



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL- UFFS

CAMPUS CHAPECÓ

CURSO DE AGRONOMIA

ANDRÉ FERRAZ DE CAMARGO BARBOSA

**DESENVOLVIMENTO INICIAL DE CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADAS
COM DIFERENTES ESTIRPES DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS**

CHAPECÓ

2018

ANDRÉ FERRAZ DE CAMARGO BARBOSA

**DESENVOLVIMENTO INICIAL DE CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADAS
COM DIFERENTES ESTIRPES DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Siumar Pedro Tironi

CHAPECÓ

2018

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Barbosa, André Ferraz de Camargo
Desenvolvimento inicial de cana-de-açúcar inoculadas
com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas /
André Ferraz de Camargo Barbosa. -- 2018.
41 f.:il.

Orientador: Prof. Dr. Siumar Pedro Tironi.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Agronomia, Chapecó, SC , 2018.

1. Fixação Biológica de Nitrogênio. 2. Bactérias
diazotróficas. 3. Saccharum sp.. 4. Inoculação. I.
Tironi, Siumar Pedro, orient. II. Universidade Federal
da Fronteira Sul. III. Título.

ANDRÉ FERRAZ DE CAMARGO BARBOSA

DESENVOLVIMENTO INICIAL EM CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADAS COM
DIFERENTES ESTIRPES DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para a obtenção de grau de
Bacharel em Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul.

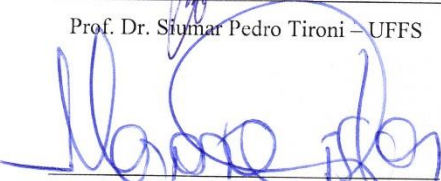
Orientador: Prof. Dr. Siumar Pedro Tironi

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em 22/11/2018

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Siumar Pedro Tironi – UFFS



Prof. Dr. Samuel Mariano Gislon da Silva – UFFS



Prof.ª Dr.ª Rosiane Berenice Nicoloso Denardin – UFFS

RESUMO

O Brasil figura como o maior produtor de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) do mundo. A cultura é hoje uma das mais importantes para o agronegócio nacional, sendo a matéria-prima de maior viabilidade para a produção de biocombustíveis. Apesar disso, ainda há muito a ser aperfeiçoado no cultivo da cana-de-açúcar no país, inclusive no que diz respeito a nutrição de plantas. A adubação nitrogenada é um dos fatores mais limitantes para o desenvolvimento e para a expressão do potencial produtivo da cultura, porém, essa prática pode se tornar muito onerosa para o produtor, fazendo-se necessária a procura por alternativas que aliem menor custo com a busca constante pelo aumento de produtividade. Assim surge a inoculação de rizobactérias diazotróficas. A habilidade de fixar nitrogênio atmosférico que esses microrganismos demonstram, nas condições adequadas, pode substituir parcial ou completamente a aplicação de adubos nitrogenados. Dessa forma o trabalho teve como principal objetivo avaliar o desenvolvimento das cultivares de cana-de-açúcar RB867515 e RB92579 sob a inoculação individual de cinco diferentes estirpes de bactérias diazotróficas, bem como inoculadas com uma mistura destas estirpes, sendo elas: *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11115), *Azospirillum amazonense* (BR 11281) e *Burkholderia tropica* (BR 11366). O projeto foi composto por um delineamento fatorial 2 x 7 de modo inteiramente casualizado. Coletou-se na área experimental da UFFS – Campus Chapecó, microtoletes de cana-de-açúcar que foram inoculados e conduzidos em câmara de germinação. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 5% e, em caso de significância, realizou-se à análise de regressão utilizando o programa WinStat®. Os resultados apontaram as misturas de estirpes como o melhor tratamento para ambas as cultivares, além disso, destacou-se a inoculação individual de *B. tropica* para a cultivar RB867515.

Palavras-chave: *Saccharum* sp.; bactérias diazotróficas; inoculação; fixação biológica de nitrogênio.

ABSTRACT

Brazil is the largest producer of sugarcane (*Saccharum* sp.) in the world. The cultivation is today one of the most important for national agribusiness, being the raw material of greater viability for the production of biofuels. Despite this, there is still much to be improved in the cultivation of sugarcane in the country, including with regard to plant nutrition. Nitrogen fertilization is one of the most limiting factors for the development and expression of the productive potential of the crop, however, this practice can become very costly for the producer, making it necessary to search for alternatives that combine lower cost with the constant search for increases in productivity. Thus, is created the inoculation of diazotrophic rhizobacteria. The ability to fix atmospheric nitrogen that these microorganisms demonstrate, in the right conditions, can partially or completely replace the application of nitrogenous fertilizers. In this way, the main objective of this work was to evaluate the development of sugarcane cultivars RB867515 and RB92579 under individual inoculation of five different strains of diazotrophic bacteria, as well as inoculated with a mixture of these strains, being: *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11115), *Azospirillum amazonense* (BR 11281) and *Burkholderia tropica* (BR 11366). The design of the project consisted of a 2 x 7 factorial design, delineated in a completely randomized. It was collected in the experimental area of UFFS - Campus Chapecó, sugarcane setts that were inoculated and conducted in a germination chamber. Data were submitted to analysis of variance by the F test (5% of significance) and, in the case of significance, the regression analysis was performed using the WinStat[®] program. The results indicated the mixtures of strains as the best treatment for both cultivars, besides that, the individual inoculation of *B. tropica* was highlighted for cultivar RB867515.

Key words: *Saccharum* sp.; diazotrophic bacteria; inoculation; biological nitrogen fixation

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Anna Maria, por me fornecer todo a compreensão, suporte e encorajamento necessários nessa conquista.

Agradeço aos meus colegas de curso por todo o auxílio e pela troca de experiências ao longo destes anos.

Agradeço ao colegiado de Agronomia da UFFS – Chapecó, por todos os ensinamentos recebidos.

Agradeço ao Prof. Dr. Siumar Pedro Tironi, por toda a orientação e atenção dedicadas a mim.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação como pessoa e profissional.

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Cultivo de cana-de-açúcar da área experimental da UFFS – Campus Chapecó: cultivo da cultivar RB92579 (A); cultivo da cultivar RB867515 (B). 21
- Quadro 2** – Material para o procedimento da inoculação: microtoletes de cana-de-açúcar (A); grade com tubos de ensaio contendo inóculo das rizobactérias (B). 23
- Quadro 3** – Vasos após o plantio dos microtoletes (A); câmara de germinação utilizada para o cultivo das plantas (B); plantas prontas para a coleta de dados (C). 23
- Quadro 4** – Análise das variáveis: detalhe da obtenção de altura das plantas (A); detalhe da obtenção de diâmetro de colmo das plantas (B). 24
- Quadro 5** – Análise das variáveis: detalhe da obtenção do volume de raiz (A); clorofilômetro utilizado no estudo (B). 25
- Quadro 6** – Análise das variáveis: moagem das amostras em almofariz (A); amostras em tubos de ensaio prontas para serem colocadas no bloco digestor (B); exemplo de amostra no digestor de nitrogênio (C); exemplo de amostra (D). 26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores médios referentes aos parâmetros de altura, diâmetro de colmo, número de folhas e área foliar para a cultivar de cana-de-açúcar RB867515.	27
Tabela 2 – Valores médios referentes aos parâmetros de comprimento de raiz, volume de raiz e massa seca de raiz para as cultivares de cana-de-açúcar RB867515.	28
Tabela 3 – Valores médios referentes aos parâmetros de clorofila, massa verde e massa seca da parte aérea e teor de Nitrogênio da parte aérea para as cultivares de cana-de-açúcar RB867515.	29
Tabela 4 – Valores médios referentes aos parâmetros de altura, diâmetro de colmo, número de folhas e área foliar para a cultivar de cana-de-açúcar RB92579.	30
Tabela 5 – Valores médios referentes aos parâmetros de comprimento de raiz, volume de raiz e massa seca de raiz para as cultivares de cana-de-açúcar RB92579.	31
Tabela 6 – Valores médios referentes aos parâmetros de clorofila, massa verde, massa seca e teor de Nitrogênio para as cultivares de cana-de-açúcar RB92579.	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. OBJETIVO GERAL	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
4. METODOLOGIA	20
4.1. ÁREA DE ESTUDO	20
4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	20
4.3. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	20
4.4. PREPARO DAS AMOSTRAS	22
4.5. COLETA DE DADOS	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÕES	34
7. REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), desde o período colonial, é uma das culturas mais importantes para o agronegócio brasileiro, visto que o país se destaca como o maior produtor do mundo. Ao final da temporada 2018/19, deve ter alcançado uma área colhida de mais de 8,6 milhões de hectares, que devem render um valor próximo de 74 t/ha (volume aproximadamente 0,8% maior que o da safra anterior). O cultivo da cana-de-açúcar tem a tendência de se concentrar na região Centro-Oeste e, principalmente, na região Sudeste, tendo o estado de São Paulo como o principal produtor, com uma produção de aproximadamente 53% da totalidade nacional (CONAB, 2018).

