no plantio. Essa baixa presença inicial da população pode ser explicada devido aos mesmos motivos apresentados no figura 8. e no caso desta espécie mostrando alta sensibilidade. Entretanto, a mesma foi capaz de se restabelecer endofiticamente ao longo das avaliações.

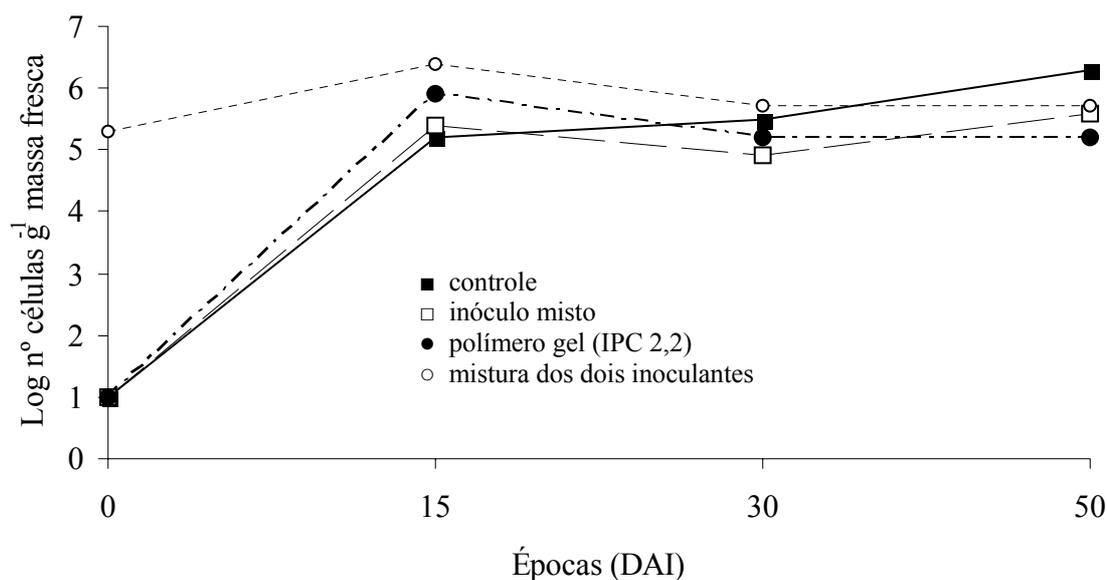


Figura 9. Contagem do número de células de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe BR 11335 por grama de massa fresca (Log) de cana-de-açúcar, var. RB72454 até 50 dias após a inoculação. Valores médios de três repetições

c) *Herbaspirillum rubrisubalbicans* BR 11504

A colonização de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe BR11504 nas plântulas inoculadas e avaliadas em diferentes épocas de coletas até 50 dias após a inoculação, está apresentada na Figura 10. A colonização da espécie de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, considerando o controle, polímero gel e o inóculo misto apresentaram menores valores populacionais no momento do plantio, seguido de crescimento populacional até 15 dias, provavelmente devido aos mesmos motivos apresentado na figura 8, tendendo a queda populacional aos 50 dias, provavelmente devido ao estado nutricional e processos fisiológicos e bioquímicos que ocorrem durante a brotação da planta influenciando na colonização bacteriana que apresentou queda mais acentuada no controle. Observou-se uma diferença populacional promovida pelos veículos inoculantes utilizados, evidenciando que a mistura dos inoculantes proporcionou maior valor populacional, que foi ao redor de 6,0 unidades logarítmicas g^{-1} de massa fresca aos 15 dias, quando demonstrou queda populacional aos 50 dias após a inoculação.

O controle apresentou colonização de *Herbaspirillum* inferior apenas ao tratamento de inoculação utilizando a mistura dos inoculantes no plantio. Essa presença inicial menos expressiva do microrganismo no controle, pode ser explicada pelo mesmo motivo já apresentado para as outras estirpes, citado anteriormente (Figuras 8 e 9). Esta espécie também demonstrou elevada sensibilidade ao tratamento térmico, ficando abaixo do nível de detecção do método empregado (número mais provável). Entretanto, esta população foi capaz de se restabelecer, apresentando queda mais acentuada aos 50 dias após a inoculação.

Nos estudos de inoculação conduzidos por Njoloma et al. (2008) com *Herbaspirillum* sp estirpe B501 gfp1 sob as concentrações do inoculo 10^2 e 10^8 células ml^{-1} , em duas variedades NiF8 e Ni15 de cana-de-açúcar japonesa, obtiveram como resultado cerca de $2,4 \times 10^7$ células g^{-1} nos tecidos das plantas da variedade Ni15 inoculadas com a maior concentração bacteriana aos 28 dias após a inoculação.

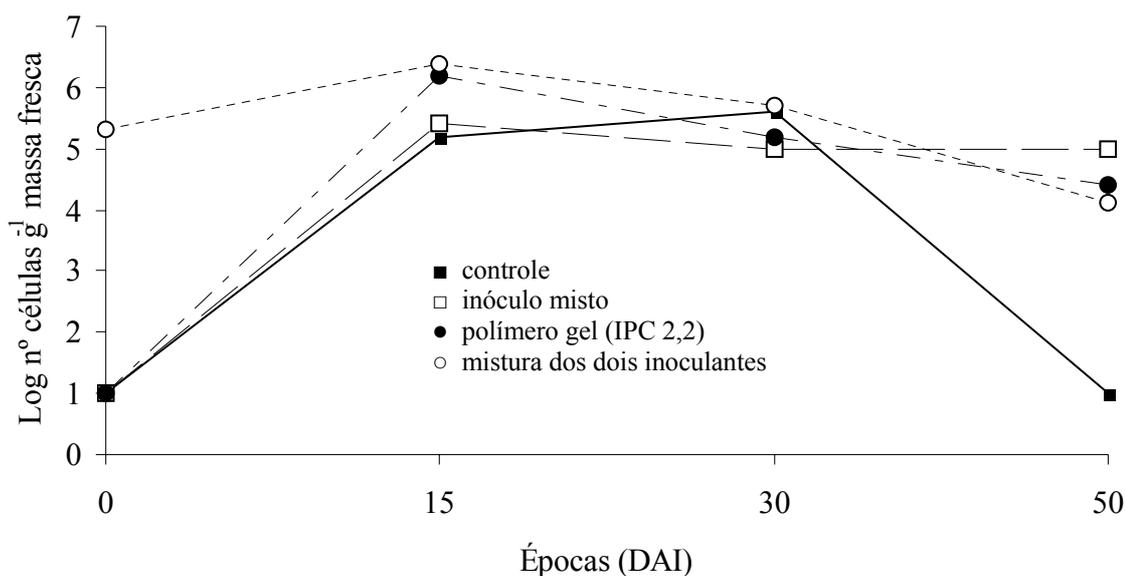


Figura 10. Contagem do número de células de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe BR 11504 por grama de massa fresca (Log) de cana-de-açúcar, var. RB72454 até 50 dias após a inoculação. Valores médios de três repetições

Zakria et al. (2008) também utilizando a estirpe *Herbaspirillum* sp estirpe B501 gfp1, inoculadas pelo método de infiltração a vácuo em toletes das variedades NiF8 e Ni15 de cana-de-açúcar, observaram que a densidade populacional imediatamente após a inoculação foi de 10^7 células g⁻¹ de tecidos frescos, mostrando que a estirpe B501gfp1 entrou com sucesso nos tecidos dos colmos da variedade Ni15, onde sua presença foi confirmada por microscopia e a população bacteriana inoculada permaneceu estável por um período de cinco dias após a inoculação.

d) *Azospirillum amazonense* BR 11145

A colonização de *Azospirillum amazonense* (Figura 11) apresentou valores populacionais ao redor de 5,0 unidades logarítmicas g⁻¹ massa fresca para os tratamentos de inoculação aos 15 dias e se manteve estável ao longo do período de avaliação, provavelmente devido aos mesmos motivos apresentados na Figura 8. De modo geral pode ser verificado que a espécie foi capaz de colonizar as plântulas de cana-de-açúcar var. RB72454 ao longo do período de avaliação.

O controle não apresentou células viáveis de *Azospirillum amazonense* ficando abaixo do nível de detecção do método empregado (número mais provável), por ocasião do plantio. Essa baixa presença inicial da população, naturalmente presente nos toletes de cana-de-açúcar, pode ser explicada devido aos mesmos motivos apresentados na Figura 8 e no caso desta espécie mostrando alta sensibilidade, de modo que a mesma foi capaz de se restabelecer e colonizar as plântulas até 50 dias após a inoculação.

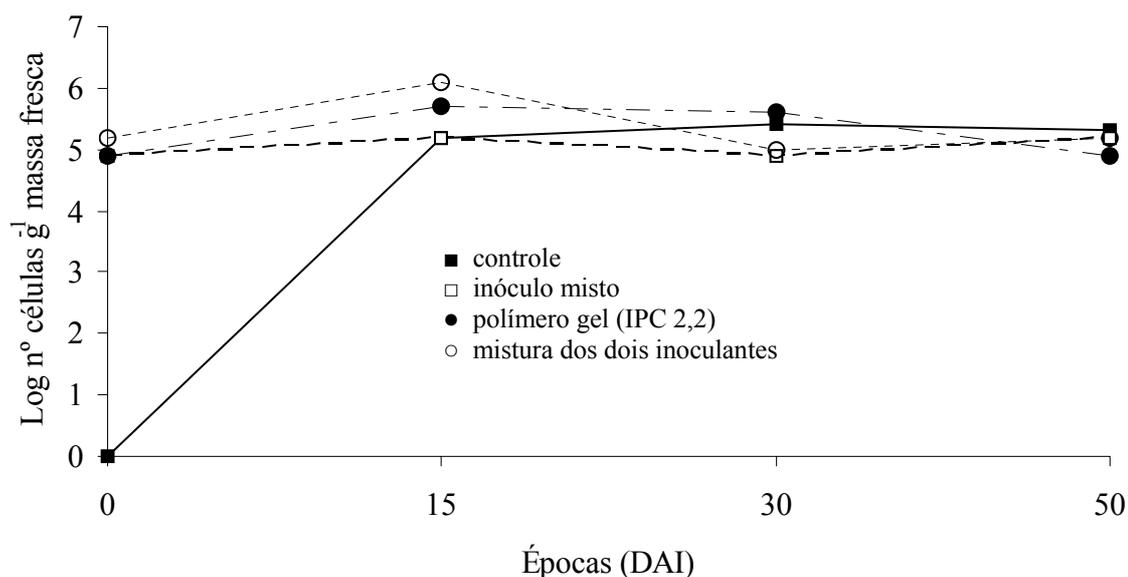


Figura 11. Contagem do número de células de *Azospirillum amazonense* estirpe BR 11145, por grama de massa fresca (Log) de cana-de-açúcar, var. RB72454 até 50 dias após a inoculação. Valores médios de três repetições.

e) *Burkholderia tropica* BR11366

A colonização de *Burkholderia tropica* estirpe BR11366, está apresentada na Figura 12. Foi observado elevada população bacteriana em todos os tratamentos no plantio. Houve maior crescimento populacional verificado no inoculante polimérico gel provavelmente devido a presença de carboximetilcelulose e amido no inoculante que podem ter sido degradadas e utilizadas pela bactéria sendo observado valores populacionais ao redor de 6,0 unidades logarítmicas aos 15 dias, apresentando queda populacional e tendendo a crescimento populacional verificado aos 50 dias após a inoculação.

Os tratamentos inóculo misto e a mistura dos dois inoculantes tenderam a um crescimento até 30 dias, apresentando queda populacional acentuada aos 50 dias, provavelmente por esgotamento de nutrientes disponível para as bactérias, nesta fase inicial de desenvolvimento das plântulas.

O controle apresentou colonização crescente de *Burkholderia*. Essa presença inicial do microrganismo no controle pode ser explicada, pelo mesmo motivo já apresentado anteriormente na figura 8. Embora no caso deste gênero, mostrando menor sensibilidade ao tratamento térmico.

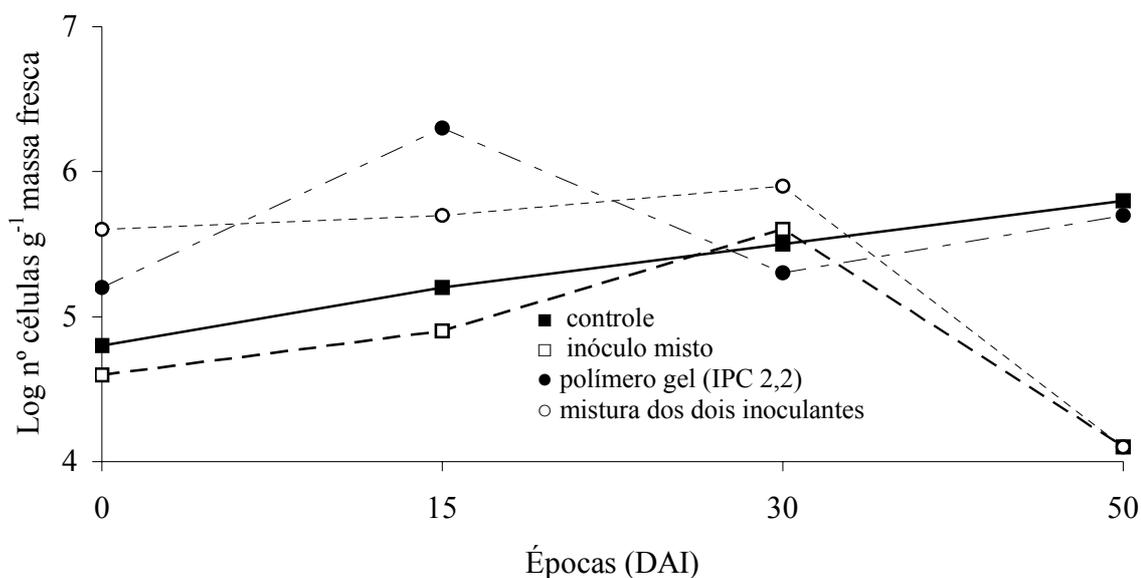


Figura 12. Contagem do número de células de *Burkholderia tropica* estirpe BR 11366, por grama de massa fresca (Log) de cana-de-açúcar, var. RB72454 até 50 dias após a inoculação. Valores médios de três repetições

Muthukumarasamy et al. (2006), avaliando a colonização de bactérias endofíticas de *Burkholderia vietnamiensis* estirpe MG43 e *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe ATCC 49037 na variedade Co86032 micropropagada de cana-de-açúcar e avaliadas aos 60, 90, 120 e 180 dias após a inoculação, detectaram para a estirpe MG43 uma população de $1,12 \times 10^5$ células g^{-1} de plântulas frescas até 180 dias, para a estirpe ATCC 49037 uma população de $1,12 \times 10^5$ células g^{-1} de plântulas frescas até 120 dias, sofrendo queda populacional para $4,35 \times 10^4$ células g^{-1} de plântulas frescas aos 180 dias. A mistura das duas estirpes apresentou uma população de $1,12 \times 10^5$ células g^{-1} de plântulas frescas dos 60 aos 120 dias sofrendo queda populacional para $4,35 \times 10^4$ células g^{-1} de plântulas frescas aos 180 dias após a inoculação.

4.4 Experimento II - Aplicação do Inóculo Misto e dos Polímeros contendo Microrganismos Endofíticos nas Plântulas de Cana-de-açúcar

4.4.1 Produção de fitomassa seca total e acúmulo de nitrogênio total nas plântulas

A análise de variância revelou para as variáveis analisadas aos 50 dias após a inoculação efeito de tratamento significativo ($p < 0,1$) sobre o acúmulo de fitomassa seca, nitrogênio total e brotações das plântulas conforme Tabela 5.

Foi observado que o inóculo misto e o polímero gel (IPC 2,2) contendo a mistura bacteriana, inoculados nos mini toletes da variedade RB72454 de cana-de-açúcar, apresentaram resposta positiva à inoculação sobre o acúmulo de fitomassa seca por caixa respectivamente, promovendo um aumento médio de 14% na fitomassa seca dos mini toletes, de 68% na fitomassa seca da parte aérea, de 70% na fitomassa seca das raízes e de 58% no número de brotações em relação ao controle. Aplicando o inoculante polimérico líquido (IPC 0,8) foi observado efeito sobre o acúmulo de fitomassa seca de raízes, sem efeito para o acúmulo de fitomassa seca de mini toletes e parte aérea por caixa.

Tabela 5. Aplicação do inóculo misto, polímero gel (IPC 2,2) e polímero líquido (IPC 0,8) sobre o acúmulo de fitomassa seca, brotações, altura e nitrogênio total das plântulas de cana-de-açúcar var. RB72454 aos 50 dias após a inoculação

Tratamentos	Fitomassa seca (g caixa ⁻¹)			Brotações (nº caixa ⁻¹)
	Mini toletes	Parte aérea	Raízes	
Controle	1,7 b	2,5 b	3,5 b	3,4 b
Inóculo misto	1,9 a	3,9 a	6,6 a	5,5 a
Polímero gel (IPC 2,2)	2,0 a	4,4 a	5,9 a	5,3 a
Polímero líquido (IPC 0,8)	1,7 b	2,9 b	5,3 a	5,3 a
c.v. (%)	4,5	38,4	32,1	12,6

Tratamentos	Nitrogênio total (mg caixa ⁻¹)			Altura (cm)
	Mini toletes	Parte aérea	Raízes	
Controle	658 b	94 b	46 b	50*
Inóculo misto	1130 a	211 a	64 a	57
Polímero gel (IPC 2,2)	1164 a	204 a	65 a	64
Polímero líquido (IPC 0,8)	604 b	204 a	57 a	65
c.v. (%)	28,9	27,7	30,8	20,2

Médias seguidas por diferente letra minúscula na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, $p < 0,1$. Dados de fitomassa seca dos mini toletes foram transformados por $\text{Log}_{10}(Y)$; * = não significativo.

Oliveira et al. (2002) testando sete diferentes combinações das bactérias utilizadas neste estudo observou efeito fisiológico sobre o desenvolvimento de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar por um período de 45 dias após a inoculação, resultando no incremento da razão matéria seca de raízes e parte aérea quando comparado às plântulas não inoculadas.

Canuto et al. (2003) selecionando bactérias endofíticas para inoculação em cana-de-açúcar micropropagadas por um período de 180 dias em vasos com solo, observou que a inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL3, *Azospirillum amazonense* estirpe BR11145 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC80 promoveu um aumento significativo no acúmulo de massa seca de colmos de cana, enquanto que o maior acúmulo de N-total nos tecidos foi observado coma a inoculação de *A. amazonense* estirpe BR11145, *H. seropedicae* estirpes BR11417, BR11335 e da mistura de *G. diazotrophicus* estirpe BR11281 x *H. rubrisubalbicans* estirpe BR11504.

A inoculação combinada ou não de *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe T8 e *Herbaspirillum* sp estirpe H22 promoveram o aumento da biomassa da cana-de-açúcar variedade Co86032 por um período de 45 dias após a inoculação em solo de textura média (Muthukumarasamy et al. 2006).

Em culturas como o arroz inundado, Guimarães, (2001) verificou que as estirpes BR11366 de *Burkholderia tropica* e as estirpes M4 e BR11504 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* não promoveu aumentos significativos na matéria seca das plantas dos cultivares Guarani, IR42 e IAC 4440.