Na região Sul o cultivo de cana-de-açúcar ainda é bastante tímido e variável devido as condições edafoclimáticas. A previsão para o Rio Grande do Sul na safra atual (2018/19) é que haja uma redução de 10% na área plantada, ficando em 1,1 mil hectares. Porém essa realidade aos poucos está sendo alterada, principalmente pela participação da cultura no estado do Paraná. A previsão é que nessa safra ocorra uma redução de 2,3% na área plantada, porém, essa redução se deve a maior tecnificação, já que áreas que não permitem a colheita mecanizada deixarão de ser utilizadas. Isso se evidencia nas previsões para a próxima safra, para a qual é esperado um aumento de 32% na área de renovação. A expressividade crescente da região Sul no cultivo da cana-de-açúcar se dá principalmente devido ao aumento da temperatura média, o que torna mais fácil a adaptação da cultura ao clima da região (CONAB, 2018).

Com o aumento da área cultivada e o crescimento da demanda por produtos derivados da cana-de-açúcar, principalmente por etanol, a cultura assume uma colocação de grande relevância para a indústria brasileira e, portanto, a busca por tecnologias que garantam uma produção de menor custo, sem que haja redução da produtividade ou desbalanço energético da cultura, passa a ser uma das principais preocupações para o ramo sucroenergético (CHAVES et al., 2015; PEREIRA et al., 2013).

Um dos principais limitantes para o desenvolvimento e acúmulo de massa seca da cultura é a disponibilidade de nutrientes no solo. O nitrogênio destaca-se como um dos principais nutrientes exigidos pela cultura, pelo fato de a maior parte do mesmo estar ligada a matéria orgânica ou na atmosfera em forma indisponível para as plantas. É nesse cenário que a inoculação de bactérias promotoras de crescimento surge como uma alternativa para aumento de produtividade e diminuição dos custos de cultivo. Tais

microrganismos têm a habilidade de, através da fixação biológica de nitrogênio (FBN), atuar como mecanismos de crescimento e suprimento de N para a planta (GUIMARÃES et al., 2010; AMBROSANO et al., 2013; CHAVES et al., 2015).

Cabe lembrar que experimentos realizados nas últimas duas décadas têm apontado que a inoculação de rizobactérias diazotróficas na cultura da cana-de-açúcar é uma tendência economicamente viável para o produtor, visto que pode substituir satisfatoriamente a maior parte, ou até mesmo toda da adubação nitrogenada (podendo promover um aumento de pelo menos 30% do acúmulo de N na planta inoculada). Proporcionando para o agricultor, uma economia considerável com insumos nitrogenados (MARQUES et al., 2008; PROCÓPIO et al., 2011; SCHULTZ et al., 2012; AMBROSANO et al., 2013; PROCÓPIO et al., 2014).

Nesse sentido, em função da importância da FBN, não só para o cultivo da cana-de-açúcar, mas para a agricultura como um todo, e da escassez de trabalhos utilizando, especificamente, essa seleção de estirpes separadas, uma vez que a maior parte dos pesquisadores estudam os efeitos da mistura, não se tem dados claros acerca do efeito de cada rizobactéria, ou das melhorias que podem promover no desenvolvimento da cultura de cana-de-açúcar. Portanto, esse trabalho se faz necessário para o melhor entendimento da influência das bactérias diazotróficas sobre a cultura da cana-de-açúcar.

2. OBJETIVOS

Com a finalidade de realizar estudos com as BFN, o estudo foi conduzido com alguns objetivos, divididos em geral e específicos.

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar o desenvolvimento, bem como, o acúmulo de nitrogênio em cultivares de cana-de-açúcar quando inoculadas com cinco diferentes estirpes de bactérias fixadoras de N atmosférico.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o desenvolvimento e o acúmulo de nitrogênio em plantas de cana-de-açúcar da cultivar RB867515 sob inoculação de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *Azospirillum amazonense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Burkholderia tropica* isoladas ou associadas.

Avaliar o desenvolvimento e o acúmulo de nitrogênio em plantas de cana-de-açúcar da cultivar RB92579 sob inoculação de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *Azospirillum amazonense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Burkholderia tropica* isoladas ou associadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A seguir será apresentada a revisão acerca dos temas abordados no presente estudo.

3.1. CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR

Atualmente o Brasil figura como o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, seguido à distância pela Índia. A produção na safra de 2017/2018 alcançou impressionantes 633,26 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, o que representa uma produtividade média de 72,543 t/ha; e a previsão é de que a safra 2018/2019 irá manter valores muito próximos a esses (CONAB, 2018).

As condições edafoclimáticas favoráveis ao cultivo da cana-de-açúcar e as grandes áreas empregadas nessa função, associadas à demanda mundial por etanol oriundo de fontes renováveis, tornam o complexo sucroalcooleiro um dos setores de maior importância para o agronegócio brasileiro, que desponta como o maior exportador desta commodity. A produção de etanol estimada para o período de 2018/19 é de 60,82 bilhões de litros, considerando etanol, etanol anidro e etanol hidratado. O estado de São Paulo ainda figura como o maior produtor, com aproximadamente 51,7% de toda a área cultivada no Brasil, seguido por Goiás, cuja área plantada representa 10,6% da área cultivada nacional (CONAB, 2017; CONAB, 2018).

Além disso, a cultura da cana-de-açúcar é de suma importância para a economia nacional devido a sua múltipla utilidade. A planta pode ser usada *in natura*, para consumo humano ou até mesmo para a alimentação animal, onde, segundo Siqueira et al. (2012), com os ajustes pertinentes nas dietas, apresenta bons resultados para animais de alta performance, tanto na produção de leite quanto na produção de carne. Brandão (2006), em seu estudo sobre a capacidade de remoção de contaminantes de petróleo de efluentes do bagaço da cana, observou que o produto apresenta grande potencial, podendo absorver até 99% da gasolina e 90% do n-heptano de soluções com baixo nível de contaminação.

Em seu estudo com vinhaça na fertirrigação da cana, Zolin et al. (2011) perceberam aumento no teor de carbono orgânico, o que ocasionou aumento de CTC e da qualidade do solo, elevando a produtividade da cultura. No uso de vinhaça para a produção de biogás, Pompermayer et al. (2003) observaram que o país tem grande potencial produtivo, além de o produto se mostrar altamente competitivo com outros energéticos, incluindo produtos à base de combustível fóssil. Além, é claro, dos

principais produtos derivados da cultura: o açúcar, cuja produção deve atingir 34,26 milhões de toneladas no período de 2018/19; e o etanol, que deve alcançar uma produção de 30,41 bilhões de litros na safra 2018/19 (CONAB, 2018).

Somando-se a esses dados, podemos perceber que as restrições ao uso de hidrocarbonetos fósseis vêm promovendo a produção de biocombustíveis, especialmente devido a questões de preço e impacto ambiental, alavancando assim, o uso de hidrocarbonetos de origens renováveis, tais como os vegetais. Assim, o valor da cana-de-açúcar no mercado mundial, bem como sua participação no PIB agropecuário nacional, que hoje representa aproximadamente 0,5%, só tende a crescer nos próximos anos. Dessa forma, com o aumento da área plantada e da demanda pelo produto, cresce a busca por tecnologias que tornem o cultivo da cana-de-açúcar mais lucrativo e sustentável.

Visto que a sustentabilidade agrícola da cana-de-açúcar está diretamente ligada à sua resistência a pragas, doenças e intempéries, hoje temos uma série de instituições públicas ou privadas (IAC, RIDESA, COOPERSUCAR e CANAVIALIS) voltando seus esforços para o melhoramento genético de cana-de-açúcar de forma a dispor cultivares que se adequem a atual demanda por sustentabilidade e menor impacto ambiental em todos os setores da cadeia produtiva, além da busca por aumentos na produtividade por meio de novas cultivares adequadas as práticas culturais modernas, como a fertirrigação (VITTI et al., 2005a; ZOLIN et al., 2011; CEPEA/ESALQ, 2018; GOES et al., 2008).

As variedades de cana-de-açúcar utilizadas no presente estudo surgiram de uma parceria público-privada. A cultivar RB92579 foi desenvolvida a partir da fecundação da cultivar RB75126 com o pólen da cultivar RB72199. É uma variedade que com alto perfilhamento, alto teor de açúcares totais recuperáveis e ampla janela de plantio. Hoje representa 37% de área colhida do Nordeste brasileiro. Enquanto a variedade RB867515 é produto de um policruzamento, tendo como progenitora a variedade RB72454. Esta é a variedade mais plantada no mundo, representando 25% da área cultivada brasileira, apresenta bom desempenho, mesmo sob plantio tardio e baixas temperaturas e é capaz de apresentar boa produtividade mesmo em caso de florescimento. Ambas se destacam pela alta interação com diversas linhagens de bactérias diazotróficas (DAROS et al., 2008; LIRA-CADETE et al., 2012).