4.4.2 Colonização dos microrganismos endofíticos inoculados nas plântulas de cana-de-açúcar

Os dados de colonização dos microrganismos inoculados nos mini toletes da variedade RB72454 encontram-se na Tabela 6. Foi possível quantificar células viáveis nos tecidos das plântulas, indicando ter havido a colonização dos microrganismos endofíticos em todos os tratamentos aos 50 dias após inoculação. Foi observada uma diferença significativa entre os valores populacionais das estirpes colonizando as plântulas, com menor população para

Azospirillum amazonense estirpe BR11145 quando foi aplicado o inóculo misto, entretanto o mesmo comportamento não foi verificado entre os valores populacionais das diferentes espécies inoculadas utilizando o polímero gel (IPC 2,2) e o polímero líquido (IPC 0,8), com valores populacionais que variaram de 4,4 a 5,4 Log do número de células g⁻¹ plântulas frescas.

O tratamento não inoculado apresentou diferença significativa entre as estirpes nativas colonizando as plântulas, com menor valor populacional para a estirpe RB11366 quando comparado às demais estirpes. Essa presença dos microrganismos no controle, mesmo após tratamento térmico curto, demonstrou sua capacidade de restabelecimento no habitat endofítico por um período de 50 dias de avaliação.

Tabela 6. População de microrganismos endofíticos colonizando plântulas de cana-de-açúcar, var. RB72454, aos 50 dias após a inoculação. Valores médios de três repetições

Bactérias	Controle	Inóculo misto	Polímero gel (IPC 2,2)	Polímero líquido (IPC 0,8)
Log do número de células g ⁻¹ de plântulas frescas				
BR 11281	4,8 a	4,7 a	5,4 *	5,3 *
BR 11335	4,8 a	5,2 a	5,0	5,2
BR 11504	4,8 a	4,7 a	4,8	4,3
BR 11145	4,6 a	2,0 b	4,9	4,8
BR 11366	3,6 b	5,0 a	5,0	4,4
c.v..%	15,7			

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si a pelo teste de Skott Knott, p>0,1. Dados transformados por Log10(Y); * = não significativo

Oliveira et al. (2009) avaliando a colonização do mesmo inóculo misto utilizado neste estudo, em plântulas micropropagadas da variedade SP701143 de cana-de-açúcar através da técnica do NMP, verificaram que todas as espécies inoculadas foram encontradas colonizando endofiticamente os tecidos das plântulas com população mais elevada para *Azospirillum amazonense* que mostrou um aumento populacional de 100 vezes na colonização e *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia tropica* foi quantificado em 10⁷ células por grama de raízes frescas.

Canuto, (2008) avaliando a colonização das bactérias endofíticas BR11281, BR11335 e BR11145 por inoculação simples e mista nos toletes de cana-de-açúcar var RB72454, verificou que a inoculação mista proporcionou um menor número de células presentes nos tecidos vegetais do que quando inoculadas em inóculo simples. A maior população observada foi de 5,18 Log do n° de células por grama de massa fresca de raiz para a estirpe de *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL5, valores próximos ao encontrado na Tabela 7 deste estudo. O autor sugere que a inoculação mista tenha promovido alguma interação entre as bactérias inoculadas e/ou genótipo vegetal, reduzindo o nível populacional individual das bactérias inoculadas.

PARTE III: Experimentos de campo

4.5 Experimento I - Aplicação de Microrganismos Endofíticos na Cana-planta e do Polímero contendo Microrganismos Endofíticos na Reinoculação da Cana-soca Cultivadas no Planossolo

4.5.1 Produtividade de colmos de cana-de-açúcar

Na cana-planta (Figura 13) a inoculação das bactérias fixadoras de nitrogênio “in vitro”, proporcionou resposta significativa sobre a produtividade de colmos frescos ao redor de 160 Mg ha⁻¹ para a variedade RB867515, com um aumento de 30 Mg ha⁻¹ em relação ao controle absoluto e de 20 Mg ha⁻¹ na comparação com o controle adubado com 120 kg N ha⁻¹. A variedade RB72454 quando inoculada “in vitro” e utilizando o inóculo misto apresentou um incremento na produtividade de colmos ao redor de 10% e 7% em relação ao controle absoluto e de 3% e 7% em relação ao controle nitrogenado, respectivamente. Entretanto, nas condições do ensaio, e em decorrência do teste estatístico aplicado, não houve diferença significativa para este parâmetro (produtividade de colmos).

Na cana-soca (Figura 13) a reinoculação das bactérias fixadoras de nitrogênio utilizando o polímero gel IPC 2,2, promoveu aumentos significativos na produtividade de colmos para a variedade RB72454 com rendimento ao redor de 105 Mg ha⁻¹ de colmos frescos, com um aumento de 24 Mg ha⁻¹ em relação ao controle absoluto. A variedade RB867515 quando reinoculada com as bactérias utilizando o polímero IPC 2,2, apresentou um incremento na produtividade de colmos ao redor de 11%. Entretanto, nas condições do ensaio, e em decorrência do teste estatístico aplicado, não houve diferença significativa para este parâmetro (produtividade de colmos).

Analisando comparativamente cana-planta e cana-soca podemos observar que, a reinoculação aplicando-se o polímero gel IPC 2,2, contendo as bactérias endofíticas, proporcionou melhor desempenho para a variedade RB72454 demonstrado pelo efeito da reinoculação sobre a produtividade de colmos frescos quando comparada à inoculação utilizando-se o inóculo misto na cana-planta, avaliada por um período de 17 meses após a inoculação. Esses resultados sugerem que a variedade RB72454 seja precoce para os efeitos observados aos 10 meses após a reinoculação. A variedade RB867515 mostrou comportamento semelhante tanto com a aplicação do inóculo misto quanto na aplicação do polímero gel IPC 2,2, contendo as bactérias endofíticas, na reinoculação.

Oliveira et al. (2006) estudando a resposta da inoculação “in vitro” da mistura de cinco bactérias, as mesmas utilizadas neste trabalho, sobre a produtividade de colmos frescos das variedades SP701143 e SP813250 de cana-de-açúcar, observou que a inoculação e a reinoculação mostraram melhores efeitos sobre a promoção do crescimento das plantas no solo de baixa fertilidade natural, classificados como Planossolo por um período de dezessete meses após a inoculação e doze meses após a reinoculação, sem uso de adubação nitrogenada quando comparado ao solo de alta fertilidade natural, classificado como Terra Roxa Estruturada.

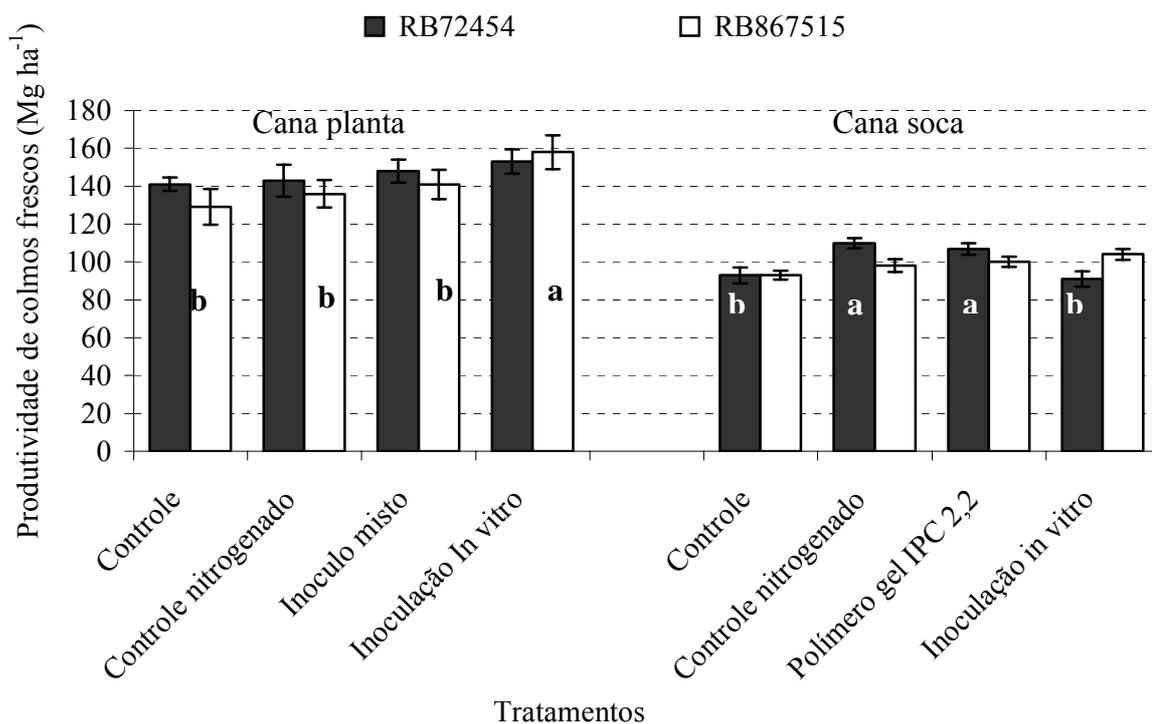


Figura 13. Produtividade de colmos frescos das variedades de cana-planta aos 17 meses após a inoculação, plantio: 09/03/2006 e cana-soca aos 10 meses após a reinoculação. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com $p > 0,1$. Linhas verticais em cima das colunas representam o erro padrão da média. Colunas sem letra indicam não significativo

Prado Jr. (2008) testando duas variedades de cana RB72454 e IACSP936006 inoculadas com bactérias diazotróficas a campo, obteve resposta significativa para a var. RB72454 inoculada com uma concentração ao redor de 10^7 células mL^{-1} de *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe BR11281, por pulverização no momento do corte no sulco de plantio, sobre a produtividade de colmos, favorecida tanto pela presença de N como pela inoculação. Já a var. IACSP 936006 apresentou diferenças entre os tratamentos apenas com 15% de significância.

Respostas positivas da inoculação com bactérias diazotróficas, sobre a produtividade da cana foi verificado por, Shankariah & Husingi (2001) onde a inoculação com *Azospirillum brasilense* promoveu um incremento de $9 Mg ha^{-1}$ e de $5 Mg ha^{-1}$ quando da inoculação com *Gluconacetobacter diazotrophicus* na cultura. Em alguns estudos, tem sido verificada a falta de resposta à inoculação, como observado por Canuto et al. (2003) mostrando que a resposta à inoculação é bastante variável e parece ser dependente de vários fatores incluindo o genótipo da planta e o ambiente.

É válido ressaltar que as variedades mantiveram níveis adequados de produtividade independente do tratamento, pois em cana-soca sabe-se que os rendimentos de colmos são menores quando comparados à produtividade de colmos em cana-planta. Xavier (2006) fazendo um estudo comparativo entre oito variedades comerciais e duas variedades não comerciais, utilizadas em estudos de melhoramento vegetal de cana-de-açúcar quanto à produtividade e potencialidade para a fixação biológica de nitrogênio (FBN) por um período de cinco ciclos da cultura encontrou produtividades na cana primeira soca que oscilaram entre

25 Mg ha⁻¹ para a variedade, não comercial, Chunnee até 112 Mg ha⁻¹ para a variedade comercial SP792312.

4.5.2 Produção de fitomassa seca de cana-de-açúcar

Os dados referentes à produção de fitomassa seca de colmo, ponteiro, palha e o total de fitomassa seca produzida pela cana-planta são apresentados na Figura 14. Foi observado que a inoculação “in vitro” e a aplicação do inóculo misto promoveu maior produção de fitomassa seca de colmos para a variedade RB867515, ao redor de 52 e 48 Mg ha⁻¹, respectivamente o que correspondeu a um aumento de 7 Mg ha⁻¹ promovidos pela inoculação “in vitro” e 2 Mg ha⁻¹ advindos da aplicação do inóculo misto, comparado ao controle absoluto e 13 Mg ha⁻¹ com a inoculação “in vitro”, comparado ao controle adubado com 120 kg N ha⁻¹. Na produção de fitomassa seca de ponteiros, foi verificado que a inoculação “in vitro” promoveu reposta significativa com aumento de 11 Mg ha⁻¹ para a variedade RB72454, o que representou um acréscimo de 2,4 Mg ha⁻¹ e 1,7 Mg ha⁻¹ em relação aos controles absoluto e nitrogenado.

Quanto à produção de fitomassa seca total, foi verificado que a inoculação “in vitro” e a aplicação do inóculo misto proporcionou uma produção de 81 e 73 Mg ha⁻¹, respectivamente para a variedade RB867515, sendo observado um aumento de 12 Mg ha⁻¹ e 4 Mg ha⁻¹ proporcionados pela inoculação “in vitro” e aplicação do inóculo misto em relação ao controle absoluto. Quando comparados ao controle adubado, os valores foram de 14 e 6 Mg ha⁻¹ respectivamente.

Na cana-soca (Figura 15) foi observado que a variedade RB72454 respondeu a aplicação do polímero gel IPC 2,2 contendo as bactérias na reinoculação, com efeito significativo na produção de fitomassa seca dos colmos, ponteiros e total. Foi verificado um aumento de 4 Mg ha⁻¹ para a produção de fitomassa seca dos colmos. Na produção de fitomassa seca de ponteiros foi verificado que a variedade RB72454 respondeu a reinoculação com aplicação do polímero gel contendo as bactérias. Entretanto, não diferindo dos controles. No que se refere aos valores de fitomassa seca total foi observado que a reinoculação promoveu maior produção de fitomassa para a variedade RB72454 de 64 Mg ha⁻¹ com aumento de 7 Mg ha⁻¹ em relação ao controle absoluto. De modo geral, os valores totais de acúmulo de fitomassa seca oscilaram entre 57 a 64 Mg ha⁻¹ para a variedade RB72454 e de 50 a 58 Mg ha⁻¹ para a variedade RB867515.

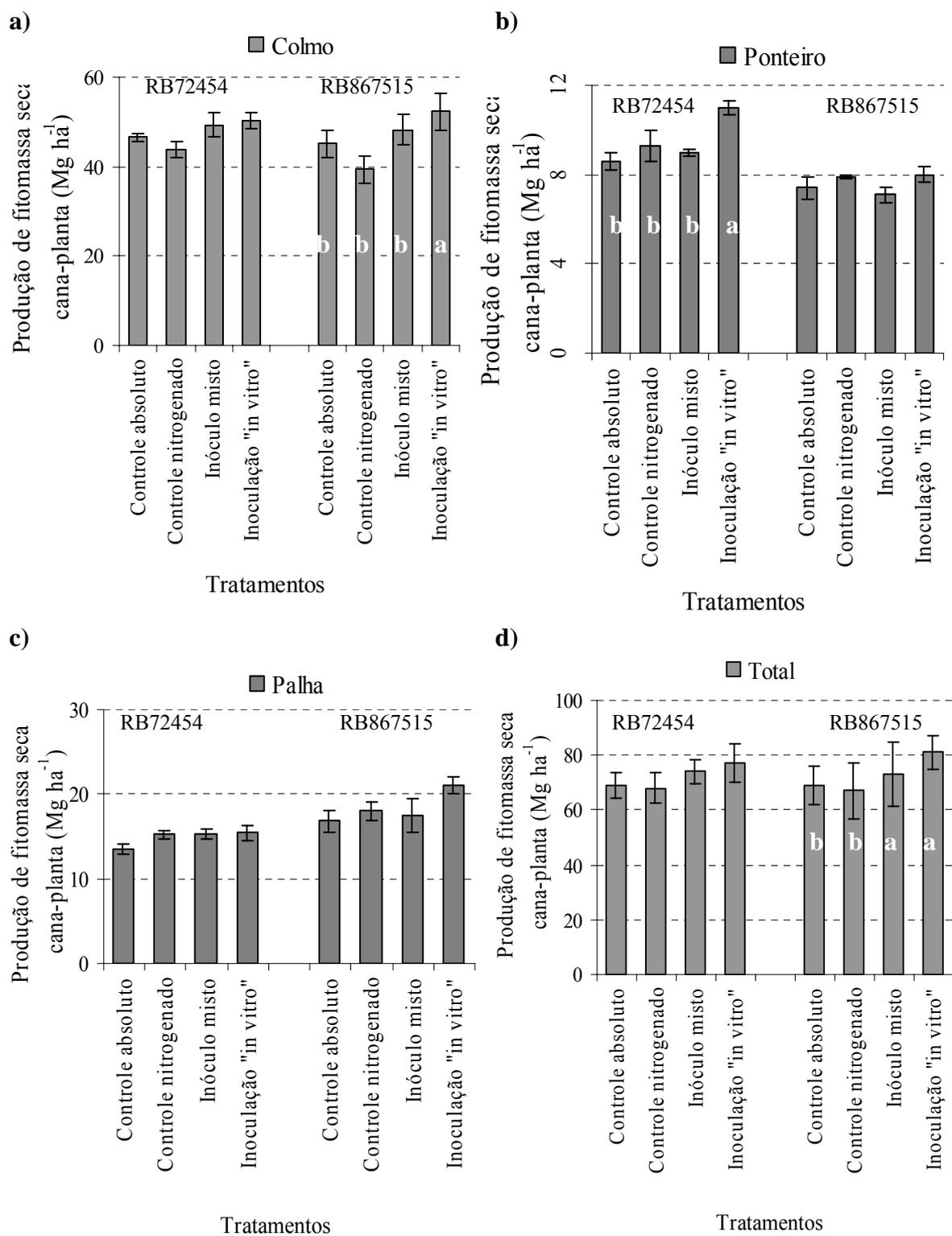


Figura 14. Produção de fitomassa seca de colmo (a), ponteiro (b), palha (c) e total (d) das variedades de cana-planta aos 18 meses após a inoculação. Diferenças estatísticas pelo teste de Scott-Knott com $p < 0,15$. Linhas verticais em cima das colunas representam o erro padrão da média. Colunas sem letra indicam não significativo

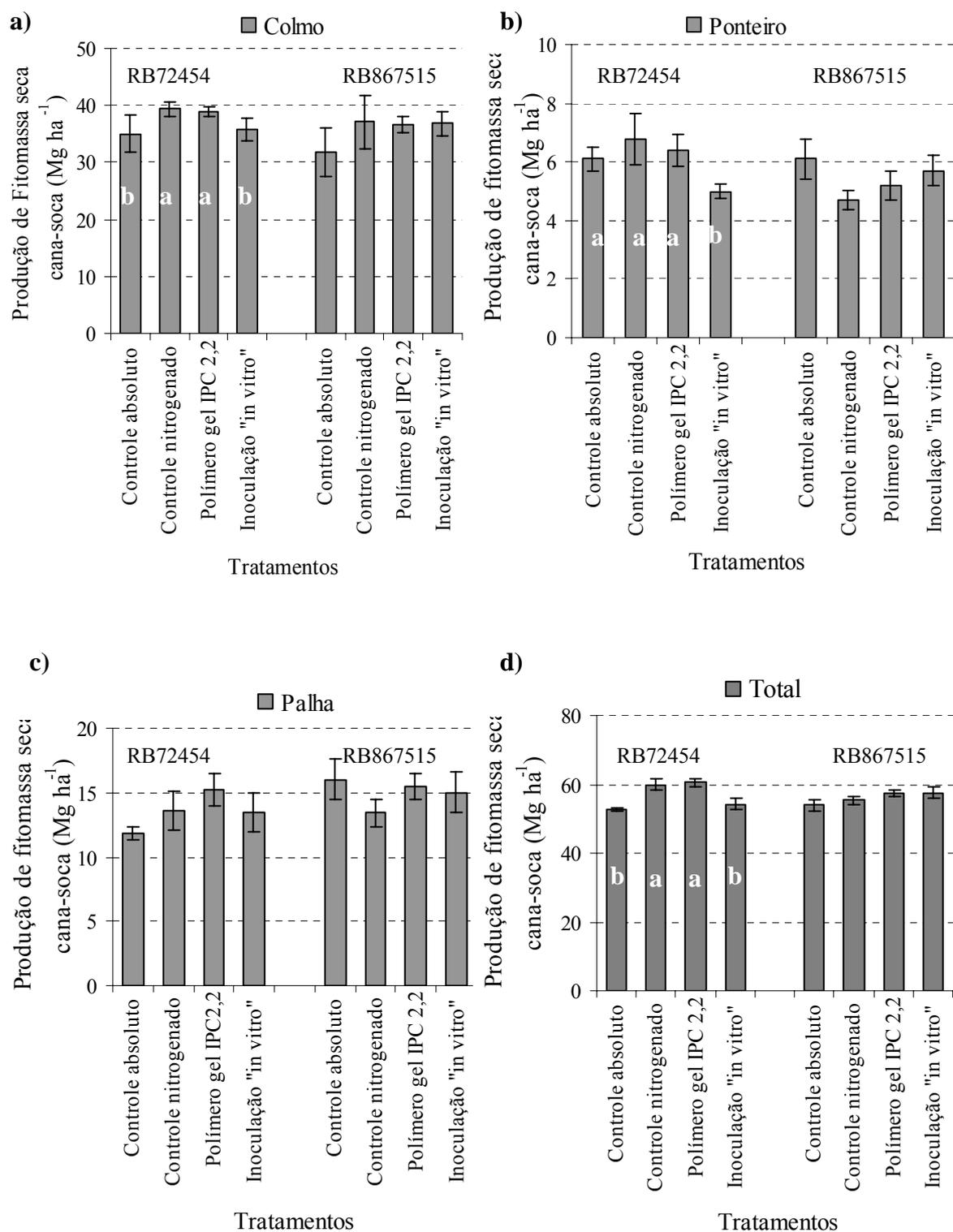


Figura 15. Produção de fitomassa seca de colmo (a), ponteiros (b), palha (c) e total (d) das variedades de cana-soca após a reinoculação. Diferenças estatísticas pelo teste de Scott-Knott com $p < 0,15$. Linhas verticais em cima das colunas representam o erro padrão da média. Colunas sem letra indicam não significativo pelo teste de Scott-Knott com $p < 0,15$

Essa produção significativa de fitomassa da variedade RB867515 confirma uma característica própria da variedade para altas produções de fitomassa. Essa variedade apresenta características botânicas como rápida velocidade de crescimento, porte alto, hábito de crescimento ereto, ampla adaptabilidade, boa estabilidade, alta densidade de colmos, boa despalha, conferindo a ela características desejáveis para os diferentes ambientes de produção (Pmgca, 2008).