3.2. RIZOBACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

Bactérias diazotróficas são aquelas capazes de fixar o nitrogênio atmosférico através da FBN, ou seja, através de reações bioquímicas transformam N_2 em uma forma usável para a planta. Esses organismos são encontrados na rizosfera em associação com espécies vegetais ou em uma associação endossimbiótica, como ocorre em diversos indivíduos da família Poaceae, como arroz, milho ou cana-de-açúcar. Essas associações são de fundamental importância para o ciclo do N, visto o volume do nutriente mantido em fluxo nas formas de amônia, nitrato e compostos orgânicos, além de ser responsável por uma substancial economia dos recursos empregados na produção de fertilizantes nitrogenados (VIDEIRA et al., 2007).

Nas pesquisas para o descobrimento de novos organismos fixadores de N, foram isoladas algumas espécies de bactérias do gênero *Azospirillum*, e em seguida muitas outras estirpes foram isoladas, como as bactérias dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* (KUSS et al., 2007). Nas últimas duas décadas, então, vêm sendo realizados experimentos que comprovam que essas bactérias diazotróficas são capazes de substituir completa ou parcialmente o uso de adubação nitrogenada na cultura da cana-de-açúcar, promover a solubilização de fosfato e zinco, atuarem na produção de sideróforos e reguladores de crescimento, além de apresentarem grande eficiência na descontaminação do solo, aumentando assim a fitorremediação (CAMARGO et al., 2011; GÍRIO et al., 2015; SCHULTZ et al., 2014).

Além do incremento de N e do aporte na solubilização e produção de nutrientes de interesse para a planta, segundo Chaves et al. (2015), as bactérias diazotróficas endofíticas podem potencializar a capacidade de absorção de água e nutrientes da planta através da produção de reguladores de crescimento, que possibilitam um melhor desenvolvimento do sistema radicular. Somado a isso, a inoculação de organismos diazotróficos tende a aumentar a velocidade de brotação das gemas e emissão das raízes, o que é bastante desejável, visto o sistema de mudas pré-brotadas que atualmente predomina na produção brasileira.

As bactérias utilizadas neste experimento fazem parte de um grupo de estirpes que pesquisadores da Embrapa Agrobiologia, Seropédica - RJ estudaram por 25 anos, até desenvolver uma mistura supostamente ideal para a inoculação de cana-de-açúcar, visando a substituição da adubação nitrogenada usada nesta cultura (REIS et al. 2009). Boa Sorte (2013), monitorando a colonização e estabelecimento das bactérias em questão em cana-de-açúcar inoculada com a mistura, concluiu que as bactérias infectam homoganeamente todos os tecidos da planta e se mostram resistentes ao uso de

antibióticos, configurando a mistura de estirpes como um inóculo capaz de desempenhar um papel muito importante na agricultura nacional, pelas características que ela concede a cultura.

As duas estirpes do gênero *Herbaspirillum* são muito semelhantes entre si. Ambas são betaproteobactérias encontradas majoritariamente no Brasil e Hawaii, que apresentam caráter endofítico, colonizando em poucas horas raízes, colmos e folhas e proporcionando aporte, não apenas no nitrogênio, mas também em outros compostos. *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* podem ser distintas através do uso de sondas de oligonucleotídeos desenvolvidas propriamente para essa função (DÖBEREINER et al., 1995; OLIVARES et al., 1996; PEDROSA et al., 2011). O gênero *Burkholderia* é aquele entre essas estirpes que foi descoberto mais recentemente, porém já é muito difundido como inoculante para fixação de N₂. Esse gênero tem grande afinidade com frutíferas, o que proporciona também, estudos com culturas como banana, abacaxi ou tomate (REIS et al., 2004; BERNABEU et al., 2015).

As bactérias do gênero *Azospirillum*, mais precisamente *A. amazonense*, que leva esse nome por ter sido inoculada inicialmente em forrageiras da região amazônica, têm características marcantes de aerotaxia, assim sendo, seu comportamento está diretamente ligado ao nível de O₂ no meio, e têm promovido respostas na planta não apenas referentes ao N₂ fixado, mas também de outros compostos, como o ácido indolacético (AIA) (DÖBEREINER et al., 1995; KUSS et al., 2007). A bactéria *G. diazotrophicus*, além de também ser produtora de fitormônios como AIA e ácido giberélico (GA₃), atua como um agente de biocontrole contra *Meloidogyne incognita* e os fitopatógenos *Colletotrichum falcatum* e *Xanthomonas albilineans*, causadores, respectivamente da podridão-vermelha-da-cana-de-açúcar e da escaldadura-das-folhas (SARAVANAN et al., 2007; SARAVANAN et al., 2008).

3.3. RELAÇÃO ENTRE CANA-DE-AÇÚCAR E BACTÉRIA

Associada ao potencial produtivo das cultivares, a disponibilização de nitrogênio, inclusive com aplicação complementar de vinhaça, é um dos fatores mais limitantes na cultura da cana, tanto no desenvolvimento da planta quanto na expressão desse seu potencial produtivo. Sabe-se que, se a adubação nitrogenada não for feita conforme as exigências, embora a produtividade naquela safra não seja significativamente afetada, as colheitas seguintes apresentarão uma queda de rendimento considerável. Isso ocorre, pois, a resposta da cana-planta a adubação

nitrogenada se reflete no maior vigor das soqueiras. Portanto, o acréscimo produtivo será visível nos cortes subsequentes (TRIVELIN et al., 1996; VITTI et al., 2007; AMBROSANO et al., 2013).

Entre as principais funções do N na planta, está a composição da estrutura da molécula de clorofila e, portanto, participação no processo de fotossíntese. Uma planta que apresente deficiência de N e, dessa forma, do teor de clorofila, não será capaz de manter sua taxa fotossintética em níveis adequados para a obtenção de uma produção satisfatória. Inúmeros estudos comprovam a correlação de teor de N com o índice SPAD (obtido por um medidor de SPAD (Soil Plant Analysis Development), que avalia quantitativamente a intensidade da cor verde na folha), altamente correlacionável com o teor de clorofila da folha, bem como a relação diretamente proporcional entre o aumento destes índices e o aumento da produtividade da cultura (GIL et al., 2002; REIS et al., 2006).

Assim sendo, o implemento de N no solo se faz necessário para alcançar o potencial produtivo da cultura, porém, essa prática pode ser muito onerosa para o produtor, visto que a ureia, fertilizante mineral mais comumente utilizado no cultivo de cana-de-açúcar, deve ser incorporada ao solo, prática essa que tem sido dificultada devido a densa camada de palhada que resulta da atual tendência à colheita sem queima. Portanto, uma estratégia economicamente vantajosa para o produtor é a utilização de microrganismos fixadores de N atmosférico substituindo parte da adubação nitrogenada (PROCÓPIO et al., 2014).

É sabido que a cana-de-açúcar é capaz de manter uma relação de mutualismo com diversas estirpes de rizobactérias diazotróficas, que figuram de maneira bastante uniforme entre os tecidos da raiz, colmo e folhas. Assim, têm-se intensificado os estudos acerca da associação de bactérias diazotróficas inoculadas em cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1996; TAULÉ et al., 2012; PEREIRA et al., 2013). Nessa relação, a cana-de-açúcar funciona como hospedeira para bactérias endossimbióticas oferecendo alimento (compostos a base de C, como glicose, frutose e sacarose) e um ambiente protegido e favorável para seu desenvolvimento e, em troca disto, é beneficiada com algumas vantagens ecológicas, como um aporte no crescimento vegetal, derivado da habilidade que essas bactérias possuem de suprir a demanda de N da cana-de-açúcar via FBN, podendo haver maior acúmulo de massa seca na cultura quando inoculada do que em cultivos a base de adubação nitrogenada (CHAVES et al., 2015; GÍRIO et al., 2015).

Apesar de a FBN ser o mecanismo mais estudado quando se trata de inoculação de plantas com diazotróficas, estudos comprovam que esses microrganismos são capazes de contribuir para o desenvolvimento da planta de diversas formas. Entre elas podemos citar: a produção de fitormônios promotores de crescimento como AIA e GA₃; a aceleração do processo de mineralização de nutrientes; a síntese de sideróforos, que, por sua capacidade de solubilizar e transportar Fe, auxiliam indiretamente no metabolismo de ácidos nucleicos, na transferência de elétrons e em funções catalíticas e estruturais; a solubilização de P e Zn e a síntese da enzima polifosfato quinase, responsável pela síntese de polifosfatos; e o efeito antagônico que exerce sobre patógenos, tais como, *Meloidogyne incognita*, *Colletotrichum falcatum* e *Xanthomonas albilineans* (VITTI et al., 2005b; SARAVANAN et al., 2007; PEDROSA et al., 2011; PEREIRA et al., 2013).

Reis et al. (2009), comparando o rendimento de cultivos inoculados com uma mistura de espécies de bactérias diazotróficas com cultivos nos quais utilizou-se adubação nitrogenada, encontraram acréscimo de 37% na produção de colmos na cana-planta e até 19% na segunda soca, resultados que ultrapassam significativamente o cultivo com adubação nitrogenada.

4. METODOLOGIA

A metodologia será descrita de maneira detalhada para melhorar o entendimento da mesma.

4.1. ÁREA DE ESTUDO

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Sementes e Grãos da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, *Campus* Chapecó.