4.5.3 Acúmulo de nitrogênio na cana-de-açúcar

Na cana-planta (Figura 16), a variedade RB72454, quando inoculada “in vitro” apresentou um incremento de N nos ponteiros ao redor de 33% tanto para o controle absoluto quanto na comparação com a variedade RB867515. Entretanto, nas condições do ensaio, e em decorrência do teste estatístico aplicado, não houve diferença significativa para este parâmetro (acúmulo de N). A variedade RB867515 quando inoculada “in vitro” apresentou um incremento de N na palha ao redor de 12% em relação ao controle absoluto. Entretanto, nas condições do ensaio, e em decorrência do teste estatístico aplicado, não houve diferença significativa para este parâmetro (acúmulo de N).

Quanto ao nitrogênio acumulado na parte aérea da cana-soca (Figura 17), a reinoculação da mistura de bactérias através do polímero gel IPC 2,2, proporcionou um acúmulo de nitrogênio nos ponteiros da variedade RB72454 de 70 kg N ha^{-1} , sendo superior aos controles absoluto e adubado com N, respectivamente em cerca de 11 e 10 kg N ha^{-1} . A variedade RB867515 quando reinoculada com aplicação do polímero gel apresentou um incremento ao redor de 11% em relação ao controle absoluto. Entretanto, nas condições do ensaio, e em decorrência do teste estatístico aplicado, não houve diferença significativa para este parâmetro (acúmulo de N).

A variedade RB72454 quando reinoculada com o polímero gel contendo as bactérias apresentou um incremento de N na palha ao redor de 23% e 15%, respectivamente em relação aos controles absoluto e adubado com N. A variedade RB867515 reinoculada apresentou um incremento de N na palha ao redor de 31% em relação ao controle absoluto sem efeito na comparação com o tratamento adubado com N. Entretanto, nas condições do ensaio, e em decorrência do teste estatístico aplicado, não houve diferença significativa para este parâmetro (acúmulo de N). A variedade RB72454 quando reinoculada apresentou um incremento no acúmulo total de N ao redor de 14% e 10%, respectivamente em relação aos controles absoluto e adubado com N. Entretanto, nas condições do ensaio, e em decorrência do teste estatístico aplicado, não houve diferença significativa para este parâmetro (acúmulo de N).

Estudos realizados por Resende, (2000); Polidoro et al. (2001); Boddey et al. (2001); Xavier, (2006), visando à seleção de variedades de cana com potencial para FBN foi verificado que a variedade RB72454 mostrou um efeito significativo no acúmulo de nitrogênio da parte aérea evidenciando o potencial desta variedade para a FBN em solos pobres em nitrogênio disponível.

Leite et al. (2008) estudando a inoculação da mistura de cinco bactérias, sobre o acúmulo de nitrogênio total das variedades RB72454 e RB867515 na região Norte Fluminense, verificaram que tanto a inoculação quanto a reinoculação não promoveram incrementos no conteúdo total de nitrogênio na parte aérea da plantas. Entretanto, foi verificado que a variedade RB72454 apresentou um acúmulo de 124 kg N ha^{-1} , sendo 15% superior ao da variedade RB867515. Em números absolutos, os autores observaram maiores acúmulos de N quando as variedades RB72454 e RB867515 foram cultivadas com uma adubação de 120 kg N ha^{-1} e com reinoculação dos toletes.

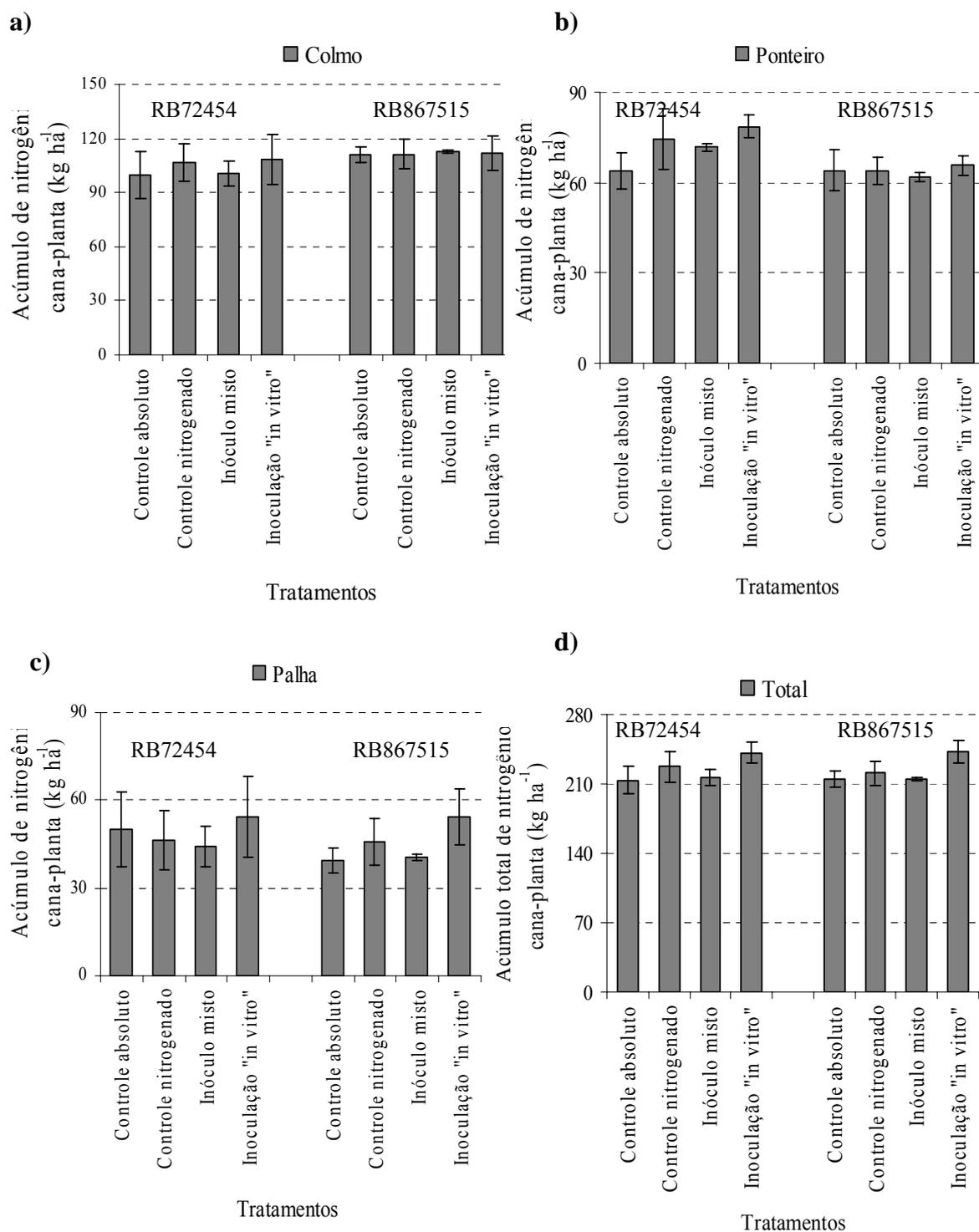


Figura 16. Acúmulo de nitrogênio no colmo (a), ponteiros (b), palha (c) e total (d) das variedades de cana-planta após a inoculação. Linhas verticais em cima das colunas representam o erro padrão da média. Colunas sem letra indicam não significativo pelo teste de Scott-Knott com $p > 0,15$

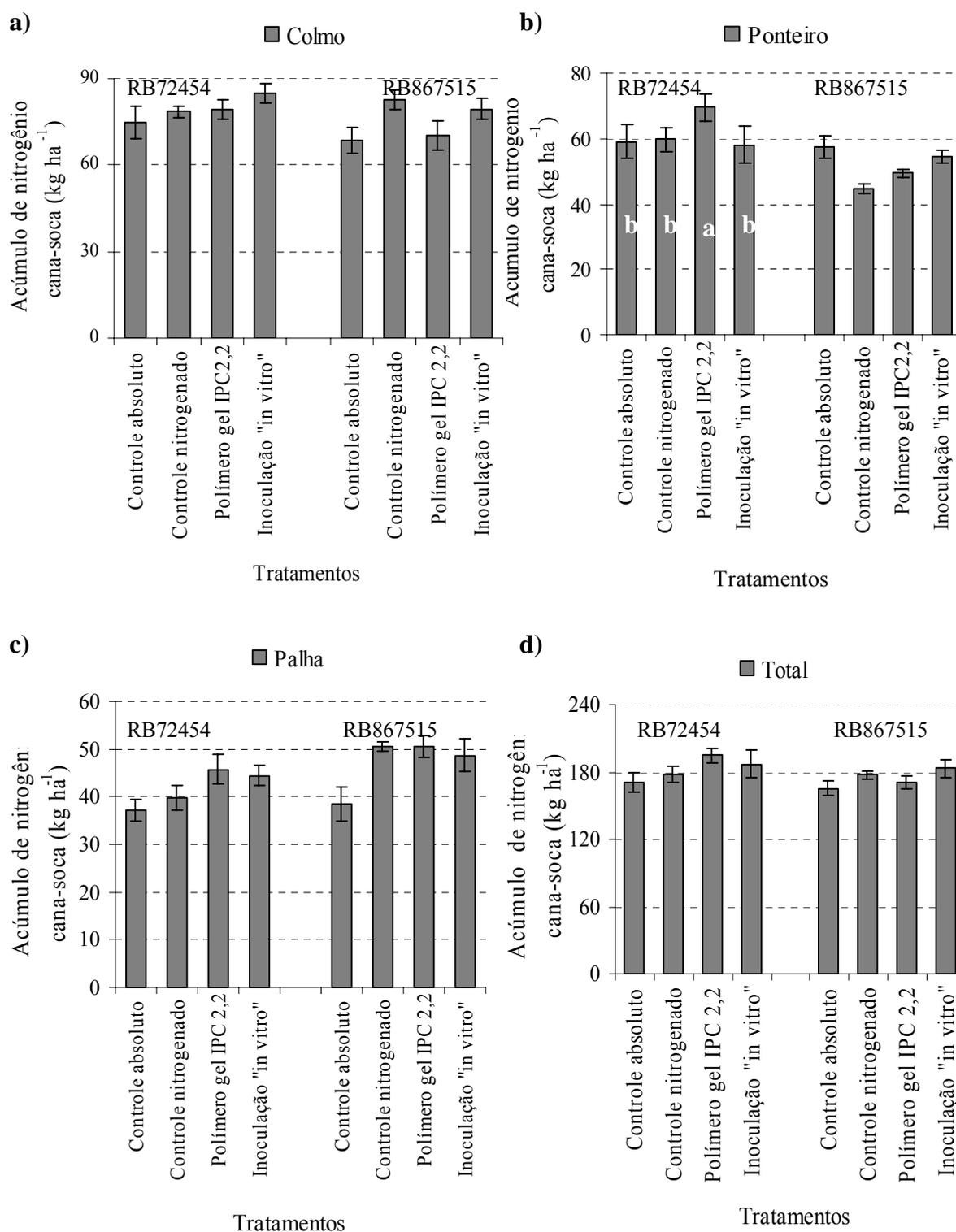


Figura 17. Acúmulo de nitrogênio no colmo (a), ponteiros (b), palha (c) e total (d) das variedades de cana-soca após a reinoculação. Colunas sem letra indicam não significativo pelo teste de Scott-Knott com $p > 0,15$. Linhas verticais em cima das colunas representam o erro padrão da média

4.6 Experimento II - Aplicação dos Polímeros contendo Microrganismos Endofíticos na Cana-de-açúcar Cultivada no Planossolo

4.6.1 Produtividade de colmos de cana-de-açúcar após a inoculação

Os dados de produtividade de colmos frescos de cana-planta das variedades em estudo, aos 11 meses após a inoculação, mostraram que houve efeito positivo da aplicação dos polímeros contendo as bactérias (Figura 18). Foi observado que a aplicação do polímero gel IPC 2,2 e do polímero líquido IPC 0,8 contendo as bactérias promoveram produtividade de colmos frescos da variedade RB72454 ao redor de 100 Mg ha⁻¹ com aumento médio de 21 Mg ha⁻¹ em relação ao controle absoluto. A variedade RB867515 quando submetida à aplicação dos polímeros IPC 2,2 e IPC 0,8 apresentou produtividade média de colmos ao redor de 109 Mg ha⁻¹ com incremento ao redor de 12% e 11%, respectivamente em relação aos controles absoluto e adubado com N. Entretanto, nas condições do ensaio, e em decorrência do teste estatístico aplicado, não houve diferença significativa para este parâmetro (produtividade de colmos).

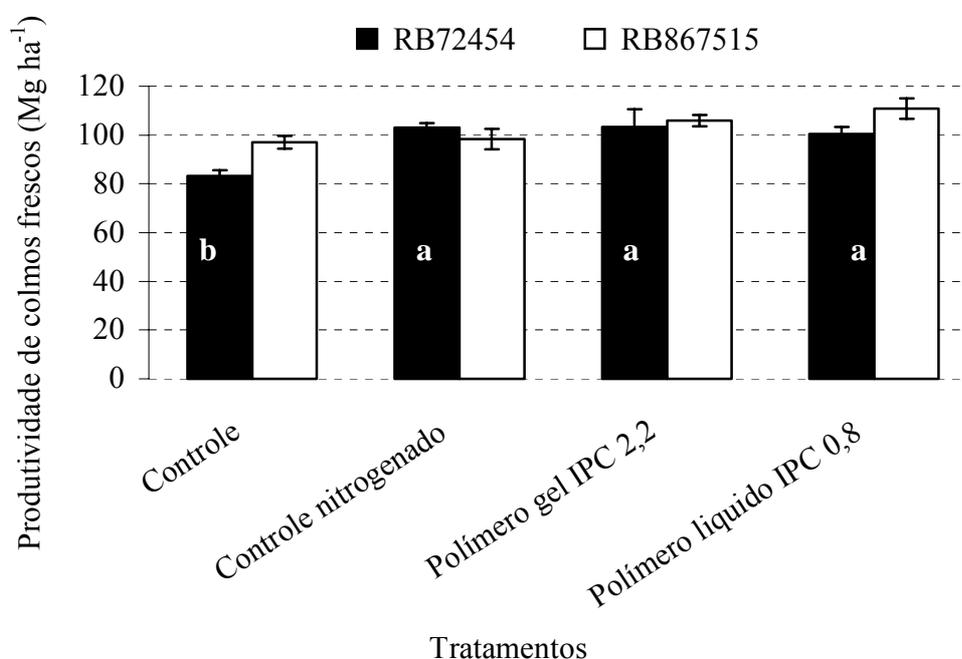


Figura 18. Produtividade de colmos frescos das variedades de cana-de-açúcar aos 11 meses após a aplicação dos polímeros IPC 2,2 e IPC 0,8, contendo bactérias endofíticas. Plantio: 01/09/2007. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com $p > 0,1$. Linhas verticais em cima das colunas representam o erro padrão da média. Colunas sem letra indicam não significativo

A resposta da aplicação dos inoculantes somente pode ser observado para a variedade RB72454, sugerindo que a variedade seja precoce para os efeitos da inoculação observados. A consistência na resposta dos tratamentos testados, observados para a variedade RB72454, não foram observados para a variedade RB867515.

Esses dados promissores sugerem a interação da variedade RB72454 com o inoculante nas condições testadas, independente do veículo utilizado e no solo extremamente pobre em N disponível e também pode estar confirmando mais uma vez à alta potencialidade para a FBN desta variedade, associada aos polímeros contendo bactérias endofíticas.

4.6.2 Produção de fitomassa seca e acúmulo de nitrogênio na cana-de-açúcar após a inoculação

Na figura 19 encontram-se os resultados referentes à produção de fitomassa seca das variedades em estudo. Foi observado que a aplicação dos polímeros gel IPC 2,2 e do líquido IPC 0,8 contendo a mistura das bactérias endofíticas promoveu as maiores produções de fitomassa seca de colmo, ponteiro, palha e fitomassa seca total para a variedade RB72454, com uma produção média de 41 Mg ha⁻¹ de colmos, 6 Mg ha⁻¹ de ponteiros, 11 Mg ha⁻¹ de palha e 58 Mg ha⁻¹ no valor total de fitomassa seca respectivamente, em relação aos controles indicando que a variedade RB72454 se beneficiou da inoculação das bactérias, sinalizando interação da variedade com o inoculante independente do veículo aplicado, nas condições do ensaio.

Os dados de acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas estão apresentados na Figura 20. A aplicação dos polímeros contendo as bactérias proporcionou, para a variedade RB72454, um acúmulo médio de nitrogênio nos colmos, palha e total de 39, 10 e 34 kg de N ha⁻¹, respectivamente em relação aos controles, indicando que esta variedade se beneficiou do nitrogênio advindo do ar em função da inoculação das bactérias, enquanto que a variedade RB867515 adubada com 120 kg N ha⁻¹ acumulou nos ponteiros, palha e total cerca de 6, 37 e 28 kg de N ha⁻¹, respectivamente em relação ao controle absoluto, indicando que esta variedade foi eficiente em acumular o nitrogênio proveniente da adubação nitrogenada.

De modo geral pode ser observado que a produção de fitomassa seca total basicamente acompanhou a produção de colmos. Em relação à fitomassa seca de palha vale ressaltar, que ainda é feito a queima desse material para facilitar a colheita da cana e com esta prática são perdidos entre 30 e 50 kg de nitrogênio por hectare (Resende, 2000).

Canuto et al. (2003) estudando a inoculação das estirpes BR11509, BR11281 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e BR11335, BR11380, BR11510 de *Herbaspirillum seropedicae*, sobre a produção de fitomassa seca total de cana-de-açúcar oriundas de sementes, cruzamento SP 70-1143 x Co421, verificaram que a inoculação das estirpes BR11509, BR11380 e BR11335 promoveram as maiores produções ao redor de 0,54 Mg ha⁻¹ de fitomassa seca sendo superior as plantas não inoculadas, porém inferior a produção de fitomassa seca das plantas adubadas.

Muthukumarasamy et al. (1999) avaliando a inoculação das estirpes T8 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e H22 de *Herbaspirillum* sp sobre a produção biomassa e acúmulo de nitrogênio nas plantas micropropagadas de cana-de-açúcar variedade Co 86032, verificaram que tanto a inoculação das estirpes como a inoculação das estirpes acompanhada de 50% da dose de 140 kg N ha⁻¹ promoveram maior acúmulo de biomassa que foi de 3,35 e 3,39 kg planta⁻¹ respectivamente e conteúdo de nitrogênio acumulado nas plantas que foi de 4,31 e 4,21 mg g⁻¹ de massa seca respectivamente, quando comparado as plantas fertilizadas com a dose recomendada de 280 kg N ha⁻¹ por um período de 180 dias após o plantio.

Estudos realizados por Urquiaga et al. (2003) visado à seleção de variedades comerciais de cana-de-açúcar com potencial para fixação biológica de nitrogênio mostraram que entre as dez variedades estudadas, houve um maior acúmulo total de nitrogênio na variedade RB 72-454 de 265 kg N ha⁻¹ em relação às outras cultivares.

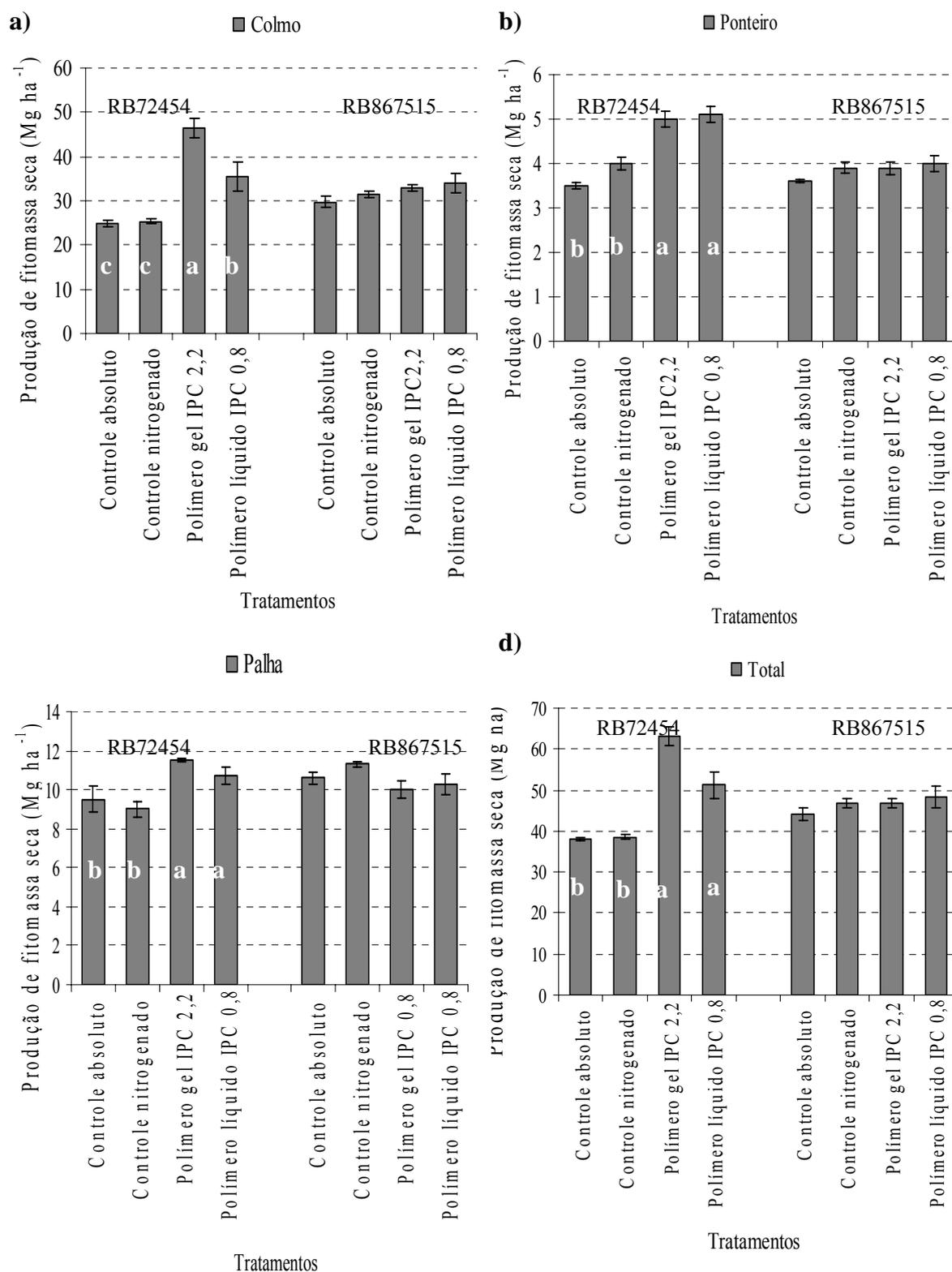


Figura 19. Produção de fitomassa seca de colmo (a), ponteiros (b), palha (c) e o total (d) das variedades de cana-de-açúcar aos 11 meses após a aplicação dos polímeros IPC 2,2 e IPC 0,8, contendo bactérias endofíticas. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas (por parte da planta), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com $p > 0,1$. Linhas verticais em cima das colunas representam o erro padrão da média. Colunas sem letra indicam não significativo

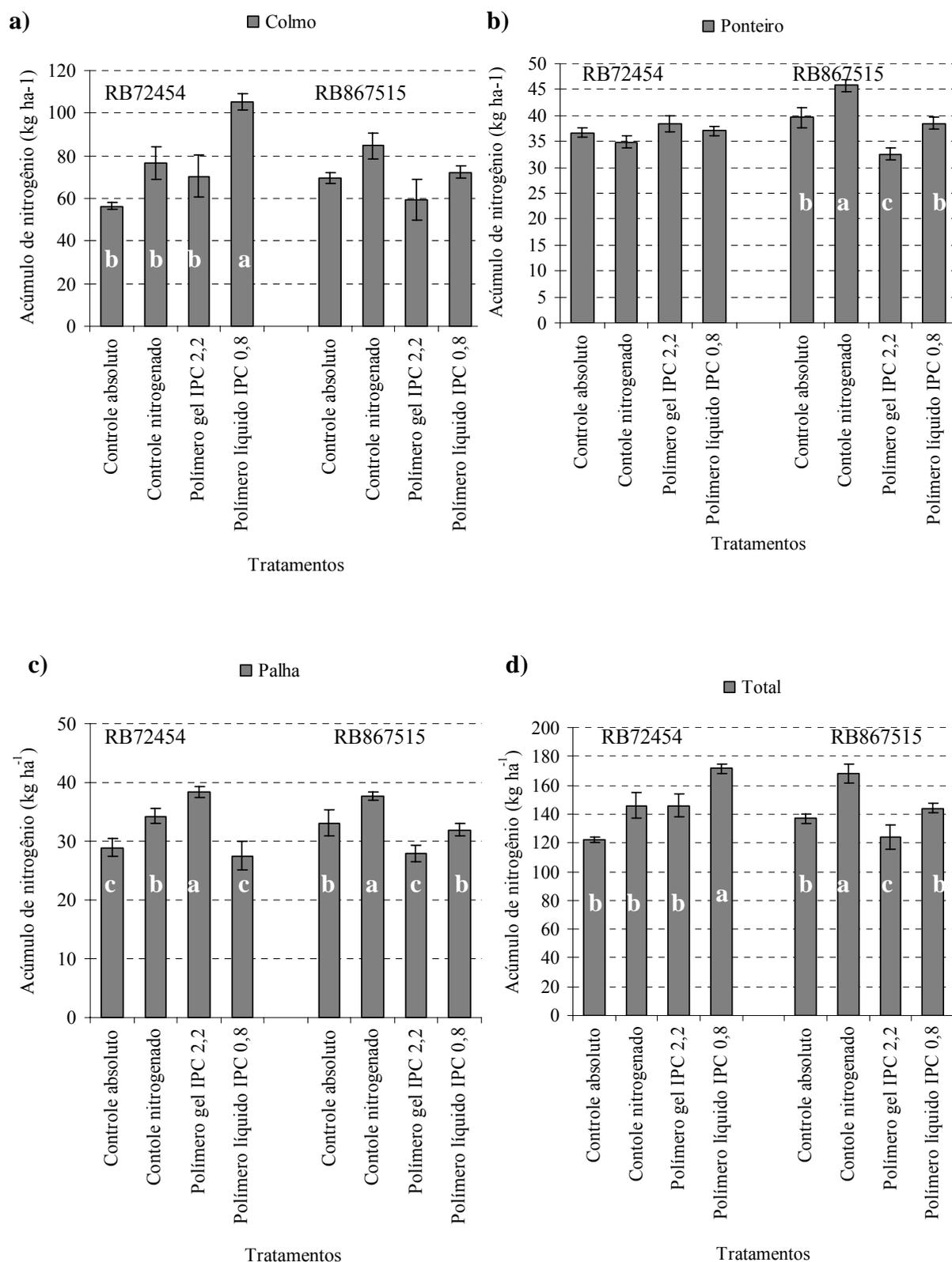


Figura 20. Acúmulo de nitrogênio no colmo (a), ponteiro (b), palha (c) e o total (d) das variedades de cana-de-açúcar aos 11 meses após aplicação dos polímeros IPC 2,2 e IPC 0,8 contendo bactérias endofíticas. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com $p > 0,1$. Linhas verticais em cima das colunas representam o erro padrão da média

4.7 Experimento III – Aplicação dos Polímeros contendo Microrganismos Endofíticos na Cana-de-açúcar Cultivada no Argissolo

4.7.1 Produtividade de colmos frescos de cana-de-açúcar após a inoculação

Os dados de produtividade de colmos frescos das variedades em estudo ao longo do tempo encontram-se discriminados na Tabela 7. Foi observado efeito significativo da aplicação do polímero gel IPC 2,2 e do polímero na forma líquida IPC 0,8 contendo as bactérias sobre a produtividade de colmos da variedade RB72454 que alcançou a marca de 175 Mg ha⁻¹ com aplicação do polímero gel IPC 2,2 e 171 Mg ha⁻¹ quando aplicado o polímero líquido IPC 0,8, onde ambos promoveram aumentos médios de 50 Mg ha⁻¹ em relação ao controle absoluto. Para a variedade RB867515 foi observado produtividade de 173 Mg ha⁻¹ promovido pela aplicação do polímero gel e 161 Mg ha⁻¹, promovido pela aplicação do polímero líquido, o que representou um aumento médio de 30 Mg ha⁻¹ em relação ao controle absoluto, não diferindo do tratamento adubado com 120 kg de ha⁻¹.

Tabela 7. Produtividade de colmos frescos das variedades de cana-de-açúcar em diferentes épocas de coleta aos 11 meses após a aplicação dos polímeros contendo bactérias endofíticas. Plantio: 06/09/2007

Tratamentos	Épocas de coleta (meses após a inoculação)		
	6	9	11
Variedade RB72454			
Controle absoluto	82* ±9,83	132 * ±7,58	123 b ±2,88
Controle nitrogenado	100 ±7,03	156 ±11,31	185 a ±16,62
Polímero gel (IPC 2,2)	85 ±2,04	159 ±15,92	175 a ±14,17
Polímero líquido (IPC 0,8)	97 ±8,88	148 ±15,46	171 a ±26,61
Médias	91	149	164
c.v. parcela (%)	22,4		
c.v. subparcela (%)	16,4		
Variedade RB867515			
Controle absoluto	97 * ±8,42	154 * ±14,40	137 b ±16,02
Controle nitrogenado	100 ±9,84	150 ±15,57	172 a ±6,98
Polímero gel (IPC 2,2)	87 ±7,34	138 ±17,81	173 a ±7,09
Polímero líquido (IPC 0,8)	94 ±8,12	150 ±8,28	161 a ±7,40
Médias	95	148	161
c.v. parcela (%)	22,4		
c.v. subparcela (%)	16,4		

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com p>0,15
 Legenda * indica não significativo na coluna, ± seguido dos valores = erro padrão da média.

Esses resultados são promissores uma vez que pode representar uma economia na aplicação de nitrogênio na cultura, pois se poderia diminuir a adubação mineral nitrogenada, uma vez que apenas a utilização dos polímeros contendo a mistura das cinco bactérias, apresentou médias semelhantes de incremento da produtividade de colmos quando comparado ao adubado com 120 kg de N na forma de uréia e sugerem que os efeitos dos microrganismos inoculados sobre as plantas de cana-de-açúcar, só puderam ser observados no final das

avaliações, provavelmente por motivos de esgotamento de nutrientes no solo, o que teria promovido à atuação favorável dos microrganismos inoculados nas variedades estudadas.

De um modo geral o ambiente de produção pôde exercer influência sobre a produtividade das variedades quando aplicado os inoculantes poliméricos. De acordo com as características varietais (vide Tabela 3), a variedade RB72454 não apresentou restrições a solos enquanto a variedade RB867515 apresentou baixa restrição, o que em parte pode ser demonstrado pelas altas produções alcançadas pelas variedades neste ambiente de produção.

Maule et al. (2001) avaliando a produtividade agrícola da variedade RB72454 e mais outras oito variedades, verificaram altas produções das variedades tanto no Argissolo quanto Planossolo uma produtividade média da cana-planta no Argissolo de 175 Mg ha⁻¹ sendo 28% maior que a obtida no Planossolo com 137 Mg ha⁻¹, ressaltando a existência de uma variação no potencial de produtividade de colmos de cana-de-açúcar entre os solos na região Noroeste do Estado de São Paulo.

Leite et al. (2008) avaliando a resposta das variedades RB72454 e RB867515 de cana-de-açúcar a inoculação com uma mistura de cinco bactérias, as mesmas utilizadas neste ensaio, nas usinas Santa Cruz e Sapucaia localizadas em Campos dos Goytacazes (RJ), verificaram que na usina Santa Cruz as duas variedades apresentaram alto rendimento de colmos que variou de 165 Mg ha⁻¹ para a variedade RB72454 sendo superior em 22 Mg ha⁻¹ a variedade RB867515 que apresentou rendimento 143 Mg ha⁻¹ de colmos. Entretanto, nas duas variedades não foi observado resposta a aplicação de N-fertilizante nem da inoculação nas condições avaliadas. Já na usina Sapucaia a variedade RB867515 apresentou resposta significativa aos tratamentos de inoculação no campo, que se mostraram similares ao efeito da adubação com N-fertilizante.

4.7.2 Produção de fitomassa seca de cana-de-açúcar após a inoculação

Os dados de produção de fitomassa seca de colmo, ponteiro, palha e o total produzido por duas variedades de cana-de-açúcar ao longo do tempo estão apresentados nas Tabelas 8, 9, 10 e 11. Os valores de produção de fitomassa seca de colmos das variedades nos diferentes tratamentos mostraram que houve crescimento, verificado pela produção crescente de fitomassa seca dos colmos até a última coleta aos onze meses após o plantio. Esse mesmo comportamento foi verificado por Reis Jr. (1998) estudando a ocorrência de *Herbaspirillum seropedicae* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* nas variedades SP792312 e SP701143 de cana-de-açúcar ao longo do tempo.

Os tratamentos de inoculação promoveram resposta significativa sobre a produção de fitomassa seca de colmos de 52 Mg ha⁻¹ para a variedade RB72454 e 49 Mg ha⁻¹ para a variedade RB867515 com aumento médio de 10 Mg ha⁻¹, para as duas variedades, em relação ao controle absoluto observada apenas aos 11 meses após a aplicação dos polímeros. A variedade RB72454 apresentou uma produção média de fitomassa seca de colmos de 51 Mg ha⁻¹ enquanto a variedade RB867515 apresentou produção média de 47 Mg ha⁻¹ o que demonstra que nas condições do ensaio, a variedade RB72454 foi 9% mais produtiva em termos de fitomassa seca de colmos quando comparada à outra variedade.

Os dados de produção de fitomassa seca de ponteiros das variedades de cana estão apresentados na Tabela 9. Para a produção de fitomassa seca de ponteiro das variedades, nota-se uma produção crescente dos três aos seis meses e uma estabilização aos nove meses. Aos onze meses após a inoculação pode ser observada uma redução na produção de fitomassa seca de ponteiro. Esse comportamento foi verificado por Orlando Filho et al. (1980) ao final do ciclo da planta dos quatorze aos dezesseis meses após o plantio, devido ao secamento e eliminação das folhas com a proximidade do final do período de maturação.

A aplicação do polímero líquido contendo as bactérias endofíticas promoveu resposta significativa sobre a produção de fitomassa seca de ponteiro para a variedade RB867515 de

13 Mg ha⁻¹ com aumento de 4 Mg ha⁻¹ em relação ao controle absoluto aos 9 meses após a inoculação. Entretanto, esse efeito não foi observado aos onze meses após a inoculação, sugerindo uma possível diluição do efeito possivelmente provocado pela perda de folhas como justificado por Orlando Filho et al. (1980) com a proximidade do final do período de maturação da planta. Para a produção de fitomassa seca de palha das variedades nota-se uma flutuação ao longo do tempo, onde aos nove meses a produção de palha sofreu um ligeiro declínio, apresentando uma elevação aos onze meses (Tabela 10). Esse comportamento sugere uma maior produção de folhas bandeira, provavelmente devido à proximidade do final do período de maturação da planta, refletindo numa maior produção de fitomassa seca de palha.

A variedade RB72454, quando submetida à aplicação dos polímeros contendo as bactérias apresentou um incremento médio de fitomassa seca de palha ao redor de 12% em relação ao controle absoluto e para variedade RB867515, quando submetida à aplicação do polímero gel contendo as bactérias foi verificada resposta significativa sobre a produção de fitomassa seca de palha de 10,2 Mg ha⁻¹ com aumento de 2 Mg ha⁻¹ em relação ao controle absoluto aos nove meses após inoculação. Entretanto, aos onze meses, a variedade RB867515 quando submetida à aplicação do polímero gel contendo as bactérias apresentou incremento médio de fitomassa seca de palha ao redor de 12% em relação ao controle absoluto. Entretanto, nas condições do ensaio, e em decorrência do teste estatístico aplicado, não houve diferença significativa para este parâmetro (fitomassa seca de palha).

A aplicação dos polímeros contendo as bactérias promoveu uma produção média de fitomassa seca de palha de 14,8 Mg ha⁻¹ para a variedade RB72454 enquanto a variedade RB867515 apresentou uma produção média de 15,4 Mg ha⁻¹ aos onze meses após a inoculação. De modo geral a variedade RB72454 apresentou menor produção em termos de fitomassa seca de palha do que a RB867515 nas condições testadas.