4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento utilizado no experimento foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os tratamentos foram compostos por um fatorial 2 x 7, em que o primeiro fator foi composto pelas cultivares de cana-de-açúcar RB867515 e RB92579 (Quadro 1); e o segundo fator foi composto pela inoculação com as estirpes das bactérias: *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335), *Azospirillum amazonense* (BR 11115), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Burkholderia tropica* (BR 11366), mistura de todas as bactérias e testemunha sem inoculação.

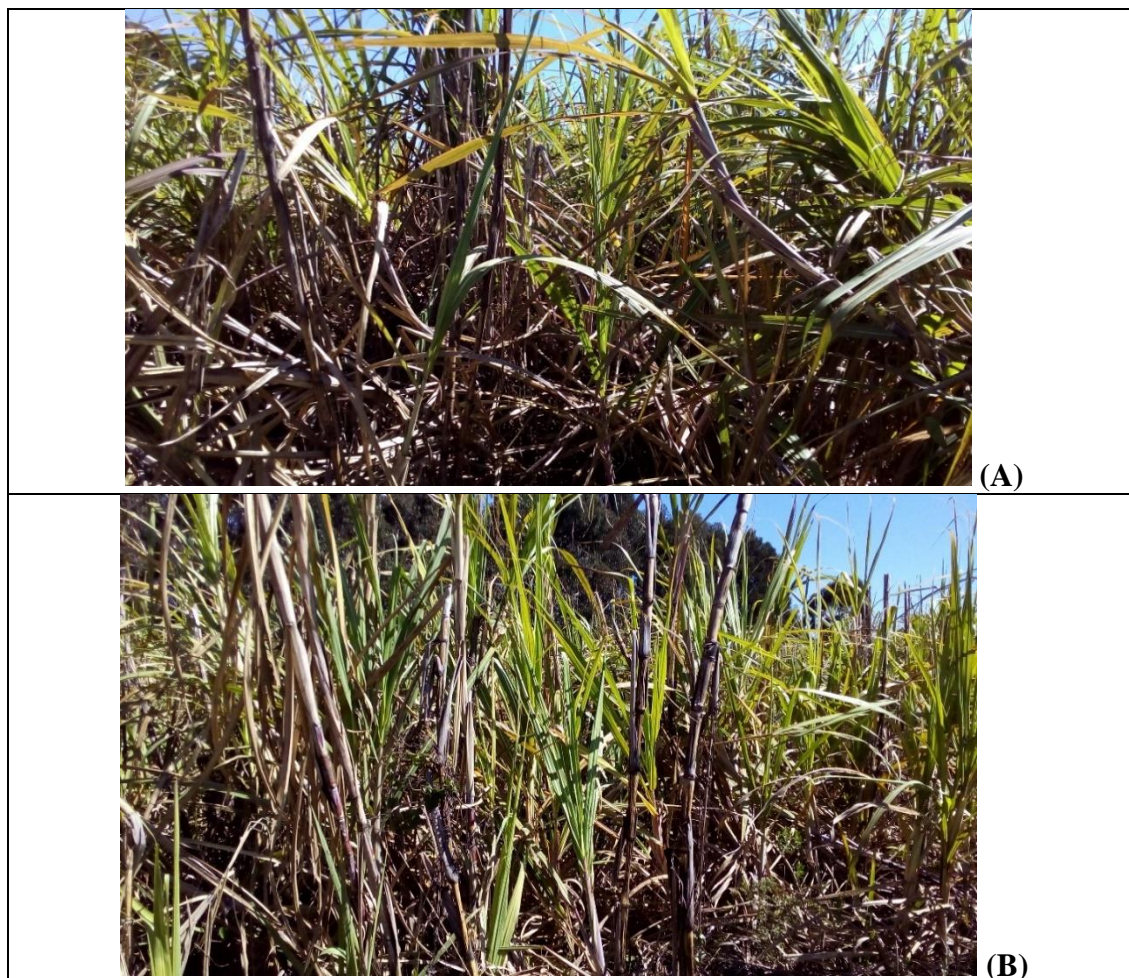
As variáveis respostas levadas em consideração durante o levantamento de dados foram: altura das plantas; diâmetro do colmo; número de folhas; área foliar; comprimento da raiz; volume da raiz; massa seca da raiz; teor de clorofila; massa verde; massa seca e o teor de nitrogênio das folhas de cana-de-açúcar.

4.3. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Para formação do substrato utilizado na propagação das mudas de cana-de-açúcar, foi coletado, da área experimental da UFFS – *Campus* Chapecó, uma amostra de solo classificado como LATOSSOLO VERMELHO Distroférico típico que foi misturado com areia lavada (aproximadamente 70% de solo e 30% de areia).

Para a propagação das plantas, foram utilizados microtoletes de cana-de-açúcar. As plantas-mãe das quais foram obtidos os microtoletes também foram cultivadas na área experimental da UFFS – *Campus* Chapecó.

Quadro 1 – Cultivo de cana-de-açúcar da área experimental da UFFS – Campus Chapecó: cultivo da cultivar RB92579 (A); cultivo da cultivar RB867515 (B).



Fonte: Autor, 2018.

As bactérias foram obtidas da coleção da Embrapa Agrobiologia, localizada no município de Seropédica – RJ, e multiplicadas em placas de petri contendo um meio de cultura semi-sólido específico. Posteriormente, ainda utilizando as placas de petri, as colônias de bactérias foram multiplicadas em 10 ml de meio de cultura líquido tipo *DYGS* (Dextrose Yeast Glucose Sucrose), cujo preparo é realizado com a mistura dos seguintes ingredientes: 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de dextrose (D-glicose), 20 g L⁻¹ de peptona bacteriológica, 0,5 g L⁻¹ de K₂HPO₄ e 0,5 g L⁻¹ de MgSO₄.7 H₂O para 1.000 ml de água destilada (adaptado de Quadros et al., 2014). Após isso a cultura seguiu para incubação por um período de 48 horas a 30°C. A densidade óptica (DO_{450 nm}), para todas as estirpes de bactérias, foi padronizada para aproximadamente 0,7.

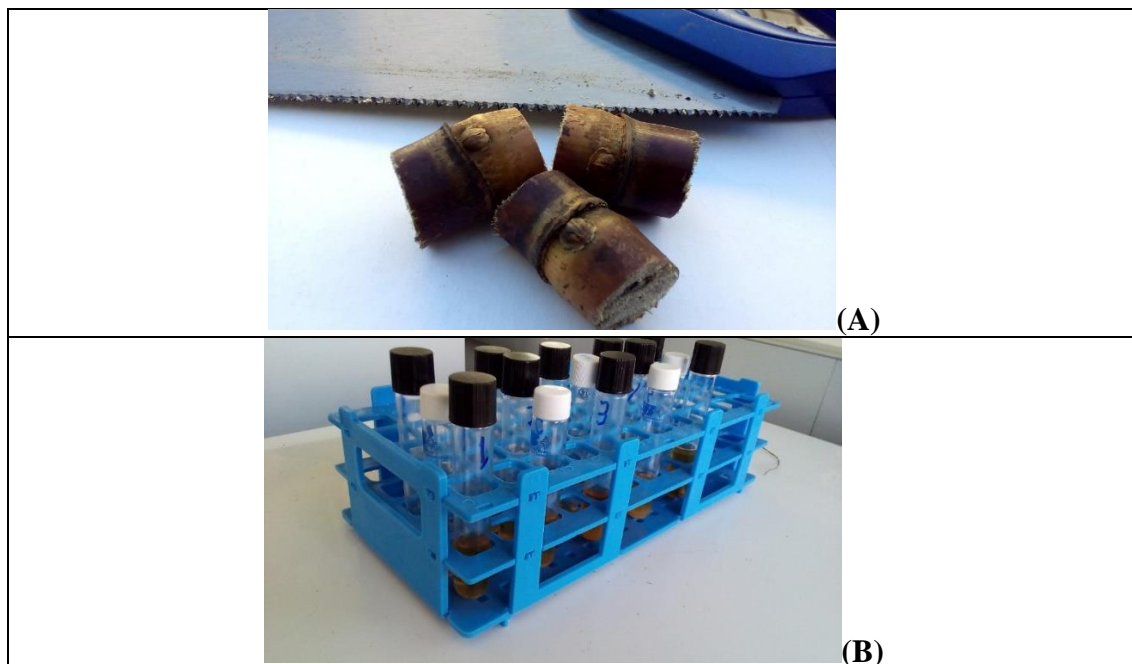
4.4. PREPARO DAS AMOSTRAS

A mistura de solo e areia coletada da área experimental da UFFS – *Campus Chapecó* foi autoclavada em aparelho de autoclav no Laboratório de Propagação de Plantas e Culturas Vegetais da UFFS. Esse procedimento é executado visando a completa esterilização do solo, visto que é de interesse que o substrato não apresente nenhum outro organismo além da planta e da respectiva bactéria diazotrófica, seja ele planta daninha ou outra estirpe de microrganismo do solo. A alta temperatura à qual o solo é exposto durante a autoclavagem desnatura alguns importantes compostos químicos presentes no meio, interferindo inclusive na estabilidade dos agregados. Devido a essa alteração, o substrato foi deixado em repouso por um período de 30 dias para recuperação desses compostos.

A propagação das mudas ocorreu por meio de microtoletes, estrutura semelhante ao tolete convencional, porém mais curta (aproximadamente 5 cm), com apenas uma gema. Enquanto isso, as bactérias foram cultivadas em placas de petri, contendo cada uma delas uma porção de meio YPD (Yeast extract – Peptone – Dextrose) líquido, uma mistura de extrato de levedura (1%), peptona (2%) e glicose (2%) por 72 horas (KURIAMA et al., 2012). Antes de realizar a inoculação as gemas passaram por um processo de esterilização; para tal, elas foram imersas em álcool 70% por 2 minutos, em seguida imersas em hipoclorito de sódio 2% por um intervalo de 15 minutos e por fim, realizou-se a tríplice lavagem com água destilada autoclavada (DUTRA et al., 2011). Para a inoculação, as gemas foram imersas em meio líquido contendo 1% do cultivo da bactéria específica para aquele tratamento diluído em água (Quadro 2).

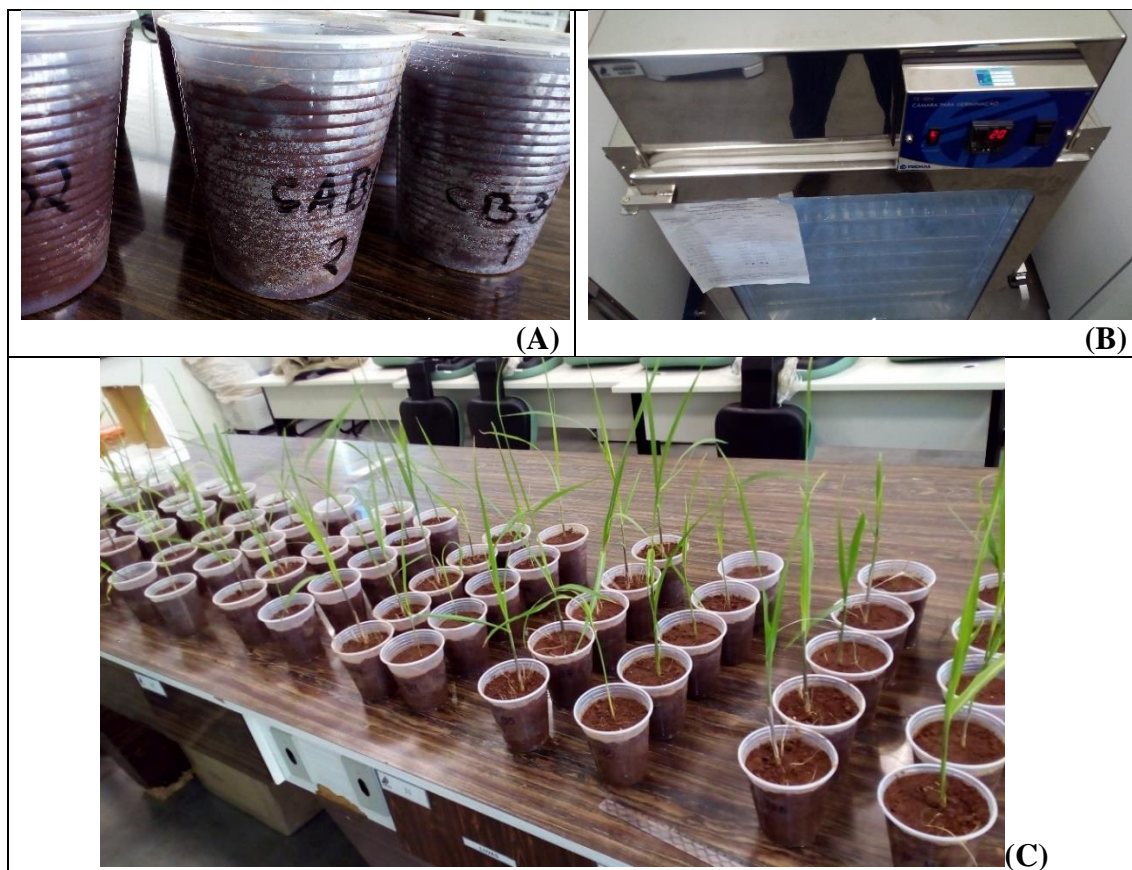
Os microtoletes de cana-de-açúcar foram inoculados com cada bactéria, conforme os tratamentos definidos. Posteriormente os mesmos foram plantados no substrato estéril obtido a partir da autoclavagem do solo. Para cada microtolete utilizou-se um vaso de 500 cm³ e o cultivo ocorreu em câmara de germinação à temperatura controlada de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. A irrigação das plantas foi realizada diariamente, assim como o acompanhamento do desenvolvimento das mesmas. Conforme se desenvolviam, as plantas utilizadas no experimento foram retiradas da câmara de germinação devido ao fato de terem alcançado uma altura maior do que suportavam as grades da câmara. Aos 60 dias após o plantio (FIETZ, 2015) as plantas foram retiradas dos vasos e as variáveis respostas foram medidas para a obtenção dos dados a serem processados (Quadro 3).

Quadro 2 – Material para o procedimento da inoculação: microtoletes de cana-de-açúcar (A); grade com tubos de ensaio contendo inóculo das rizobactérias (B).



Fonte: Autor, 2018.

Quadro 3 – Vasos após o plantio dos microtoletes (A); câmara de germinação utilizada para o cultivo das plantas (B); plantas prontas para a coleta de dados (C).

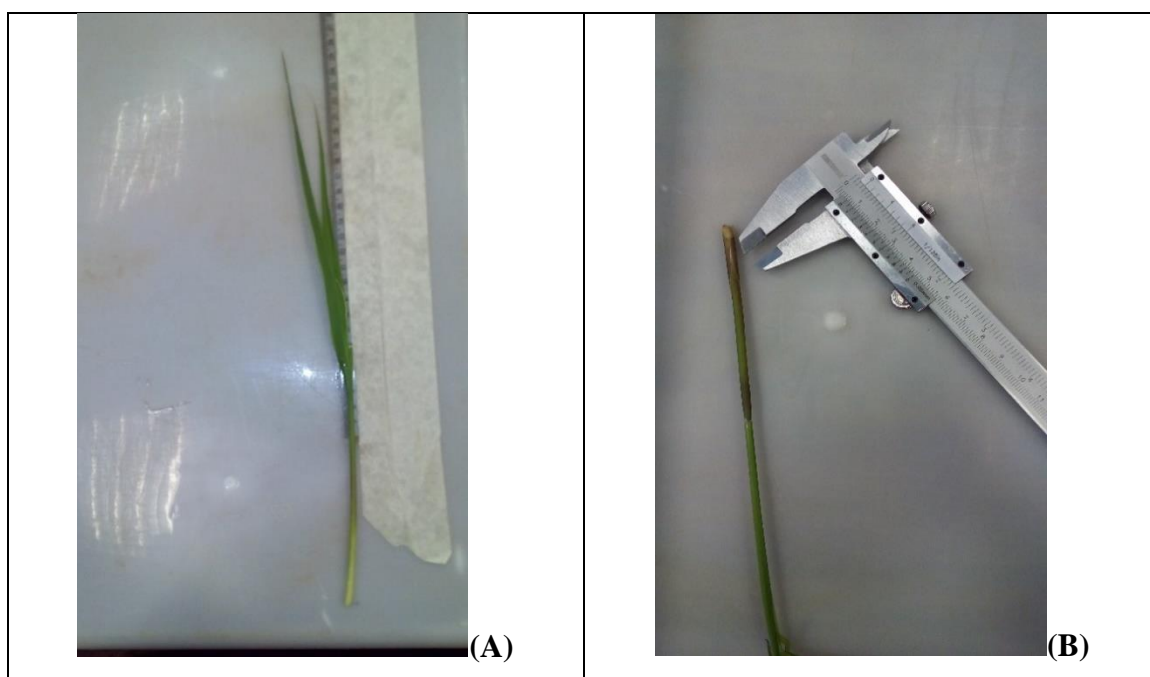


Fonte: Autor, 2018.

4.5. COLETA DE DADOS

A altura das plantas e do comprimento das raízes foram quantificadas com uma régua transparente de 30 cm. Para a altura foi tomado o comprimento a partir da base da parte aérea da planta até o ápice das folhas de maior comprimento. O comprimento de raízes foi obtido a partir do ponto de emissão das raízes na gema até a ponta de uma raiz média. Para a avaliação do diâmetro de colmo, utilizou-se um paquímetro analógico universal (Quadro 4).

Quadro 4 – Análise das variáveis: detalhe da obtenção de altura das plantas (A); detalhe da obtenção de diâmetro de colmo das plantas (B).