Os dados, em relação à produção de fitomassa seca total das variedades de cana estão apresentados na Tabela 11. Os tratamentos de inoculação promoveram diferenças significativas na produção de fitomassa seca total da variedade RB867515, com produção média dos tratamentos de inoculação, de 71 Mg ha⁻¹ de fitomassa, com um incremento de 18 Mg ha⁻¹ em relação ao controle absoluto. A variedade RB72454, quando submetida à aplicação dos polímeros contendo as bactérias apresentou um incremento médio de fitomassa seca total ao redor de 12% em relação ao controle absoluto. Entretanto, nas condições do ensaio, e em decorrência do teste estatístico aplicado, não houve diferença significativa para este parâmetro (fitomassa seca total).

Pelos dados das produções de fitomassa seca total nota-se que esta representou um potencial acúmulo de fitomassa seca variando entre 62 a 82 Mg ha⁻¹ para a variedade RB72454 e entre 53 a 73 Mg ha⁻¹ para a variedade RB867515 aos onze meses após a inoculação. Pode-se destacar também que, a variedade RB72454 obteve produção média de fitomassa seca total de 73 Mg ha⁻¹ enquanto a RB867515 obteve produção média 67 Mg ha⁻¹ aos onze meses após a inoculação. Estes valores são representativos e mostram a importância da produção de fitomassa seca que pode ser usada para fins de cobertura vegetal morta sobre o solo mantendo a sua umidade, controlando ervas daninhas, contribuindo para sua fertilidade, na geração de energia e até mesmo para a mitigação das emissões de CO₂ (Resende et al., 2006). Esse material também pode ser destinado para alimentação animal.

Tabela 8. Produção de fitomassa seca de colmos (Mg ha^{-1}) das variedades de cana-de-açúcar em diferentes épocas de coleta até 11 meses após o plantio

Tratamentos	Épocas de coleta (meses após a inoculação)		
	6	9	11
Variedade RB72454			
Controle absoluto	26,6 * \pm 2,86	26,9 * \pm 2,46	42,1 b \pm 3,04
Controle nitrogenado	29,4 \pm 4,28	28,1 \pm 5,17	58,5 a \pm 6,86
Polímero gel (IPC 2,2)	35,3 \pm 2,34	38,7 \pm 4,95	51,2 a \pm 4,58
Polímero líquido (IPC 0,8)	25,9 \pm 5,05	29,3 \pm 6,69	52,2 a \pm 6,41
Médias	29,3	30,8	51,0
c.v. parcela (%)	31,4		
c.v. subparcela (%)	22,5		
Variedade RB867515			
Controle absoluto	28,6* \pm 3,90	29,3 * \pm 2,36	38,5b \pm 6,59
Controle nitrogenado	28,6 \pm 2,60	27,4 \pm 1,56	51,8 a \pm 0,83
Polímero gel (IPC 2,2)	31,7 \pm 4,30	33,1 \pm 7,02	48,2 a \pm 4,55
Polímero líquido (IPC 0,8)	33,7 \pm 7,29	31,4 \pm 4,55	50,7 a \pm 2,71
Médias	30,7	30,3	47,3
c.v. parcela (%)	31,4		
c.v. subparcela (%)	22,5		

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com $p>0,1$.

Legenda * indica não significativo na coluna, \pm seguido dos valores = erro padrão da média.

Tabela 9. Produção de fitomassa seca de ponteiros (Mg ha^{-1}) das variedades de cana-de-açúcar em diferentes épocas de coleta até 11 meses após o plantio

Tratamentos	Épocas de coleta (meses após a inoculação)			
	3	6	9	11
Variedade RB72454				
Controle absoluto	3,0 * \pm 0,49	13,1* \pm 1,58	13,3 * \pm 3,0	7,3 * \pm 1,43
Controle nitrogenado	4,3 \pm 1,70	14,2 \pm 1,97	11,9 \pm 1,99	7,4 \pm 0,99
Polímero gel (IPC 2,2)	5,2 \pm 1,20	13,6 \pm 2,05	15,1 \pm 3,03	6,7 \pm 0,56
Polímero líquido (IPC 0,8)	5,0 \pm 1,23	13,1 \pm 1,38	13,6 \pm 0,82	8,2 \pm 1,10
Médias	4,4	13,5	13,5	7,4
c.v. parcela (%)	49,1			
c.v. subparcela (%)	31,7			
Variedade RB867515				
Controle absoluto	4,2 * \pm 0,49	9,7 * \pm 3,18	9,5 b \pm 2,94	6,4 * \pm 0,78
Controle nitrogenado	4,9 \pm 1,50	11,7 \pm 1,02	13,0 a \pm 1,46	5,9 \pm 0,42
Polímero gel (IPC 2,2)	3,4 \pm 0,80	12,1 \pm 2,15	9,5 b \pm 0,70	5,5 \pm 0,37
Polímero líquido (IPC 0,8)	3,4 \pm 0,80	10,3 \pm 1,27	13,4 a \pm 2,09	5,6 \pm 0,22
Médias	4,0	10,9	11,4	5,9
c.v. parcela (%)	49,1			
c.v. subparcela (%)	31,7			

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com $p>0,1$.

Legenda * indica não significativo na coluna, \pm seguido dos valores = erro padrão da média.

Tabela 10. Produção de fitomassa seca de palha (Mg ha^{-1}) das variedades de cana-de-açúcar em diferentes épocas de coleta até 11 meses após o plantio

Tratamentos	Épocas de coleta (meses após a inoculação)		
	6	9	11
Variedade RB72454			
Controle absoluto	11,6 b $\pm 1,59$	9,8 * $\pm 1,74$	12,7* $\pm 0,93$
Controle nitrogenado	15,3 a $\pm 1,15$	9,5 $\pm 1,57$	16,2 $\pm 1,04$
Polímero gel (IPC 2,2)	11,6 b $\pm 1,36$	9,7 $\pm 1,24$	15,4 $\pm 1,18$
Polímero líquido (IPC 0,8)	11,6 b $\pm 0,83$	11,6 $\pm 0,96$	14,71 $\pm 0,74$
Médias	12,5	10,2	14,8
c.v. parcela (%)	25,4		
c.v. subparcela (%)	17,0		
Variedade RB867515			
Controle absoluto	12,2 * $\pm 1,12$	8,7 b $\pm 0,98$	14,1* $\pm 0,90$
Controle nitrogenado	14,1 $\pm 0,84$	12,1 a $\pm 0,14$	15,9 $\pm 1,48$
Polímero gel (IPC 2,2)	12,7 $\pm 1,47$	10,2 a $\pm 2,03$	14,6 $\pm 0,81$
Polímero líquido (IPC 0,8)	12,0 $\pm 1,35$	7,8 b $\pm 0,63$	17,0 $\pm 1,14$
Médias	12,8	9,7	15,4
c.v. parcela (%)	25,4		
c.v. subparcela (%)	17,0		

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com $p > 0,1$.
 Legenda * indica não significativo na coluna, \pm seguido dos valores = erro padrão da média.

Tabela 11. Produção de fitomassa seca total (Mg ha^{-1}) das variedades de cana-de-açúcar em diferentes épocas de coleta até 11 meses após o plantio

Tratamentos	Épocas de coleta (meses após a inoculação)		
	6	9	11
Variedade RB72454			
Controle absoluto	51,0 * $\pm 5,19$	50,1* $\pm 3,30$	62,2 * $\pm 5,36$
Controle nitrogenado	59,0 $\pm 6,81$	49,6 $\pm 8,04$	82,2 $\pm 8,72$
Polímero gel (IPC 2,2)	60,1 $\pm 3,68$	63,6 $\pm 6,71$	73,4 $\pm 5,92$
Polímero líquido (IPC 0,8)	50,7 $\pm 6,33$	54,5 $\pm 7,56$	75,2 $\pm 8,90$
Médias	55,2	54,4	73,2
c.v. parcela (%)	28,3		
c.v. subparcela (%)	18,5		
Variedade RB867515			
Controle absoluto	50,7* $\pm 6,92$	47,6 * $\pm 5,04$	53,0 b $\pm 12,19$
Controle nitrogenado	54,0 $\pm 4,27$	52,7 $\pm 3,11$	73,7 a $\pm 2,01$
Polímero gel (IPC 2,2)	56,1 $\pm 8,82$	52,9 $\pm 7,50$	68,5 a $\pm 4,98$
Polímero líquido (IPC 0,8)	56,6 $\pm 5,76$	52,8 $\pm 5,16$	73,5 a $\pm 2,64$
Médias	54,4	51,5	67,2
c.v. parcela (%)	28,3		
c.v. subparcela (%)	18,5		

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott- Knott com $p > 0,15$. Legenda * indica não significativo na coluna, \pm seguido dos valores = erro padrão da média.

Reis Jr. (1998) estudando a influência da adubação nitrogenada sobre a população nativa de bactérias endofíticas nas variedades SP792312 e SP701143 aos 3, 6, 9, 12 e 15 meses após o plantio, verificou que a variedade SP792312 apresentou uma estabilização no acúmulo de massa seca de palha a partir da coleta aos seis meses e a variedade SP701143 mostrou acréscimo até a coleta aos doze meses, seguido de um decréscimo aos 15 meses após o plantio.

Govindarajan et al. (2006) avaliando a inoculação de *Burkholderia vietnamiensis* estirpe MG43, *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe ATCC49037, *Herbaspirillum seropedicae* ATCC35892, a combinação das três, nas variedades Co 86032 e Co 86027 de cana-de-açúcar micropropagada em diferentes épocas de coletas até 12 meses após o plantio, verificaram que a inoculação da estirpe MG43 promoveu uma produção de fitomassa seca de 191 e 175 Mg ha⁻¹ com aumentos de 20 e 19%, respectivamente para as variedades Co 86032 e Co 86027 sendo mais eficiente que as demais estirpes inoculadas.

Estudo realizado por Govindarajan et al. (2007) para avaliar a inoculação das estirpes de *Klebsiella* sp. GR9 (nova estirpe), *Gluconacetobacter diazotrophicus* ATCC49037, *Herbaspirillum seropedicae* ATCC35892, *Burkholderia vietnamiensis* LMG10929T e *Azospirillum lipoferum* LMG4348 juntamente com adubação de 140 kg N ha⁻¹ na cana-de-açúcar micropropagada variedade CoV 92102, verificaram que tanto a inoculação de *Klebsiella* sp. GR9, como *G. diazotrophicus* associado à adubação de 140 kg N ha⁻¹ promoveram as maiores produções de fitomassa que foi de 3,7 e 3,1 g planta⁻¹ respectivamente acima do controle fertilizado com 280 kg N ha⁻¹ até seis meses após o plantio.

4.7.3 Acúmulo de nitrogênio na cana-de-açúcar após a inoculação

Os dados de acúmulo de nitrogênio nos colmos, ponteiros, palha e acúmulo total de N estão apresentados nas tabelas 12, 13, 14 e 15. A concentração de nitrogênio nos colmos das variedades mostra acúmulo crescente até os onze meses após a inoculação. O tratamento adubado com nitrogênio promoveu diferença significativa no acúmulo de nitrogênio de 221 kg ha⁻¹ nos colmos da variedade RB72454 com aumento de 83 kg ha⁻¹ em relação controle absoluto e aumento médio de 27 kg ha⁻¹ quando comparado aos tratamentos de aplicação dos polímeros contendo as bactérias aos onze meses após a inoculação (Tabela 12).

Pelos dados de acúmulo de nitrogênio nos colmos nota-se que este representou um potencial acúmulo de N variando entre 138 a 221 kg ha⁻¹ para a variedade RB72454 e entre 109 a 154 kg ha⁻¹ para a variedade RB867515 aos onze meses após a inoculação. Podemos destacar também que a variedade RB72454 apresentou um acúmulo médio de nitrogênio nos colmos de 163 kg ha⁻¹ enquanto a RB867515 apresentou um acúmulo médio de 137 kg ha⁻¹ aos onze meses após a inoculação. Em termos percentuais, a variedade RB72454 acumulou 19% mais nitrogênio nos colmos do que a RB867515 nas condições do ensaio.

A concentração de nitrogênio nos ponteiros das variedades mostra acúmulo crescente de N até os nove meses após a inoculação, apresentando decréscimo aos onze meses (Tabela 13). Pelos dados de acúmulo de nitrogênio nos ponteiros nota-se que este representou um potencial acúmulo de N, variando entre 63 a 80 kg ha⁻¹ para a variedade RB72454 e entre 48 a 57 kg ha⁻¹ para variedade RB867515 aos onze meses após a inoculação. Podemos destacar também que, a variedade RB72454 apresentou acúmulo médio de nitrogênio nos ponteiros de 70 kg ha⁻¹ enquanto a RB867515 apresentou acúmulo médio de 52 kg ha⁻¹ aos onze meses após a inoculação. Em termos percentuais, a variedade RB72454 foi 35% mais produtiva em acúmulo de nitrogênio nos ponteiros do que a RB867515 nas condições testadas.

Para os valores de acúmulo de N na palha, nota-se uma ligeira estabilidade até os nove meses, com uma elevação aos onze meses após a inoculação (Tabela 14). Essa elevação no conteúdo de N na palha pode estar associada a uma maior quantidade de fitomassa seca

produzida de palha no mesmo período. Foi observado que o tratamento adubado com nitrogênio promoveu diferenças significativas no acúmulo de nitrogênio na palha das duas variedades aos seis meses após a inoculação. Para a variedade RB72454 o tratamento adubado com 120 kg N ha⁻¹ promoveu um aumento significativo no acúmulo de N na palha de 22 kg tanto para o controle absoluto quanto na comparação com a aplicação dos polímeros contendo as bactérias. Para a variedade RB867515 o tratamento adubado com 120 kg N ha⁻¹ promoveu um aumento significativo no acúmulo de nitrogênio na palha de 17 kg ha⁻¹ em relação ao controle absoluto e de 8 kg ha⁻¹ em relação aos tratamentos com aplicação dos polímeros contendo as bactérias. Pelos dados de acúmulo de nitrogênio na palha nota-se que esta representou um potencial acúmulo de N variando entre 57 a 70 kg ha⁻¹ para a variedade RB72454 e entre 58 a 73 kg ha⁻¹ para a variedade RB867515 aos onze meses após a inoculação.

Podemos destacar também que as duas variedades apresentaram acúmulo médio de nitrogênio na palha de 65 kg ha⁻¹ aos onze meses após a inoculação. Em termos porcentuais, as variedades contribuíram semelhantemente no acúmulo de nitrogênio na palha, nas condições do ensaio. Os dados de acúmulo total de nitrogênio na planta das variedades de cana cultivadas ao longo do tempo, estão apresentados na Tabela 15. Para os valores de acúmulo de N na planta, nota-se um aumento até os nove meses, com ligeira diminuição aos onze meses após a inoculação. Essa diminuição no conteúdo de N na planta pode estar associada com o período de maturação e com a proximidade do fim do ciclo da planta.

As variedades RB72454 e RB867515 quando submetidas à aplicação dos polímeros apresentaram um incremento de N total nas plantas ao redor de 13% e 20% em relação ao controle absoluto sem efeito na comparação com o tratamento adubado com N aos onze meses após a inoculação. Entretanto, nas condições do ensaio, e em decorrência do teste estatístico aplicado, não houve diferença significativa para este parâmetro (acúmulo de N).

Tabela 12. Acúmulo de nitrogênio nos colmos (kg ha⁻¹) das variedades de cana-de-açúcar em diferentes épocas de coleta até 11 meses após o plantio

Tratamentos	Épocas de coleta (meses após a inoculação)		
	6	9	11
Variedade RB72454			
Controle absoluto	60,7* ±12,4	68,9* ±6,1	138,4 b ±13,1
Controle nitrogenado	74,3 ±9,8	108,6 ±19,5	221,4 a ±36,4
Polímero gel (IPC 2,2)	73,5 ±8,3	110,1 ± 21,1	170,2 b ±18,4
Polímero líquido (IPC 0,8)	50,1 ±13,8	89,2 ±34,1	151,2 b ±32,0
Médias	64,7	94,2	170,3
c.v. parcela (%)	52,4		
c.v. subparcela (%)	26,6		
Variedade RB867515			
Controle absoluto	59,1* ±13,1	100,9 *±8,9	109,9 *±21,7
Controle nitrogenado	89,0 ±7,2	99,1 ±10,3	154,3 ±13,7
Polímero gel (IPC 2,2)	79,0 ±16,9	109,5± 27,3	143,5± 23,4
Polímero líquido (IPC 0,8)	65,8 ±15,9	99,4± 19,5	141,3 ±26,0
Médias	73,2	102,3	137,3
c.v. parcela (%)	52,4		
c.v. subparcela (%)	26,6		

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com p>0,15. Legenda * indica não significativo na coluna, ± seguido dos valores = erro padrão da média.

Tabela 13. Acúmulo de nitrogênio no ponteiro (kg ha⁻¹) das variedades de cana-de-açúcar em diferentes épocas de coleta após a aplicação dos polímeros contendo bactérias endofíticas

Tratamentos	Épocas de coleta (meses após a inoculação)			
	3	6	9	11
Variedade RB72454				
Controle absoluto	10,1*±0,43	126,7* ±16,62	183,4* ±50,24	68,0* 4,28
Controle nitrogenado	45,1 ±16,97	152,3 ±11,15	167,6 ±27,30	71,0 ±9,22
Polímero gel (IPC 2,2)	59,1 ±15,40	122,3 ±12,99	212,3 ±48,75	62,9 ±7,81
Polímero líquido (IPC 0,8)	11,3 ±1,09	141,4 ±18,14	205,0 ±10,40	80,0 ±7,83
Médias	31,4	135,7	192,0	70,5
c.v. parcela (%)	51,3			
c.v. subparcela (%)	38,0			
Variedade RB867515				
Controle absoluto	11,5 b ±1,66	100,4 *±37,89	144,9 *±46,83	48,3*±5,36
Controle nitrogenado	9,6 b ±0,94	125,1 ±16,70	178,7 ±11,35	56,9 7,31
Polímero gel (IPC 2,2)	61,2a 13,40	109,4 ±13,96	131,6 ±17,32	48,7 ±2,65
Polímero líquido (IPC 0,8)	11,2 b ±0,59	132,8 ±23,23	168,8 ±15,87	52,6 ±3,24
Médias	23,4	116,9	156,0	51,6
c.v. parcela (%)	51,3			
c.v. subparcela (%)	38,0			

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com p>0,1.
Legenda * indica não significativo na coluna, ± seguido dos valores = erro padrão da média.

Tabela 14. Acúmulo de nitrogênio na palha (kg ha⁻¹) das variedades de cana-de-açúcar em diferentes épocas de coleta até 11 meses após a aplicação dos polímeros contendo bactérias endofíticas

Tratamentos	Épocas de coleta (dias após a inoculação)		
	6	9	11
Variedade RB72454			
Controle absoluto	48,8 b ±4,7	38,1* ±5,0	56,6 * ±2,6
Controle nitrogenado	71,2 a ±8,5	39,4 ±5,6	70,1 ±3,2
Polímero gel (IPC 2,2)	48,2 b ±7,6	40,6 ±4,4	66,3 ±4,4
Polímero líquido (IPC 0,8)	50,1 b ±9,0	48,0 ±9,1	66,4 ±9,1
Médias	54,6	41,5	64,9
c.v. parcela (%)	31,6		
c.v. subparcela (%)	20,7		
Variedade RB867515			
Controle absoluto	45,4 b ±7,5	38,2* ± 6,6	56,7* ±9,3
Controle nitrogenado	62,9 a ±7,3	45,0 ±7,1	73,4 ±5,9
Polímero gel (IPC 2,2)	40,3 b ±7,4	42,3 ±11,9	61,4 ±4,3
Polímero líquido (IPC 0,8)	40,3 b ±6,6	30,7 ±2,6	68,5 ±10,8
Médias	47,2	39,1	65,0
c.v. parcela (%)	31,6		
c.v. subparcela (%)	20,7		

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com p>0,15.
Legenda * indica não significativo na coluna, ± seguido dos valores = erro padrão da média.