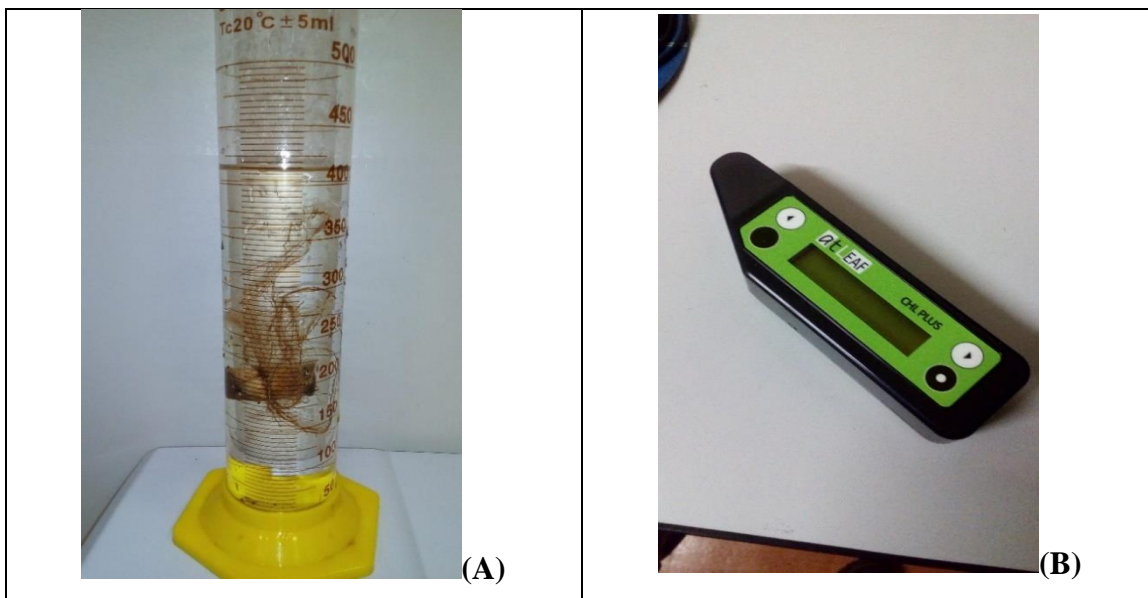
Fonte: Autor, 2018.

Para a obtenção da área foliar, utilizou-se a equação proposta por Hermann e Câmara (1999), que faz uso dos valores referentes ao comprimento da folha e da maior largura da folha (obtidos com régua transparente de 30 cm) e do número de folhas totalmente abertas e com pelo menos 20% da área verde ($AF = C \times L \times 0,75 (N + 2)$).

Para a avaliação do volume do sistema radicular, o mesmo foi lavado e mergulhado em proveta graduada contendo água. Em seguida, as raízes foram removidas do microtolete, que foi mais uma vez emergido em proveta graduada para que, dessa forma, fosse obtido o real valor do volume do sistema radicular – desconsiderando o microtolete. Para a análise de clorofila, utilizou-se um clorofilômetro digital portátil. A pesagem das amostras para obtenção de massa verde e massa seca foi

realizada com o auxílio de balança analítica. Para a análise de massa seca as amostras foram secas em estufa de secagem com circulação e renovação de ar (Quadro 5).

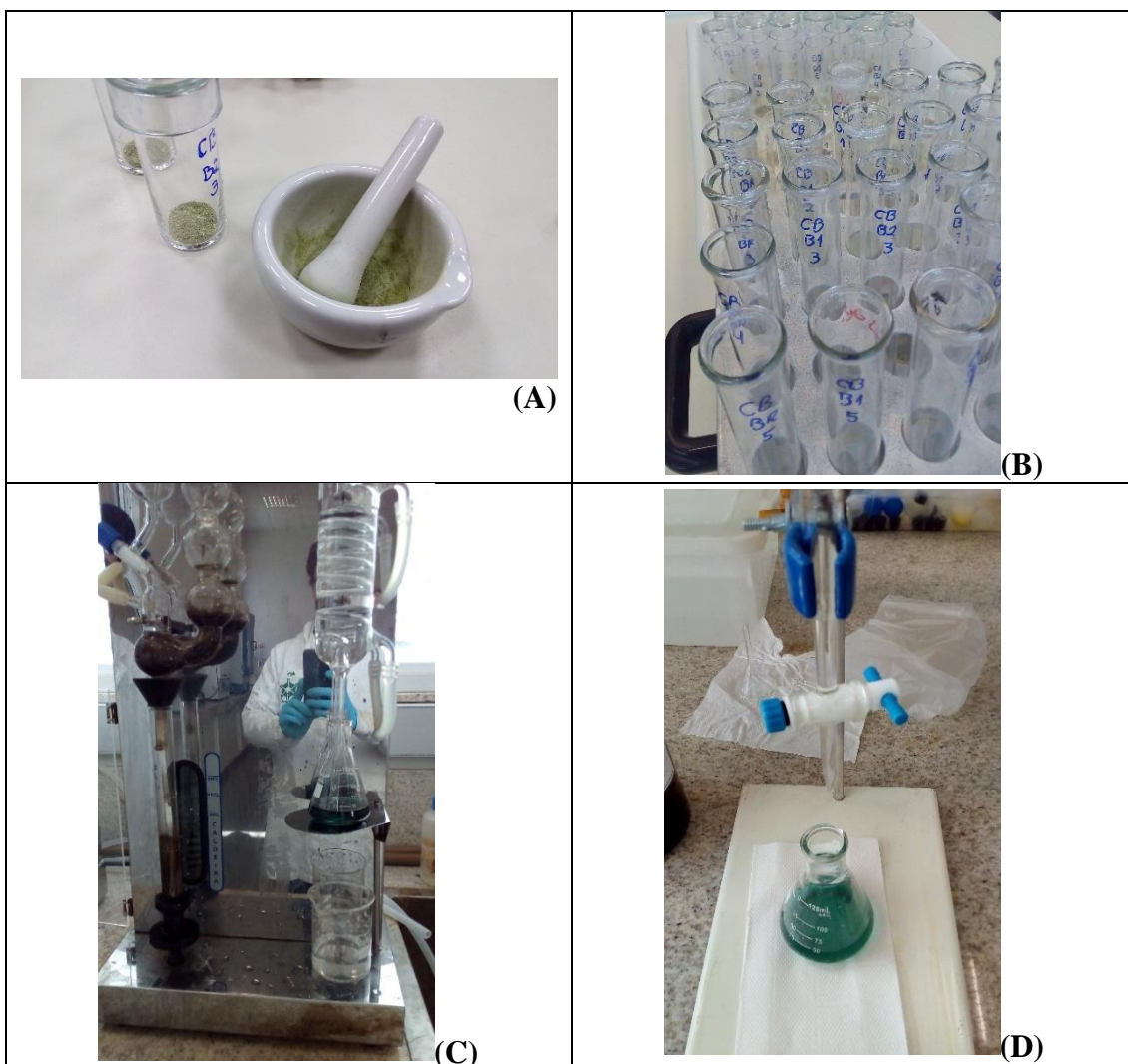
Quadro 5 – Análise das variáveis: detalhe da obtenção do volume de raiz (A); clorofilômetro utilizado no estudo (B).



Fonte: Autor, 2018.

Por fim, para a obtenção do teor de nitrogênio das plantas, a parte aérea das mesmas foram alocadas em sacos de papel e secas em estufa de circulação forçada de ar, a uma temperatura de 60°C por um período de 48 horas. As amostras secas foram moídas com o auxílio de um almofariz com pistilo de porcelana. As amostras moídas foram submetidas à digestão sulfúrica com o auxílio de chapa aquecedora e capela de exaustão de gases. Posteriormente foi determinado o teor de N total pelo método de Kjeldahl segundo metodologia utilizada por Silva (1999) utilizando-se um destilador de nitrogênio (Quadro 6).

Quadro 6 – Análise das variáveis: moagem das amostras em almofariz (A); amostras em tubos de ensaio prontas para serem colocadas no bloco digestor (B); exemplo de amostra no digestor de nitrogênio (C); exemplo de amostra (D).



Fonte: Autor, 2018.

4.6. ANÁLISE DOS DADOS

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade. Em caso de significância, os dados foram comparados pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Para a obtenção das análises estatísticas, utilizou-se o programa WinStat®.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, os resultados obtidos a partir do experimento descrito serão apresentados e discutidos com base na literatura.

5.1. CULTIVAR RB867515

Das variáveis altura, diâmetro do colmo, número de folhas e área foliar da cultivar RB867515, apenas a área foliar foi alterada pelos tratamentos, sendo os tratamentos com bactéria *B. tropica* e com a mistura de todas as estirpes apresentaram maiores valores para essa variável (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores médios referentes aos parâmetros de altura, diâmetro de colmo, número de folhas e área foliar para a cultivar de cana-de-açúcar RB867515.

Tratamentos	Variáveis			
	Altura (cm)	Diâmetro de colmo	Número de folhas	Área foliar (cm ²)
Testemunha	31,82 ^{NS}	0,29	3,00	45,56 AB*
<i>H. rubrisubalbicans</i>	33,60	0,33	3,33	57,81 AB
<i>H. seropedicae</i>	28,93	0,24	2,75	52,31 AB
<i>A. amazonense</i>	34,53	0,22	2,33	37,14 B
<i>G. diazotrophicus</i>	35,38	0,29	2,75	49,55 AB
<i>B. tropica</i>	34,50	0,31	3,20	67,72 A
Mistura	33,35	0,29	2,75	68,40 A
CV (%)	24,43	27,06	26,55	21,69

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Os parâmetros de altura e diâmetro do colmo não apresentaram diferença estatística entre as médias dos tratamentos, o que corrobora Chaves et al. (2015) e Gírio et al. (2015), que avaliando cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com as mesmas estirpes de bactérias, não encontraram diferença para tais parâmetros. Baldotto et al. (2010), avaliando diferentes estirpes de bactérias promotoras de crescimento em abacaxizeiro – entre as quais estão aquelas utilizadas no presente estudo – não detectou interferência das bactérias nos valores de altura, diâmetro do caule ou número de folhas.

Guimarães et al. (2010), em estudo com inoculação de bactérias na cultura do arroz, demonstrou que o gênero *Burkholderia* se destaca de outras estirpes de microrganismos diazotróficos em diversos parâmetros, inclusive em características morfológicas. As bactérias desse gênero têm habilidade de colonizar o hospedeiro

relativamente rápido e de maneira uniforme (BERNABEU et al., 2015). Se aliarmos essa informação aos dados obtidos em estudos com a cultivar RB867515 (OLIVEIRA et al., 2011; SCHULTZ et al., 2012; PEREIRA et al., 2013), que a colocam como uma cultivar que responde muito positivamente à inoculação de bactérias promotoras de crescimento, pode-se justificar o vigor demonstrado nos parâmetros de área foliar e volume de raiz pelas plantas inoculadas com a estirpe *B. tropica* (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores médios referentes aos parâmetros de comprimento de raiz, volume de raiz e massa seca de raiz para as cultivares de cana-de-açúcar RB867515.

Tratamentos	Variáveis		
	Comprimento de raiz (cm)	Volume de raiz (cm ³)	Massa seca de raiz (g)
Testemunha	8,76 AB*	5,50 B	0,22 ^{NS}
<i>H. rubrisubalbicans</i>	13,30 A	5,67 B	0,29
<i>H. seropedicae</i>	9,78 AB	5,50 B	0,19
<i>A. amazonense</i>	6,53 B	5,33 B	0,22
<i>G. diazotrophicus</i>	8,10 AB	5,33 B	0,19
<i>B. tropica</i>	7,06 AB	11,40 A	0,24
Mistura	6,90 AB	11,68 A	0,20
CV (%)	32,75	25,31	36,57

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Nas demais variáveis relativas ao sistema radicular observou-se diferenças no comprimento de raiz, mas os tratamentos não alteraram a massa seca de raiz (Tabela 2). O comprimento de raiz apresentou maior valor no tratamento com a inoculação de *H. rubrisubalbicans*, que se diferenciou do tratamento com *A. amazonense*. Estes resultados corroboram Radwan et al. (2004), que avaliando o crescimento radicular inicial em trigo e arroz, observaram crescimento superior em plantas inoculadas com bactérias do gênero *Herbaspirillum*. Já o parâmetro de massa seca de raiz não mostrou diferença estatística, visto que a cultivar RB867515 não costuma mostrar grande variação quanto a acúmulo de biomassa na raiz (CHAVES et al. 2015).

As médias levantadas para o teor de clorofila não apresentaram diferença estatística entre si e se mantiveram dentro da média esperada para a cultura de cana-de-açúcar (SILVA et al., 2014). Nos parâmetros de acúmulo de massa da parte aérea, tanto verde quanto seca, a inoculação individual da estirpe *B. tropica* mostrou os melhores resultados, seguidos por aqueles obtidos com a mistura de estirpes, com a inoculação de

G. diazotrophicus, de *H. rubrisubalbicans* e, por fim, com o controle e com a inoculação de *A. amazonense* e *H. seropedicae* (Tabela 3). Embora não tenha obtido diferença estatística significativa, os valores absolutos obtidos por Chaves et al. (2015), são semelhantes aqueles levantados no presente estudo. O fato de a inoculação com *B. tropica* ter se destacado das demais, corrobora o que foi discutido anteriormente, a capacidade de se estabelecer rapidamente, aliada a resposta positiva da cultivar, proporcionam um acúmulo de biomassa inicialmente superior (OLIVEIRA et al., 2011; SCHULTZ et al., 2012; PEREIRA et al., 2013; BERNABEU et al., 2015).

Tabela 3 – Valores médios referentes aos parâmetros de clorofila, massa verde e massa seca da parte aérea e teor de Nitrogênio da parte aérea para as cultivares de cana-de-açúcar RB867515.

Tratamentos	Variáveis			
	Clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Massa verde (g)	Massa seca	Teor de nitrogênio (%)
Testemunha	46,28 ^{NS}	0,64 B*	0,17 AB	1,67 AB
<i>H. rubrisubalbicans</i>	43,20	0,73 B	0,17 AB	1,68 AB
<i>H. seropedicae</i>	45,28	0,57 B	0,14 B	1,90 AB
<i>A. amazonense</i>	47,37	0,75 AB	0,14 B	1,63 B
<i>G. diazotrophicus</i>	44,90	0,69 B	0,17 AB	1,89 AB
<i>B. tropica</i>	48,54	1,22 A	0,26 A	1,83 AB
Mistura	49,53	0,99 AB	0,22 AB	2,02 A
CV (%)	9,46	25,60	23,42	8,71

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

A variável mais representativa da eficiência de uma rizobactéria diazotrófica é o teor de nitrogênio que, na falta de um incremento do nutriente, é um reflexo do potencial de FBN. Para essa variável a mistura de bactérias apresentou melhor resultado, comparativamente a inoculação com *A. amazonense*. Para Malavolta (1982, apud ORLANDO FILHO et al., 1994), o teor adequado de N adequado para uma planta de cana-de-açúcar de primeiro ano está entre 1,9 e 2,1%. Usando essa escala como referência, o único tratamento que alcançou o teor de N desejado foi aquele com a mistura de bactérias, muito embora, outros com inoculação individual tenham chegado bastante próximo do mínimo necessário. A mistura de bactérias diazotróficas concedeu a planta um teor de N cerca de 20% maior do que a testemunha, valor relativamente baixo quando comparado aqueles encontrados na literatura, como em Schultz et al.

(2012), que encontrou aumento no acúmulo de N de 35% ou em Oliveira et al. (2002), que encontrou um aumento de 30% em comparação a tratamentos sem inoculação.

Apesar de não tão expressivo, o valor corresponde ao esperado. A mistura das cinco estirpes de bactérias diazotróficas conferiu à planta a maior disponibilidade de N absorvível. Vale ressaltar que a cultivar RB867515 apresenta a característica de ser muito exigente quanto a fertilidade do solo, assim sendo, a inoculação de diazotróficas seria mais eficiente como complemento à uma adubação nitrogenada (SCHULTZ et al., 2012).

5.2. CULTIVAR RB92579

As variáveis altura, diâmetro do colmo e número de folhas da cultivar RB92579 não foram influenciadas pela inoculação das bactérias fixadoras de N (Tabela 4). No entanto, a área foliar apresentou diferença estatística, sendo a mistura de todas as estirpes, o tratamento que apresentou maiores valores.

Tabela 4 – Valores médios referentes aos parâmetros de altura, diâmetro de colmo, número de folhas e área foliar para a cultivar de cana-de-açúcar RB92579.

Tratamentos	Variáveis			
	Altura (cm)	Diâmetro de colmo	Número de folhas	Área foliar (cm ²)
Testemunha	36,32 ^{NS}	0,30	3,00	43,34 AB*
<i>H. rubrisubalbicans</i>	33,98	0,31	2,75	27,23 C
<i>H. seropedicae</i>	32,60	0,34	3,25	45,29 AB
<i>A. amazonense</i>	33,52	0,26	3,00	36,33 ABC
<i>G. diazotrophicus</i>	28,14	0,19	2,80	27,75 C
<i>B. tropica</i>	33,73	0,28	2,50	31,91 BC
Mistura	36,65	0,29	3,50	48,94 A
CV (%)	29,09	26,00	19,82	9,73

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

As variáveis altura, diâmetro do colmo e número de folhas não apresentaram diferença, independentemente dos tratamentos, assim como na cultivar RB867515, visto que tais parâmetros sofrem menor influência da inoculação devido ao fato das cultivares apresentarem caráter tardio, como constata Oliveira et al. (2011). Baldotto et al. (2010), em seu estudo, não detectou interferência das bactérias nos valores de altura, diâmetro do colmo ou número de folhas. Já no diâmetro de área foliar, a mistura de bactérias

proporcionou melhores resultados, o que era esperado pois, segundo Chaves (2014), na cultivar RB92579, a inoculação tende a aumentar significativamente o desenvolvimento da parte aérea da planta.

Os parâmetros comprimento de raiz e massa seca de raiz não apresentaram diferença estatística (Tabela 5), o que corrobora a discussão de Chaves (2014) de que, em condições controladas, a inoculação não influencia no acúmulo de massa do sistema radicular.