Tabela 15. Acúmulo total de nitrogênio (kg ha⁻¹) das variedades de cana-de-açúcar em diferentes épocas de coleta até 11 meses após a aplicação dos polímeros contendo bactérias endofíticas

Tratamentos	Épocas de coleta (meses após a inoculação)		
	6	9	11
Variedade RB72454			
Controle absoluto	236 * ±32,87	289 * ±48,88	263 * ±28,27
Controle nitrogenado	298 ±25,57	316 ±45,12	363 ±45,58
Polímero gel (IPC 2,2)	244 ±15,37	363 ±65,29	299 ±26,02
Polímero líquido (IPC 0,8)	242 ±28,08	342 ±52,06	298 ±47,17
Médias	255	328	306
c.v. parcela (%)	38,5		
c.v. subparcela (%)	19,4		
Variedade RB867515			
Controle absoluto	205* ±53,73	284* ±52,27	215* ±31,87
Controle nitrogenado	277 ±23,65	323 ±11,90	285 ±18,64
Polímero gel (IPC 2,2)	229 ±34,92	283 ±44,81	254 ±23,99
Polímero líquido (IPC 0,8)	239 ±27,66	299 ±32,33	263 ±20,63
Médias	238	297	254
c.v. parcela (%)	38,5		
c.v. subparcela (%)	19,4		

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com $p > 0,15$. Legenda * indica não significativo na coluna, ± seguido dos valores = erro padrão da média.

Pelos dados de acúmulo de nitrogênio nas plantas nota-se que esta apresentou um acúmulo de N variando entre 263 a 363 kg ha⁻¹ para a variedade RB72454 e entre 215 a 284 kg ha⁻¹ para a variedade RB867515 aos onze meses após a inoculação. Pode-se destacar também que as duas variedades apresentaram acúmulo médio total de nitrogênio na planta de 306 kg ha⁻¹ para variedade RB72454 e de 254 kg ha⁻¹ para variedade RB867515 aos onze meses após a inoculação. Em termos percentuais, a variedade RB72454 apresentou um acréscimo de 20% no acúmulo de nitrogênio na planta, nas condições testadas.

Estudos realizados por Govindarajan et al. (2006) sobre inoculação de *Burkholderia vietnamiensis* estirpe MG43, *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe ATCC49037, *Herbaspirillum seropedicae* ATCC35892, e a combinação das três, nas variedades Co 86032 e Co 86027 de cana-de-açúcar micropropagada em diferentes épocas de coletas até 12 meses após o plantio, verificaram que todos os tratamentos de inoculação mais a adubação com 140 kg N ha⁻¹ promoveram aumento no conteúdo de nitrogênio nas folhas das duas variedades. Entretanto, a inoculação das bactérias em mistura promoveu efeito máximo sobre o parâmetro em 70%, com acúmulo médio de 5,33 e 5,98 mg N g⁻¹ de folha.

Govindarajan et al. (2007) estudando a resposta da inoculação das estirpes de *Klebsiella* sp. GR9 (nova estirpe), *Gluconacetobacter diazotrophicus* ATCC49037, *Herbaspirillum seropedicae* ATCC35892, *Burkholderia vietnamiensis* LMG10929T e *Azospirillum lipoferum* LMG4348 juntamente com adubação de 140 kg N ha⁻¹ na cana-de-açúcar micropropagada variedade CoV 92102, sobre o acúmulo de nitrogênio, verificaram que a inoculação de *Klebsiella* sp. GR9 juntamente com a adução nitrogenada proporcionou um acúmulo médio de nitrogênio de 4,86 mg g⁻¹ planta em relação ao tratamento adubado e que as plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* sozinha ou em mistura com *Klebsiella* sp. GR9 e adubadas com 140 kg N ha⁻¹ proporcionou os maiores acúmulos de nitrogênio que foi

de 4,9 e 4,8 mg g⁻¹ planta, respectivamente em relação ao controle fertilizado com 280 kg N ha⁻¹ até seis meses após o plantio.

Estudos realizados por Suman et al. 2005 de inoculação individual das estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* IS100, IS107, IS111, IS112, IS113, IS120 e IS121 associada à adubação mineral nitrogenada na dose de 75 kg N ha⁻¹ em cana-de-açúcar variedade CoSe92423, verificaram que a inoculação de todas as estirpes, exceto a estirpe IS121, favoreceu o acúmulo de nitrogênio na parte aérea da planta, com incrementos de 7,32 a 21,97% em relação ao controle.

4.8 Análise Conjunta dos Experimentos de Inoculação dos Microrganismos Endofíticos a Campo

a) Produtividade de colmos

A análise conjunta dos experimentos nos diferentes solos (Tabela 16) mostrou que a variedade RB72454 foi melhor na produtividade de colmos frescos tanto no Planossolo como no Argissolo em um período de onze meses após a inoculação, que promoveu uma produtividade de colmos frescos de 102 Mg ha⁻¹ no Planossolo e de 173 Mg ha⁻¹ no Argissolo, com um aumento na produtividade de 29 e 50 Mg ha⁻¹ respectivamente, em relação ao controle absoluto. A variedade RB867515 foi melhor na produtividade de colmos frescos no Argissolo, em um período de onze meses após a inoculação com uma produção de 167 Mg ha⁻¹ com um aumento de 31 Mg ha⁻¹ em relação ao controle absoluto. De modo geral esses resultados demonstraram que foi possível aumentar a produtividade de colmos de cana-de-açúcar com a inoculação de uma mistura de bactérias independente do veículo inoculante utilizado e do ambiente de produção testado, pois efeitos da inoculação das bactérias foram observados para as duas variedades, com maior resposta a inoculação para a variedade RB72454 nos diferentes ambientes de produção nas condições do ensaio.

Tabela 16. Produtividade de colmos (Mg ha⁻¹) das variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia

Tratamentos	Planossolo	Argissolo
	Variedade RB72454	
Controle absoluto	83 b ±4,6	123 b ±2,9
Controle nitrogenado	103 a ±3,7	185 a ±16,6
Inoculação	102 a ±2,6	173 a ±10,5
Médias	96	160
c.v. (%)	17	
	Variedade RB867515	
Controle absoluto	97* ±5,2	136 b ±16,0
Controle nitrogenado	111 ±8,3	172 a ±7,0
Inoculação	74 ±3,5	167 a ±6,6
Médias	80	158
c.v. (%)	17	

Médias seguidas de diferente letra minúscula na coluna diferem entre si pelo teste de Skott-Knott com p<0,1. *= indica não significativo na coluna, ± seguido dos valores = erro padrão da média.

b) Produção de Fitomassa

A análise conjunta dos experimentos nos diferentes solos (Tabela 17) mostrou que a variedade RB72454 foi melhor na produção de fitomassa seca total tanto no Planossolo quanto no Argissolo em um período de onze meses após a inoculação com produção de fitomassa seca total de 56 Mg ha⁻¹ no Planossolo e 74 Mg ha⁻¹ no Argissolo, com aumento de 17 Mg ha⁻¹ e 12 Mg ha⁻¹ respectivamente, em relação ao controle absoluto. A variedade RB867515 foi melhor na produção de fitomassa seca total no Argissolo em um período de onze meses após a inoculação com uma produção de 73 Mg ha⁻¹ que promoveu um aumento de 20 Mg ha⁻¹ em relação ao controle absoluto.

Tabela 17. Produção de fitomassa seca (Mg ha⁻¹) das variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia

Tratamentos	Planossolo	Argissolo
	Variedade RB72454	
Controle absoluto	38 b ± 1,0	62 b ± 5,4
Controle nitrogenado	39 b ± 1,0	82 a ± 8,7
Inoculação	56 a ± 2,2	74 a ± 2,0
Médias	44	73
c.v. (%)	16	
Variedade RB867515		
Controle absoluto	44 * ± 2,8	53 b ± 12,2
Controle nitrogenado	47 ± 2,0	74 a ± 2,0
Inoculação	48 ± 3,5	71 a ± 3,3
Médias	46	67
c.v. (%)	16	

Médias seguidas de diferente letra minúscula na coluna diferem entre si pelo teste de Skott-Knott com p<0,1. * = não significativo na coluna, ± seguido dos valores = erro padrão da média

Analisando amplamente os resultados pode ser verificado que a metodologia de inoculação das bactérias foi eficiente em promover o aumento da produção de fitomassa das variedades estudadas, mostrando que a aplicação das bactérias endofíticas pode ser vantajosa nos diferentes ambientes de produção.

5 CONCLUSÕES

- Inoculantes poliméricos apresentam capacidade de manter a sobrevivência das estirpes BR11281 e BR11145 em mistura na preparação final;
- Inoculantes poliméricos apresentam capacidade de manter a sobrevivência das estirpes BR11281, BR11335, BR11504, BR11145 e BR11366 de forma individual no inoculante;
- A aplicação dos polímeros contendo as bactérias em experimentos de curto prazo na casa-de-vegetação demonstra ser eficiente no processo de colonização das bactérias inoculadas, refletindo no incremento de fitomassa, brotações e acúmulo de nitrogênio das plântulas de cana-de-açúcar;
- A tecnologia do inoculante polimérico contendo bactérias diazotróficas endofíticas em experimentos de longo prazo no campo experimental promove efeitos positivos no aumento da produtividade, fitomassa e acúmulo de nitrogênio da cultura da cana-de-açúcar, em diferentes ambientes de produção, tanto em cana-planta quanto na cana-soca, indicando a existência da interação entre os fatores testados.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados abrem novas perspectivas ao conhecimento sobre a tecnologia de aplicação de inoculantes poliméricos contendo microrganismos fixadores de nitrogênio e promotores do crescimento vegetal associados a espécies da família das poaceas. Estes inoculantes se mostraram viáveis como uma tecnologia alternativa à utilização de fertilizantes nitrogenados em plantas de cana-de-açúcar.

O inoculante polimérico contendo as estirpes BR11281, BR11335, BR11504, BR11145 e BR11366 de bactérias diazotróficas endofíticas com uma população ao redor de 10^7 células mL^{-1} em experimentos na casa-de-vegetação mostrou efeitos positivos para a variedade RB72454 na colonização das bactérias, proporcionando incrementos na fitomassa, no número de brotações e acúmulo de nitrogênio.

Nos experimentos de campo, também foram observados que os inoculantes promoveram efeitos positivos nas duas variedades estudadas demonstrando ser eficiente em promover a produtividade de colmos frescos, principalmente na variedade RB72454 nos diferentes ambientes de produção, tanto em cana-planta quanto na cana-soca. Na cana-planta a aplicação do inoculante polimérico promoveu uma produtividade de colmos de até 173 Mg ha^{-1} com um aumento de 50 Mg ha^{-1} em relação ao controle absoluto, equivalendo-se ao tratamento adubado com 120 kg N ha^{-1} e na cana-soca a produção observada foi de 105 Mg ha^{-1} com um aumento de 24 Mg ha^{-1} em relação ao controle absoluto equivalendo-se ao tratamento adubado com 120 kg N ha^{-1} indicando a existência da interação entre os três fatores testados (solo-variedade-inoculante). Os inoculantes poliméricos também foram eficientes em promover aumentos na produção de fitomassa da RB867515 com produção de 71 Mg ha^{-1} e aumento de 18 Mg ha^{-1} em relação ao controle absoluto e efeito similar ao nitrogenado, mostrando-se promissor. Outro fator positivo em relação ao polímero, é que manteve as células bacterianas viáveis por um período de 120 dias de avaliação e que a presença do agente compatibilizante como o MgO não afetou a sobrevivência das células .

Espera-se que o uso dos inoculantes poliméricos proporcione uma economia significativa de fertilizantes nitrogenados, porém ainda são necessários novos estudos incluindo análise do custo de produção dos inoculantes poliméricos, a fim de tornar possível o cálculo da redução dos custos de produção da cana com o uso desta nova tecnologia. Considerando a prática já em uso da produção de inoculante para cana-de-açúcar tendo a turfa como veículo e tomando por base o preço do inoculante comercial produzido na Embrapa Agrobiologia para a soja, que é de R\$ 3,00 cada dose (250g) teremos um custo de R\$ 15 para cinco doses contendo cada uma das diferentes bactérias recomendadas para a cana. Como os toletes apresentam superfície bem maior em relação às sementes, o gasto de inoculante para o plantio de um hectare desta cultura deve ser pelo menos 20 vezes maior em relação à soja. Então, para o inoculante turfoso estima-se um custo de pelo menos R\$ 60,00 por hectare (5 bactérias x 4 doses de cada x R\$ 3,00). Estudos mais conclusivos deverão ser realizados, de modo que, brevemente, tenhamos um inoculante eficiente, capaz de suprir a maior parte das necessidades de nitrogênio da cultura da cana-de-açúcar, e com isso, contribuir para a sustentabilidade na produção desta e de outras poaceas.

7 REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBAREDA, M.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N.; CAMACHO, M. TEMPRANO, F. J. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. **Soil Biology & Biochemistry** v. 40, n.11, p. 2771-2779, nov. 2008.
- ALVES, B. J. R.; SANTOS, J. C. F. dos; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Métodos de determinação do nitrogênio em solo e planta. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S., (Ed.) **Manual de métodos empregados em estudo de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI; Goiania: Embrapa-CNPAF; Londrina: Embrapa-CNPSO, 1994. 542p.; p. 449-409. (Embrapa-CNPAF. Documentos, 46).
- ANANDHAM, R.; CHOI, K. H; GANDHI, I. P.; YIM, W. J.; PARK, S. J.; KIM, K. A; MADHAIYAN, M.; SÁ, T. M. Evaluation of shelf life and rock phosphate solubilization of *Burkholderia* sp. in nutrient-amended clay, rice bran and rock phosphate-based granular formulation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, UK, v. 23, n.8, p. 1121–1129, 2007.
- AZEREDO, D. F.; BOLSANELLO, J.; WEBER, H.; VIEIRA, J. R. Nitrogênio em cana-de-açúcar – Doses e fracionamento. **STAB**, Piracicaba, v.4, n.5, p. 26-33, 1986.
- 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**, Reading, UK, v.36, n.1, p 86-93, 1986.
- BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de Herbaspirillum sp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica**. Seropédica, RJ, 1996. 234 p. Tese. (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMAN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Hesbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, UK, v.46, n.3, p.802-810, jul.1996.
- BALDANI, V. L. D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALDANI, J. I.; KIRCHHOF, G.; DÖBEREINER, J. *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.69, n.1, p.116, 1997.
- BALDANI, J. I; CARUSO, L. V.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOEBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, US, v.29, n. 516, p. 911-922, may/jun.1997.
- BALOTA, E. L. **Interação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca (*Manihot sculenta* Crantz)**. Seropédica, RJ, 1994. 281 p. Tese. (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- BARBERI, P.; ZANELLI, T.; GALLI, E.; ZANETTI, G. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, NL, v. 36, n.1 p. 87-90, aug.1986.

BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promotion bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, New York, v.16, p. 729-770, 1998.

BASHAN Y, HOLGUIN G. *Azospirillum*-plant relations: environmental and physiological advances (1990–1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, CA, v.43, p.103–121, 1997.

BASHAN, Y., HERNANDEZ, J-P LEYVA, L A., BACILIO M. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria **Biology and Fertility Soils**, Berlin, v.35, p. 359–368, may, 2002.

BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A(1) and A(3) by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, NL, v. 24 n.1, p. 7-11, jan.1998.

BELLONE, C. H.; BELLONE, D. V. C.; PEDRAZA, R. O.; MONZON, M. A. Cell colonization and infection thread formation in sugarcane roots by *Acetobacter diazotrophicus*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, US, v. 29, n. 56, p. 965 – 967, 1997.

BIGGS, I. M.; STEWART, G. R.; WILSON J. R.; CRICHTLEY, C. ¹⁵N natural abundance studies in Australian commercial sugarcane. **Plant and Soil**, The Hague, NL, v. 238, n.1, p. 21-30, jan. 2002.

BODDEY, L. H. **Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia*, isoladas de cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*) cultivadas na Austrália e no Brasil**. Seropédica, RJ, 2002. 109 p. Tese. (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

BODDEY, R. M.; POLIDORO, J. C.; REZENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to grasses and cereals. **Australian Journal Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, n.9, p.889–895, 2001.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V.M. Endophytic nitrogen fixation in sugar cane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, The Hague, NL, v. 252, p. n.1, 139-149, may. 2003.

BODDEY, L. H.; DART, P.; GOI, S. R.; BALDANI, J. I. Ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas no cultivar Q151 de cana-de-açúcar cultivada na Austrália. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 7.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 5.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 2., 1998, Caxambu. Resumos... Caxambu, MG: UFLA; SBCS; SBM, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Balço nacional da cana-de-açúcar e da agroenergia**. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/MENU_LATERA/PDF. Acesso em: 17 out. 2008. Agricultura. Links: Cana-de-açúcar e agroenergia: estatística.

BRASIL, M. S. **Ocorrência e diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes variedades de arroz**. Seropédica, RJ, 2005. 137 p. Tese. (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004**. Aprova o Regulamento da Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos,

inoculantes ou biofertilizantes destinados à agricultura. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 25 jan. 2009. Legislação

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

BUCHER, C. A.; REIS, V. M. **Biofertilizante contendo bactérias diazotróficas**. Seropédica, RJ, Embrapa Agrobiologia, 2008. 17 p. (Embrapa-Agrobiologia. Documentos 247)

CABALLERO-MELLADO, J.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia unamae* sp. nov., in N₂-fixing rhizospheric and endophy species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, UK, v. 54, p. 1165 – 1172, jul. 2004.

CANUTO, E. L.; SALLES, J. F.; OLIVEIRA, A. L. M.; PERIN, L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. **Revista Agronomia**, Seropédica, RJ, v.37, n. 2, p. 67 – 72, 2003.

CANUTO, E. L. **Metodologias de inoculação e prospecção de compostos secretados por bactérias diazotróficas endofíticas na promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar**. Campos, RJ, 2008. 133 p. Tese. (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

CASSÁN, F.; BOTTINI, R.; SCHNEIDER, G.; PICCOLI, P. *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA₂₀ and metabolize the resultant aglycones to GA₁ in seedlings of rice dwarf mutants. **Plant Physiology**, Minneapolis, US v.125, n.4, p.2053–2058, abr. 2001.

CAVALCANTE, V. A.; DOBEREINER, J. A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, The Hague, NL, v. 108, n.1, p. 23-31, may.1988.

CHUEIRE, L. M. O.; RANGEL, E. V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizobio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16s rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v.27, n. 5, p. 833-840, set/out. 2003.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16S ribossomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacterial isolated from banana (*Musa spp.*) e abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 67, n. 5, p. 2375 – 2379, 2001.

DEAKER, R., ROUGHLEY, J. D.; KENNEDY, I. V. Legume seed inoculation technology: a review, **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, US, v.36, n.8, p. 1275–1288, 2004.

DEAKER, R.; ROUGHLEY, J. D.; KENNEDY, I. R. Desiccation tolerance of rhizobia when protected by synthetic polymers. **Soil Biology and Biochemistry**. Sidney, v.39, n.2, p.573–580, fev. 2007.

DENARDIN, N. D.; FREIRE, J. R. J. Assessment of polymers for the formulation of legume inoculants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, UK, v.16, n.3, p. 215-217, abr. 2000.

- DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, Rio de Janeiro, v.1, p. 261-272, 1958.
- DÖBEREINER, J.; ALVAHYDO, R. Sobre a influência da cana-de-açúcar na ocorrência de *Beijerinckia* no solo. II-Influência das diversas partes do vegetal. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.19, n.4, p.401-412, 1959.
- DÖBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* do solo. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.19, n.3, p.251-258, 1959.
- DOBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION**, 1, 1976, Washington. Proceedings... Washington, DC: University Press, 1976.
- DOBEREINER, J.; DUQUE, F. F. Contribuição da pesquisa em fração biológica de nitrogênio para o desenvolvimento do Brasil. **Revista de Economia Rural**, Brasília, DF, v.18, p.447-460, 1980.
- DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa – SPI; Itaguaí, RJ: Embrapa-Agrobiologia, 1995. 60 p.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; and OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Review in Plant Sciences**, Boca Raton, v.22, n. 2, p.107-149, 2003.
- DONG, Z.; CANNY, M. J.; MCCULLY, M. E.; ROBOREDO, M. R.; CABADILLA, C. F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophytic of sugarcane stems: a new role for the apoplast. **Plant Physiology**, Minneapolis, US, v.105, n.4, p. 1139 – 1147, 1994.
- DUTTA, D.; GACHHUI, R., Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, UK, v. 56, 1899–1903, aug. 2006.
- ELMERICH, C. Historical perspective: from bacterization to endophytes. In: Elmerich C.; Newton, W. E. (Ed.) **Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations**. Dordrecht: Springer, 2007. 321p.; p.1-16.
- EMBRAPA SOLOS. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro, 1997. 212 p.
- FELICI, C.; VETTORI, L.; GIRALDI, E.; FORINO, L. M. C.; TOFFANIN, A.; TAGLIASACCHI, A. M.; NUTI, M. Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, NL, v.40, n.2 p. 260-270, out. 2008.
- FERNANDES JÚNIOR, P. I. **Composições poliméricas a base de carboximetilcelulose (CMC) e amido como veículos de inoculação de rizóbio em leguminosas**. Seropédica, RJ, 2006. 43 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- FERREIRA, A. C.; COZZOLINO, K.; CARVALHO, A. R. V.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of Diazotrophic bacteria in oil palm trees. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS**, 1995, Angra dos Reis. The role of biological nitrogen fixation proceedings. Angra dos Reis, RJ: Embrapa-CNPAB, 1995.

- FERREIRA, J. S.; SABINO, D. C. C.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; V. L. D. BALDANI. Seleção de veículos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. **Revista Agronomia**, Seropédica, RJ, v.37, n. 2, p. 06 – 12, 2003.
- FILHO, S. O.; BRONDI, E. O. Produção de plástico biodegradável a partir da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V. et al. (Org.) **Atualização em Produção de Cana-de-Açúcar**. Piracicaba, SP: CP 2, 2006. 415 p.; p.377-384.
- FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathológica**, Jaguariuna, SP, v. 20, n.1, p.68-74, 1994.
- FREIRE, J. R. J. Trabalhos em rizobiologia no Rio Grande do Sul. In: **REUNIÃO LATINO AMERICANA. INOCULANTES LEGUMINOSA**, 4., 1968, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre, S.n., 1968. p. 19-24.
- FUENTES-RAMIREZ, L. E.; JIMENES-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R.; CABALLEIRO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. **Plant and Soil**. The Hague, NL, v.154, n. 2, p. 145 – 150, jul.1993.
- FUJIMOTO, J. Formação de multicamadas de polissacarídeos e proteína. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n.5, p. 757-761, set/out.2002.
- GILLIS, M.; DOBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERSTERS, K. Taxonomic relationships between (*pseudomonas rubrisubalbicans*, some clinical isolates (ef group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and (*aquaspirillum*) *autrophicum*. In: M, POLSINELLI, R; MATERASSI AND M. VICENZI, (ed.) **Nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 292-294,
- GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, CA v. 41, n.2, p. 109-117, fev.1995.
- GOMES, A. A, GOI, S. R.; BALDANI, V. L. D. e NETO, J. J. Análise do pH do extrato de isolamento e dos índices tecnológicos na colonização de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) por *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Revista Agronomia**, Seropédica, RJ, v.37, n. 2, p. 73 -79, 2003.
- GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G. & LAKSHMINARASIMHAN, C. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic Burkholderia vietnamiensis. **Plant and Soil**. The Hague, NL, v. 280, n. 1-2, p.239–252, fev. 2006.
- GOVINDARAJAN, M.; KWON, S.; WEON, H. Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph Klebsiella sp. GR9. **World Journal Microbiology & Biotechnology**. Oxford, UK, v. 23, n.7, p.997–1006, jul 2007.
- GUNARTO, L.; ADACHI, K.; SENBOKU, T. Isolation and selection of indigenous Azospirillum, spp. from a sub-tropical island, and effect of inoculation on growth of lowland rice under several levels of N-applications. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.28, n.2, p.129-135, 1999.
- GUIMARÃES, S. L. **Seleção de estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas para inoculação em três cultivares de arroz inundado**. Seropédica, RJ, 2001. 77 f. Dissertação (Mestrado em ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- HUNGRIA, M.; LOUREIRO, F. M.; MENDES, I. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. Inoculant preparation, production and application. In: WERNER, D.; NEWTON, W. E (Ed.)

Nitrogen fixation agriculture, forestry, Ecology and the environment. Dordrecht, Amsterdam: Springer, 2005. 347p. p. 224-253.

HYNES, R. K.; CRAIG, K. A.; COVERT, D.; SMITH, R. S.; RENNIE, R. J. Liquid rhizobial inoculants for lentil and field pea. **Journal Producer Agriculture**, Madison, WI, v.8, p. 547-552, 1995.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola.** Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200902_1.shtm> Acesso em: 25 mar.2009.

JIMENEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMIREZ, L. E.; TAPIA-HERNANDEZ, A. MASCARUA-ESPARZA, M. A.; MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELADO, J. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v.63, p. 3676-3683, 1997.

JORNALCANA. Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br>>. Acesso em: 26 fev. 2008.

JOSHI, P.; RAYALU, S.; BANSIWAL, A. Surface modified zeolite, a novel carrier material for *Azotobacter chroococcum*. **Plant and Soil**, The Hague, NL, v. 296, n. 1-2, p.151-158, jul. 2007.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L., Infection and Colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, US v.17, n.1, p. 77-119, 1997.

JUNGER, G.; MUGNIER, J. Polymer-entrapped rhizobium as an inoculant for legumes. **Plant and Soil**, The Hague, NL, v.65, n.2, p.219-231, jun. 1982.

KENNEDY, I. R.; TCHAN, Y., Biological Nitrogen Fixation In: Non Leguminous Field Crops: Recent Advances. **Plant and Soil**, The Hague, NL, v.141, n.1-2, p.93-118. mar. 1992.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A.T.M.A.; KECSKÉS M L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: Can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, US, v.36, n.8, p.1229-1244, aug. 2004.

KIMATI, I.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 651p. v.2.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, Reading, UK, v.51, p.157-68, 2001.

LANDELL, M. G. A.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A.; VASCONCELOS, A. C. M.; PINTO, L. R.; CRESTE S. Manejo varietal em cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V. et al. (Orgs.). **Atualização em Produção de Cana-de-Açúcar**. Piracicaba: CP 2, 2006. 415p, p.57-65.

LEITE, J.M.; MORAIS, R.F.; BARROS, JÚNIOR, J.C.; ALVES, B.J.R.; REIS, V.M.; URQUIAGA, S. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio em duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com mistura de bactérias diazotróficas. In: FERTIBio 2008; REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 28.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICRORRISAS, 12.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 10.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 7., 2008, Londrina. desafios para o uso do solo com eficiência e qualidade ambiental: anais... Londrina: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo; Embrapa Soja; Universidade Estadual de Londrina, 2008. 1 CD ROM.

LI, R. P.; MACRAE I. C. Specific associations of diazotrophic acetobacter with sugarcane. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, US, v.23, n.10, p.999-1002, 1991.

LI, R. P.; MACRAE, I. C. Specific identification and enumeration of *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, US, v.24, n.5, p. 413-419, 1992.

LIMA, S. A. A.; SILVA, I. F.; SANTIAGO, R. D.; NETOS, L. R. S.; SOUZA, C.; CAVALCANTE, F. S. Influência da adubação mineral sobre três cultivares de cana-de-açúcar na microrregião de guarabira na paraíba **Agropecuária Técnica**, Areia, PB, v. 27, n.2, p. 92-99, 2006.

MADHAIYAN, M. POONGUZHALI, S., HARI, K., SARAVANAN, U. S., SA, T. Influence of pesticides on the growth rate and plant-growth promoting traits of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, CA, v.84, n.2, p. 143–154. fev. 2006.

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

MAHESHKUMAR, K. S.; KRISHNARAJ, P.U.; ALAGAWADI, A. R. Mineral phosphate solubilizing activity of *Acetobacter diazotrophicus* a bacterium associated with sugarcane. **Current Science**, Bangalore, India, v.76, p. 874-875, 1999.

MARQUES JÚNIOR, R. B.; CANELLAS, L. P.; SILVA, L. G.; 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**, Viçosa, MG, v.32, p.1121-1128, 2008.

MAULE, R. F.; MAZZA, J. A.; MARTHA JR., G. B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita **Scientia Agrícola**, Piracicaba, SP, v.58, n.2, p.295-301, abr./jun. 2001.

MEDEIROS, A. F. A.; POLIDORO, J.C.; Reis, V.M. Nitrogen source effect on *Gluconacetobacter diazotrophicus* colonization of sugarcane (*Saccharum* spp.) **Plant and Soil**, The Hague, NL, v.279, n.1-2, p.141–152, jan. 2006.

MIRZA, M. S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K. Isolation, partial characterization and effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micropropagated sugarcane in vitro. **Plant and Soil**, The Hague, NL, v.237, n.1, p. 47-54, nov. 2001.

MIYAUCHI, M.Y.H.; LIMA, D.S.; NOGUEIRA, M.A.; LOVATO, G.M.; MURATE, L.S.; CRUZ M.F.; FERREIRA, J.M.; ZANGARO, W.; ANDRADE, G. Interactions between diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungus in maize genotypes, **Scientia Agrícola**. Piracicaba, SP, v.65, n.5, p. 525-531, 2008.

MOREIRA, F. M. S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros. Lavras: UFLA, 2008. 768 p.; p.13-42.

MUNÕNZ-ROJAS, J.; CABALLERO-MELLADO, J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. **Microbiology Ecology**, New York, v.46, n.4, p. 454-464, dez.2003.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Diazotrophic Associations in sugar cane cultivation in south India. **Tropical Agriculture, Surrey, UK**, v.76, p. 171–178, 1999a.

MUTHUKUMARASAMY, R.; RAVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from the Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.29, n.2, p. 157-169, may.1999b.

MUTHUKUMARASAMY, R.; CLEENWERCK, I.; REVATHI, G.; VADIVELU, M.; JANSSENS, D.; HOSTE, B.; GUM, K.U.; PARK, K.D.; SON, C.Y.; SÁ, T.; CABALLERO-MELLADO, J. Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.28, n.3, p. 277–286, apr. 2005.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; VADIVELU, M. Antagonistic potential of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotricum falcatum* went., a causal organism of red-rot of sugarcane. **Current Science**, Bangalore, India, v.78, p.193-198, 2000.

MUTHUKUMARASAMY, R. GOVINDARAJAN, M.; VADIVELU, M.; REVATHI, G. N-fertilizer saving by inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. In micropropagated sugarcane plants. **Microbiological Research**, Jena, DE, v.161, n.3, p.238-245, jul. 2006.

MURTY, M. G.; LADHA, J. K. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. **Plant and Soil**, The Hague, NL v.108, n.2, p. 281-285, may.1988.

NÓBREGA, J. C. M. de; DORNELAS, M. C. Biotecnologia e Melhoramento da Cana-de-Açúcar. In: SEGATO, S. V., et al. (Org.). **Atualização em Produção de Cana-de-Açúcar**. Piracicaba, SP: CP 2, 2006. 415p.; p. 39-56.

NOGUEIRA, E. M. **Metabolismo de nitrogênio em cana-de-açúcar: estudos com a enzima glutamina sintetase**. Rio de Janeiro, 2001. 193 f. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

NOGUEIRA, E. M.; VINAGRE, F.; MASUDA, H. P.; VARGAS, C.; LÚCIA M.; PÁDUA, V.; SILVA, F. R.; SANTOS, R. V.; BALDANI, J. I.; FERREIRA P. C. G.; HEMERLY, A. S. Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, SP, v.24, n.1-4, p. 199-206, dec./jan. 2001.

NOGUEIRA, G. A. Produção de mudas de cana-de-açúcar In: SEGATO, S. V. et al. (Org.). **Atualização em Produção de Cana-de-Açúcar**. Piracicaba, SP: CP 2, 2006. 415p.; p. 79-92

NJOLOMA, J.; TANAKA, K.; SHIMIZU, T.; NISHIGUCHI, T.; ZAKRIA, M.; AKASHI, R.; OOTA, M.; AKAO, S. Infection and colonization of aseptically micropropagated sugarcane seedlings by nitrogen fixing endophytic bacterium, *Herbaspirillum* sp. B501 gfp1. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.43, n.2, p. 137–143, dec.2006.

OLIVARES, F.L.; BALDANI, V. L. D; REIS, V. M; BALDANI, J. I. e DOBEREINER, J. Contribuição para diferenciação taxonômica entre *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* sinônimo *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Fitopatologia Brasileira**, vol. 18, (Suplemento) p. 313, ago. 1993.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves,

predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils, Berlin**, v.21, n.3, p. 197- 200, fev.1996.

OLIVARES, F. L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. Híbrido) por bactérias endofíticas do gênero *Herbaspirillum***. Rio de Janeiro, RJ, 1996. 328f. Tese. (Doutorado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DOEBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, The Hague, NL, v. 242, n.2, p. 205-215, may. 2002.

OLIVEIRA, A. L. M. **Inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em duas Variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob condições de campo**. Rio de Janeiro, 2003. 114p. Tese. (Doutorado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, The Hague, NL, v. 284, n1-2, p. 23-32, jun. 2006.

OLIVEIRA, A. L. M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European journal of soil biology**, Montrouge, FR, v. 45, n.1, p.106-113, jan./fev. 2009.

OLIVEIRA, L. M. **Efeitos da radiação gama no polímero biodegradável poli(Hidroxibutirato) e no copolímero Poli(Hidroxibutirato-co-hidroxicvalerato)**. Recife, PE, 1996. 114f. Tese (Doutorado em Tecnologias Energéticas Nucleares) - Universidade Federal de Pernambuco.

OLIVEIRA, E. **Estudo de associação entre bactérias diazotróficas e arroz**. Itaguaí, RJ, 1992. 96f. Dissertação. (Mestrado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALES, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluating of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology Biochemistry**, Elmsford, US, v.26, n.12, p.1591-1601, mai.1994.

ORLANDO FILHO, J.; HAAG, H. P.; ZAMBELLO JR. E. Crescimento e absorção de macronutrientes pela cana-de-açúcar, variedade CB4176 em função da idade em solos do estado de São Paulo. **Boletim Técnico Planalsucar**. Piracicaba, SP, v. 2, n.1 p.1-128, 1980.

PAULA, M. A.; REIS, V. M.; DOBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* and *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), Sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.11, n.2, p.111-115, may.1991.

PANDEY, P.; MAHESHWARI, D. K. Bioformulation of *Burkholderia* sp. MSSP with a multispecies consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, CA, v.53, n. 2, p. 213-22, fev. 2007.

PEDRAZA, R. O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International journal of food microbiology**, v.125, n.1, p. 25-35, jun.2008.

PINÕN, D.; CASAS, M.; BLANCH, M.; FONTANIELLA, B.; BLANCO, Y.; VINCENTE, C.; SOLAS, M. T. and LEGAZ, M. E. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugarcane

endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugarcane pathogen **Research in Microbiology**, Paris, v.153, n.6, p. 345-351, jul/aug.2002.

PERIN, L. **Ecologia e diversidade de isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados à cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. Seropédica, RJ, 2003. 63 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

PERIN, L., BALDANI, J. I.; REIS, V. M. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.8, p.763-770, aug. 2004.

PERIN, L.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; BALDANI, J. I. ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; REIS V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov. a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, UK, v.56, p.1931–1937, 2006.

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

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

PROGRAMA melhoramento genético da cana-de-açúcar. Disponível em: < <http://pmgca.dbv.cca.ufscar.br/> > Acesso em: 20 fev. 2009.

REIS JR, F. B. **Influência do genótipo da planta, micropropagação e fertilização nitrogenada sobre a população de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. Seropédica, RJ. 1998. 161f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

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

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.19, p. 227–247, 2000.

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

REIS, V. M. **Aspectos ecológicos e fisiológicos da bactéria fixadora de N₂ *Acetobacter diazotrophicus***. Itaguaí, RJ, 1991. 119f. Dissertação. (Mestrado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; Dobereiner, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its Endophytic habitat. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, UK, v.10, n.4, p. 401-405, jul. 1994.

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: Fernandes M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p.432, ; p. 153-174.

REIS, V. M. Inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio para aplicação em gramíneas. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 27.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRÍZAS, 11.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 9.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 6., 2006, Bonito, MS. A busca das raízes: anais... Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. 1 CD-ROM.

RESENDE, A. S. **A fixação biológica de nitrogênio (FBN) como suporte da produtividade e fertilidade nitrogenada dos solos na cultura de cana-de-açúcar: Uso de adubos verde**. Seropédica, RJ, 2000. 123p. Dissertação. (Mestrado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESENDE, A. S.; XAVIER, R. P.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R.M. Long-term effects of pre-harvest burning and nitrogen and vinasse applications on yield of sugar cane and soil carbon and nitrogen stocks on a plantation in Pernambuco, N.E.Brazil. **Plant and Soil**, The Hague, NL, v.281, n.1-2, p. 339-351, mar. 2006.

RHOR, T. G. **Estudo reológico da mistura carboximetilcelulose/amido e sua utilização como veículo de inoculação bacteriano**. Seropédica, RJ, 2007. 124 p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RODRIGUES, J. D. Fisiologia da Cana-de-açúcar. Botucatu, SP: UNESP, 1995. 101p. Disponível em: <http://www.canabrazil.com.br/component/option,com_docman/task,cat_view/gid,90/Itemid,75/> acesso em: 12.dez. 2008.

RODRIGUES, L. S. **Estudo da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a cultivares de arroz inundado**. Seropédica, RJ, 2003. 93 f. Tese. (Doutorado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RODRIGUES, E. P.; RODRIGUES, L. S.; OLIVEIRA, A. M. O.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, The Hague, NL, v.302, n.1-2, p. 249-261, jan. 2008.

ROPER, M. M., LADHA, J. K., Biological N₂ fixation by heterotrophic and phototrophic bacteria in association with straw. **Plant and Soil**, The Hague, NL, v.174, n.1-2, p.211–224, jul.1995.

ROSA, D. R.; FRANCO, B. L. M.; CALI, M. R. Biodegradabilidade e Propriedades Mecânicas de Novas Misturas Poliméricas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, Rio de Janeiro, v.11, n.2, p. 82-88, 2001.

ROSSETTO, R.; Dias, F. L. F. Nutrição e adubação da cana-de-açúcar: indagações e reflexões. **Informações agrônômicas**, Piracicaba, SP, n.110, p. 6-11, jun. 2005. Suplemento.

ROUGHLEY, R. J.; VINCENT, J. M. Growth and survival of *Rhizobium* spp. In peat culture. **The Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, UK, v.30, n. 2, p.362-376, aug.1967.

RUSSO, A.; VETTORI, L.; FELICI C.; FIASCHI, G.; MORINI, S.; TOFFANIN, A. Enhanced micropropagation response and biocontrol effect of *Azospirillum brasilense* Sp245

on *Prunus cerasifera* L. clone Mr. S 2/5 plants, **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, NL, v.134, n. 3-4, p. 312-319, jan. 2008.

SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, J. G.; SILVEIRA, A. P. D. Interaction of new diazotrophic endophytic bacteria and nitrogen fertilization on wheat crop under field conditions. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v.32, n.3, p. 1099-1106, maio/jun.2008.

SANTOS, C. C. R. DOS; PERIN, L.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M. Isolamento de *Gluconacetobacter* spp. em diferentes tipos de solos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n. 1, p. 85-92, jan. 2006.

SEVILLA, M.; OLIVEIRA, A.; BALDANI, J. I.; KENNEDY, C. Contributions of the bacterial endophyte *Acetobacter diazotrophicus* to sugarcane nutrition: A preliminary study. **Symbiosis**, Philadelphia, US, 25, p.181-191, 1998.

SEVILLA, M.; BURRIS, R. H.; GUNAPALA, N.; KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and 15N in incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif mutants strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, US, v.4, p. 358-366, 2001.

SHANKARIAH, C.; HUNSIGI, G. Field Responses of sugarcane to associative N₂ Fixers and Plubilisers. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS CONGRESS, 24, 17-21 September, 2001, Brisbane, Australia. Proceedings... Brisbane: ISSCT, 2001. p. 40-45.

SMITH, R. S. Legume inoculant formulation and application. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, CA, v.38, p. 485-492, 1992.

SOUTO-PADRÓN, T. Soluções tampão. In: SOUZA, W. (Ed.). **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro. Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise.1998, p.179.

SPARROW, S. D.; HAM, G. E. Survival of *Rhizobium phaseoli* in six carrier materials. **Agronomy Journal**, Madison, US, v.75, n. 2, p.181-184, mar/apr.1983.

STEPHENS, J. H.G.; RASK, H. Inoculant production and formulation. **Field Crops Research**, Amsterdam, NL, v.65, p. 249-258, 2000.

STIPP, S. R.; PROCHNOW, L. I. Maximização da eficiência e minimização dos impactos ambientais da adubação nitrogenada. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, SP, v. 124, p.1-7, dez. 2008. Disponível em: <[http://www.inpofos.org/ppiweb/brazil.nsf/\\$webindex/C4858DF62768BBD003257537007BF172?opendocument&navigator=home+page](http://www.inpofos.org/ppiweb/brazil.nsf/$webindex/C4858DF62768BBD003257537007BF172?opendocument&navigator=home+page)> Acesso em: 12. dez. 2008.

SUMAN, A.; GAUR, A.; SHRIVASTAVA, A. K.; YADAV, R. L. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, NL, v. 47, n 2-3, p.155-162, nov. 2005.

SUMNER, M. E.. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. **Advances in Soil Science**, New York, v.12, p. 53-123. 1990

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch-composition, fine structure and architecture **Journal of Cereal Science**, London, UK, v.39, n.2, p. 151-165, mar. 2004.

WIPPS, J. M. Microbiol interactions & biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, UK, v.52, n. especial, p. 487-577, mar. 2001.

- VALVERDE, A.; VELÁSQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J. *Herbaspirillum lusitanum* sp. Nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, UK, v. 53, p. 1979-1983, 2003.
- VAN ELSAS J. D.; TREVORS J. T.; WOLTER A.C.; HEIJNEN C.E Survival and root colonization by alginate-encapsulated *Pseudomonas fluorescens* cells following introduction into soil. **Biology and Fertility of Soil**, Berlin, v.14, n.1, p.14-22, sep.1992.
- VAN DER BURGT, Y. E. M.; BERGSMAB, J.; BLEEKER, I. P.; MIJLAND, P. J. H. C., VAN DER KERK-VAN HOOFF, A.; KAMERLING, J. P.; Vliegenthart, J. F. G. A distribution of methyl substituents over branched and linear regions in methylated starches. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, NL, v. 312, n.4, p. 201-208, nov.1998.
- VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M.; VOS, DE P. E.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied of Microbiology**, Stuttgart, DE, v.25, n.4, p. 507-512, 2002.
- VENDAN, R. T.; THANGARAJU, M. Development and standardization of cyst based liquid formulation of *Azospirillum* bioinoculant. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, Budapeste, HU, v. 54, n.2, p. 167-177, nov. 2007.
- VITTI, G. S.; QUEIROZ, F. E. C.; OTTO R.; QUINTINO, T. A. Nutrição e adubação da cana-de-açúcar. Bebedouro, SP, 2005. 78 p. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Nutricao+cana+GVitti_000fh3r3vzp02wyi v80rn0etnmc6zamd.pdf > Acesso em: 12. Dez. 2008. Palestra apresentada para a equipe da Stoller em fevereiro de 2005.
- VITTI, A. C.; TRIVELIN, P. C. O.; GAVA, G. J. C.; FRANCO, H. C. J.; BOLOGNA, I.R.; FARONI, C. E. Produtividade da cana-de-açúcar relacionada à localização de adubos nitrogenados aplicados sobre os resíduos culturais em canavial sem queima. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 31, n.3, p. 491-498, maio/jun. 2007.
- XAVIER, R. P. **Contribuição da fixação biológica de nitrogênio na produção sustentável da cultura de cana-de-açúcar**. Seropédica, RJ, 2006. 71 f. Tese. (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.;EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, JP, v. 36, n.12, p.1251-1275, 1992.
- YONEYAMA, T.; MURAOKA, T.; KIM, T.H.; DACANAY, E.V.; NAKANISHI, Y. The natural ¹⁵N abundance of sugarcane and neighboring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). **Plant and Soil**, The Hague NL, v.189, n.2, p.239-244, fev.1997.
- ZAKRIA, M.; UDONISHI, K.; SAEKI, Y.; YAMAMOTO, A.; AKAO, S. Infection, multiplication and evaluation of the nitrogen-fixing ability of *Herbaspirillum* sp strain B501gfp1 in sugarcane stems inoculated by the vacuum infiltration method. **Microbes and Environments**, Tóquio, JP, v. 23, n. 2, p.128-133, 2008.

8 ANEXO

SOLUÇÕES

SOLUÇÃO SALINA PARA DILUIÇÃO (BALDANI, V. L., 1980).

K ₂ HPO ₄	sol. 10%	1,0 ml
MgSO ₄	sol. 10%	0,5 ml
NaCl	sol. 10%	0,2 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	sol. 1%	0,5 ml
FeEDTA	sol. 1,64%	1,0 ml
Sol. de micronutrientes para meio de cultura			0,5 ml

Ajustar o pH para 6,5 com sol. de ácido sulfúrico 5%

Completar com água destilada para 1000 ml.

TAMPÃO FOSFATO DE POTÁSSIO 3 mM pH 6,0 (Souto-Padrón, 1998)

Solução A:

KH₂PO₄ 22 mM

Solução B:

NaOH 0,2 M

Colocar 5 mL da solução A junto com 0,56 mL da solução B e completar para 20 mL com água milliq para se obter a concentração 50 mM e pH 6,0. Retirar 3 mL desta solução e completar para 50 mL para se obter a concentração 3 mM

MEIOS DE CULTURA (DOBEREINER et al. 1995)

LGI-P (meio para purificação)

Açúcar cristal		100 g
K ₂ HPO ₄	sol. 10%2 ml
KH ₂ PO ₄	sol. 10%6 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10%2 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	sol. 1%2 ml
FeCl ₃ .6H ₂ O	sol. 1%1 ml
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	sol. 0,1%2 ml
Vitamina para meio de cultura		1 ml
Azul de bromotimol sol. 0,5% em 0,2 N de KOH		5 ml
Ajustar o pH para 5,5 com ácido acético sol. 10%;		
Completar para 1000 ml com água destilada ;		
Adicionar o agar:		
Semi-sólido: 1,3 g L ⁻¹		
Sólido – 25 g L ⁻¹ e adicionar 50 mg de extrato de levedura		

LGI-P caldo (meio para contagem em amostras de planta)

Açúcar cristal	100 g
K ₂ HPO ₄sol. 10%.....	2 ml
KH ₂ PO ₄sol. 10%	6 ml
MgSO ₄ .7H ₂ Osol. 10%	2 ml
CaCl ₂ .2H ₂ Osol. 1%	2 ml
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O ..sol. 0,1%	2 ml
FeCl ₃ .6H ₂ Osol. 1%	1 ml
Azul de bromotimol 0,5% em 0,2N de KOH	5 ml
Caldo de cana (em pó)	0,8 g(*)

Ajustar o pH para 5,5 com ácido acético 10% ;

Completar para 1000 ml com água destilada.

(*)pode ser substituído por 5 ml de caldo de cana líquido

Adicionar o agar:

Semi-sólido: 1,3 g L⁻¹

Sólido – 25 g L⁻¹ e adicionar 50 mg de extrato de levedura

JNFB

Ácido Málico.....	5 g
K ₂ HPO ₄ sol.10%.....	6 ml
KH ₂ PO ₄sol. 10%.....	18 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O....sol. 10%.....	2 ml
NaCl..... sol. 10%.....	1 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O..... sol. 1%.....	2 ml
FeEDTA.....sol. 1,64%.....	4 ml
Azul de bromotimol 0,5% em 0,2N de KOH.....	2 ml
Solução de micronutrientes para meio de cultura.....	2 ml
Vitamina para meio de cultura.....	1 ml
KOH.....	4,5 g

Ajustar o pH para 5,8;

Completar para 1000ml com água destilada;

Adicionar o agar : Adicionar o agar:

Semi-sólido: 1,7 g L⁻¹

Sólido – 17 g L⁻¹ e adicionar 20 mg de extrato de levedura

JMV

Manitol	5 g
K ₂ HPO ₄sol. 10%	6 ml
KH ₂ PO ₄sol. 10%	18 ml
MgSO ₄ .7H ₂ Osol. 10%	2 ml
NaClsol. 10%	1 ml
CaCl ₂ . 2H ₂ Osol. 1%	2 ml
Azul de bromotimol sol. 0,5% em 0,2N de KOH	2 ml
FeEDTAsol. 1,64%	4 ml
Sol. de micronutrientes para meio de cultura	2 ml
Vitamina para meio de cultura	1 ml
Extrato de levedura	100 mg

Ajustar o pH para 5,0 – 5,4 ;

Completar para 1000 ml com água destilada ;

Adicionar o agar

Semi-sólido: 1,6 g L⁻¹

Sólido: 25 g L⁻¹ e adicionar 20 mg de extrato de levedura

OBS: Para meio líquido adicionar 10 mM de glutamato de sódio / litro (1,87 g/l) - (indicador opcional)

Recomenda-se usar as placas somente 24 h após o preparo.

LGI

Açúcar cristal..... 5 g
K₂HPO₄sol. 10 %.....2 ml
KH₂PO₄.....sol. 10% 6 ml
MgSO₄.7H₂O.....sol. 10%.....2 ml
CaCl₂.2H₂O.....sol. 1 %.....2 ml
FeEDTA.....sol. 1,64 %4 ml
Na₂MoO₄.2H₂O.....sol. 0,1%.....2 ml
Azul de bromotimol 0,5% em 0,2 N de KOH..... 5 ml
Vitamina para meio de cultura1 ml
Ajustar o p.H para 6,0 – 6,2 com H₂SO₄ sol. 5%;
Completar para 1000 ml com água destilada.
Semi-sólido: 1,4 g L⁻¹
Sólido: 15 g L⁻¹ e adicionar 20 mg de extrato de levedura

Mínimo Modificado (Burdman et al. 1998)

Ácido málico..... 5g
MgSO₄.7H₂O.....0,2 g
NaCl.....0,1g
CaCl₂.2H₂O.....0,02g
K₂HPO₄6g
KH₂PO₄.....4g
Extrato de levedura0,1g
NH₄Cl.....0,2 g
Microelementos
FeCl₃.....0,01g
Na₂MoO₄.2H₂O.....0,1g
Ajustar o pH para o de melhor crescimento do microrganismo em teste;
Completar para 1000ml com água destilada;
Adicionar o agar
Sólido: 25 g L⁻¹

Teor de nitrogênio na cana-planta e cana-soca (experimento I)

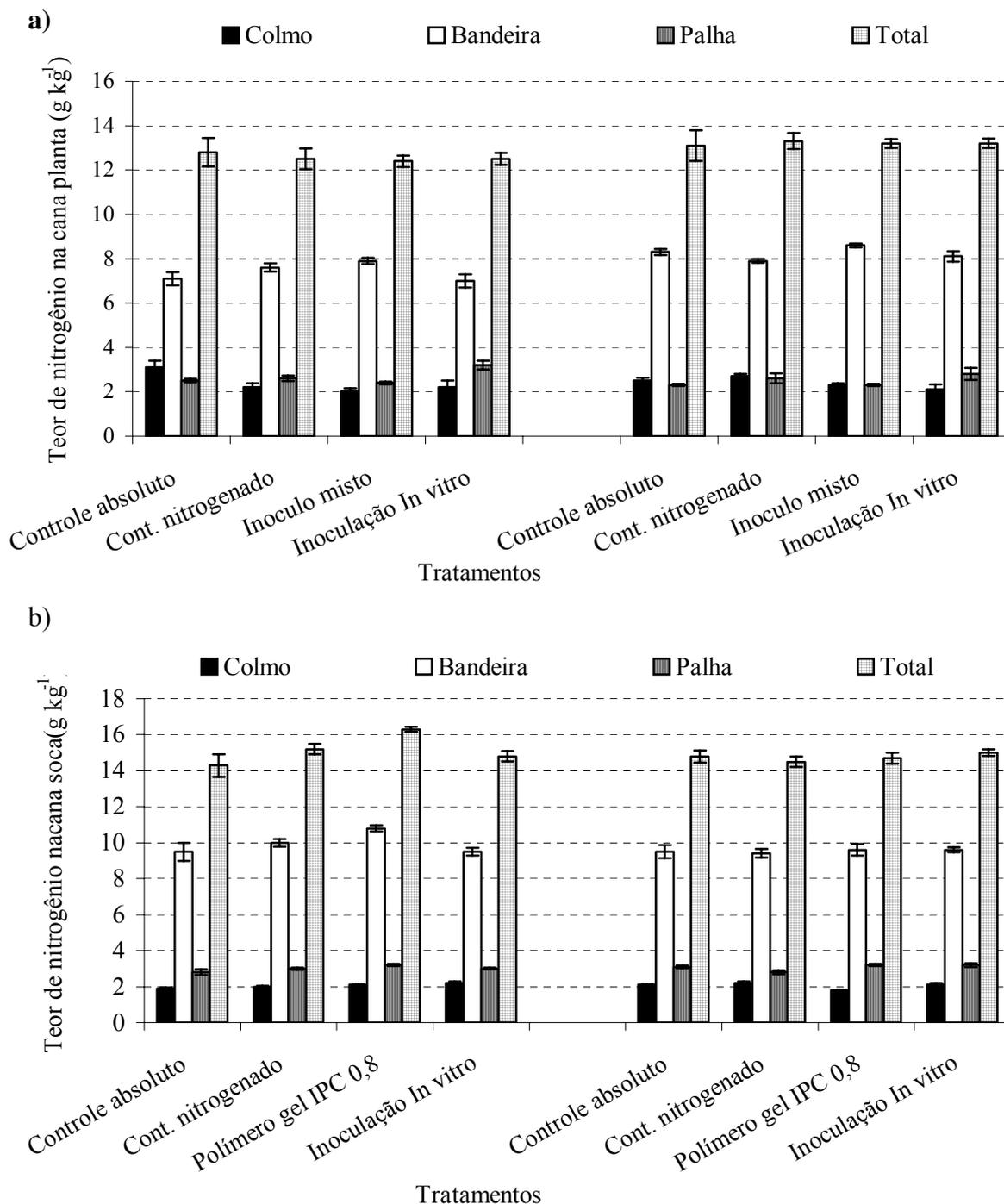
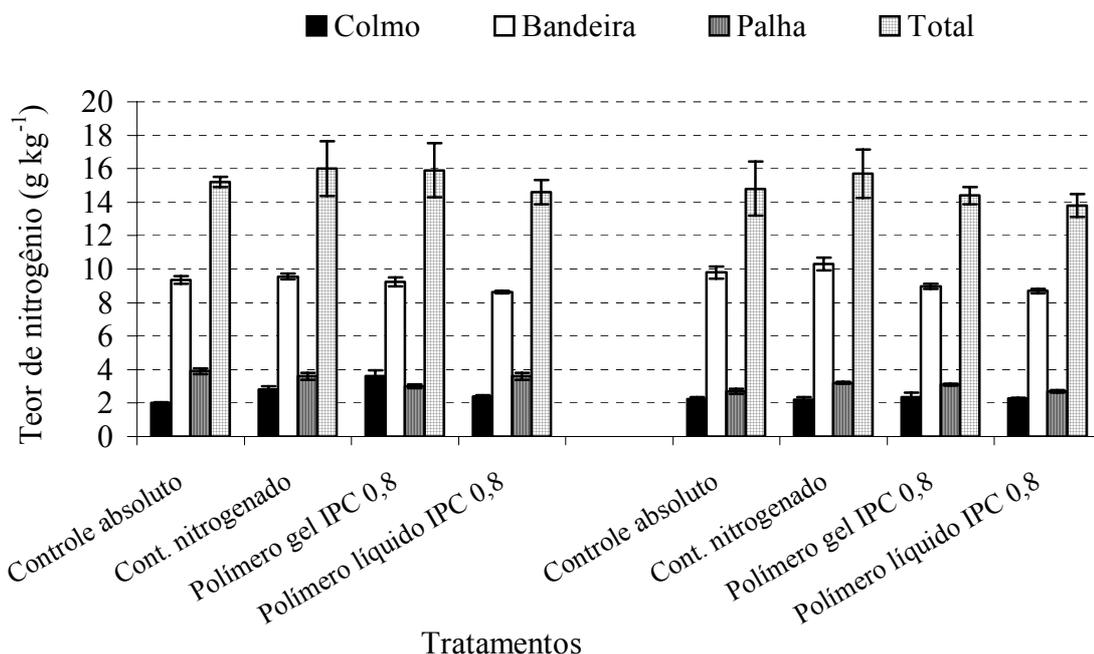


Figura 1. Aplicação dos inoculantes sobre o teor de nitrogênio em duas variedades de cana planta (a) aos 18 meses após a inoculação e cana soca (b) aos 10 meses após a reinoculação. Colunas sem letras (por parte da planta), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com $p > 0,1$. Linhas verticais em cima das colunas representam o erro padrão da média.

Teor de nitrogênio na cana-planta (experimento II)



Figuras 2. Aplicação dos polímeros contendo bactérias endofíticas sobre teor de nitrogênio na cana-de-açúcar aos 11 meses após a inoculação. Colunas sem letras (por parte da planta), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com $p>0,1$. Linhas verticais em cima das colunas representam o erro padrão da média.

Teor de nitrogênio na cana-planta (experimento III)

Tabela 1. Aplicação dos polímeros contendo bactérias endofíticas sobre o teor de N das variedades RB72454 e RB867515 de cana-de-açúcar em diferentes épocas de coleta até 11 meses após a inoculação

Tratamentos	Teor total de nitrogênio (g kg^{-1})					
	Épocas de coleta (meses após a inoculação)					
	6		9		11	
	Variedades					
	V1	V2	V1	V2	V1	V2
Controle absoluto	16,5	15,4	19,7	22,9	16,9	14,4
Controle nitrogenado	18,1	18,1	22,2	21,3	17,7	17,0
Polímero gel (IPC 0,8)	15,5	16,2	20,7	20,8	17,0	15,9
Polímero líquido (IPC 0,8)	16,7	16,2	22,0	19,8	17,0	16,1
c.v parcela (%)	10,75					
c.v. subparcela (%)	9,40					

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com $p>0,1$.
 Legenda: V1= variedade RB72454 e V2= variedade RB867515