Tabela 5 – Valores médios referentes aos parâmetros de comprimento de raiz, volume de raiz e massa seca de raiz para as cultivares de cana-de-açúcar RB92579.

Tratamentos	Variáveis		
	Comprimento de raiz (cm)	Volume de raiz (cm ³)	Massa seca de raiz (g)
Testemunha	14,60 ^{NS}	8,20 AB*	0,13
<i>H. rubrisubalbicans</i>	14,08	10,00 A	0,15
<i>H. seropedicae</i>	12,48	8,75 AB	0,15
<i>A. amazonense</i>	13,52	4,60 B	0,14
<i>G. diazotrophicus</i>	12,20	5,60 B	0,13
<i>B. tropica</i>	12,93	5,00 B	0,11
Mistura	11,98	6,00 AB	0,17
CV (%)	25,80	29,68	21,45

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Um estudo com uso do gênero *Herbaspirillum* em arroz, obteve bons resultados, em especial para *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Radwan et al., 2004). Nas variáveis relacionadas ao vigor radicular, tanto na cultivar RB92579 quanto na cultivar RB867515, pode-se notar menor vigor nas plantas inoculadas com *A. amazonense*.

A inoculação envolvendo as mesmas espécies de bactérias presentes neste estudo demonstrou que as estirpes *A. amazonense* e *B. tropica* têm baixa eficiência em transmitir o N atmosférico fixado por outros tecidos da planta, prejudicando, assim, o desenvolvimento inicial das amostras (testes realizados com 45 dias após inoculação) (OLIVEIRA et. al., 2002). Apesar disso, tais estirpes se recuperam em testes realizados com 200 e 400 dias após a inoculação. Esse efeito é causado, provavelmente, pelo fato de algumas espécies inibirem o desenvolvimento inicial das plantas por produzirem reguladores de crescimento em excesso quando em determinadas condições, como na presença de fontes KNO₃, NaNO₃, NaNO₃ ou KNO₂, que inibem a capacidade de

estabelecimento de bactérias do gênero *Azospirillum* (RADWAN, et al., 2004; CHAVES et al., 2014). Porém, apesar do relatado por Oliveira et al. (2002), no experimento com RB867515, a inoculação com *B. tropica* mostrou potencialização do vigor radicular; o que deve ter acontecido por se tratar de uma cultivar que responde de forma rápida e muito positiva à inoculação, enquanto os autores utilizaram em seu experimento a cultivar SP70-1143 que, assim como a RB92579, apresenta caráter tardio.

Os resultados referentes ao teor de clorofila não apresentaram diferença estatística (Tabela 6), no entanto, os valores estão dentro daquilo estipulado por Silva et al. (2014) em seu estudo de pigmento fotossintéticos em cana-de-açúcar sob estresse hídrico.

Tabela 6 – Valores médios referentes aos parâmetros de clorofila, massa verde, massa seca e teor de Nitrogênio para as cultivares de cana-de-açúcar RB92579.

Tratamentos	Variáveis			
	Clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Massa verde (g)	Massa seca	Teor de nitrogênio (%)
Testemunha	38,28 ^{NS}	0,68 ABC	0,14	1,64 B
<i>H.rubrisubalbicans</i>	42,45	0,65 BC	0,15	1,70 AB
<i>H. seropedicae</i>	39,68	1,03 AB	0,16	1,72 AB
<i>A. amazonense</i>	40,96	0,76 ABC	0,15	1,73 AB
<i>G. diazotrophicus</i>	36,60	0,53 BC	0,15	1,75 AB
<i>B. tropica</i>	38,08	0,47 C	0,13	1,73 AB
Mistura	39,05	1,06 A	0,16	2,01 A
CV (%)	25,80	29,68	21,45	8,88

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

A massa verde da parte aérea apresentou diferença entre os tratamentos, enquanto que a massa seca não apresentou. O que demonstra pequena contribuição das bactérias no desenvolvimento das plantas, considerando que a inoculação com *B. tropica*, apresentou menores valores. Pereira et al. (2013), comparando a inoculação individual das bactérias *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicaea* com a mesma mistura de cinco estirpes de bactérias na cultivar RB92579, observaram que não há diferença estatística entre os tratamentos no que diz respeito, tanto ao acúmulo de massa verde quanto ao de massa seca. O que corrobora o fato de, entre as inoculações individuais, as

do gênero *Herbaspirillum* mostraram maiores médias e se assemelham estatisticamente a mistura de estirpes.

O resultado para a variável teor de N na planta apresentou diferença entre os tratamentos, com maior valor na mistura entre bactérias, que diferiu da testemunha. Resultado semelhante daquele obtido com a cultivar RB867515, assim como no outro experimento, a mistura das cinco estirpes foi o único tratamento com o qual a planta obteve um teor do nutriente cerca de 20% superior ao da testemunha e entre a faixa prevista por Malavolta (1982, apud ORLANDO FILHO et al., 1994) como sendo a adequada para a cultura. Lira-Cadete (2012), avaliando a associação de bactérias diazotróficas com plantas de cana-de-açúcar, considerou a cultivar RB892579 a de melhor interação com esses microrganismos.

Assim sendo, mais uma vez nota-se a influência do comportamento tardio da cultivar, já que individualmente as inoculações apontaram resultados inferiores ao outro experimento, porém, a planta em questão mostra alto potencial produtivo, visto que, como aponta a literatura, a cultivar apresenta considerável aceleração em seu desenvolvimento (OLIVEIRA et al., 2002).

6. CONCLUSÕES

A inoculação da mistura das cinco estirpes de rizobactérias diazotróficas na cultivar RB867515 representou acréscimo significativo no acúmulo de N atmosférico.

Para o desenvolvimento inicial de microtoletes de cana-de-açúcar da cultivar RB867515, a inoculação da diazotrófica *B. tropica* se mostra a mais vantajosa entre as inoculações individuais.

Quando se compara as demais variáveis, a mistura não se destaca das demais, portanto, visto que a cultivar RB867515 é muito exigente quanto a fertilidade do solo, a mistura funcionaria melhor como um suplemento a adubação nitrogenada e não como uma alternativa.

A inoculação da mistura das cinco estirpes de rizobactérias diazotróficas na cultivar RB92579 representou acréscimo significativo no acúmulo de N atmosférico

Para o desenvolvimento inicial de microtoletes de cana-de-açúcar da cultivar RB92579, a inoculação da diazotrófica *H. rubrisubalbicans* se mostra a mais viável entre as inoculações individuais.

A inoculação das bactérias (tanto isolada quanto em mistura) não influenciou as variáveis de altura, diâmetro de colmo, número de folhas, massa seca de raiz ou clorofila.

A inoculação isolada de algumas bactérias se mostrou negativo em algumas variáveis, principalmente para área foliar e massa verde.

7. REFERÊNCIAS

AMBROSANO, E. J.; CANTARELLA, H.; ROSSI, F.; SCHAMMASS, E. A.; SILVA, E. C. da; AMBROSANO, G. M. B.; DIAS, F. L. F.; TRIVELIN, P. C. O.; MURAOKA, T. **Desempenho de adubos verdes e da primeira soqueira de cana-de-açúcar cultivados consorciadamente.** Revista Brasileira de Agroecologia, v.8, p.80-90, 2013.

BALDOTTO, L.E.B.; BALDOTTO, M.A.; OLIVARES, F.L.; VIANA, A.P. & BRESSAN-SMITH, R. **Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cultivar Vitória durante a aclimatização.** R. Bras. Ci. Solo, 34:349-360, 2010.

BERNABEU, P. R.; PISTORIO, M.; TORRES-TEJERIZO, G.; SANTOS P. E.; GALAR, M. L.; BOIARDI, J. L.; LUNA, M. F.. **Colonization and plant growth-promotion of tomato by *Burkholderia tropica*.** Sci Hortic (Amsterdam). 191:113–20; 2015.

BOA SORTE, P. M. F. **Utilização de diferentes técnicas para monitorar a colonização e estabelecimento de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de cana-de-açúcar.** Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo. Rio de Janeiro. P. 86. 2013

BRANDÃO, P. C. **Avaliação do Uso do bagaço de cana como adsorvente para remoção de contaminantes derivados do petróleo, de efluentes.** Uberlândia: Faculdade de Engenharia Química da UFU, 2006. 147 p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Química).

CAMARGO, D.; BISPO, K.L.; SENE, L. **Associação de *Rhizobium* sp. a duas leguminosas na tolerância à atrazina.** Revista Ceres, v.58, n.4, p.425-431, 2011.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA – CEPEA. **PIB Agro CEPEA-USP/CNA.** Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/>>. Acesso em: 15 de agosto de 2018.

Chaves, V. A. **Desenvolvimento inicial e acúmulo de nutrientes em três variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas.** Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2014. 76 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência do Solo).

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

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar**. V.4 - SAFRA 2017/18 - N.1 - Primeiro levantamento. Abril 2017. 62 p.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar**. V.5 - SAFRA 2018/19 - N.2 - Segundo levantamento. Agosto 2018. 76 p.

DAROS, E., R. A. OLIVEIRA, G. V. S. BARBOSA. **45 anos de variedades RB de cana-de-açúcar: 25 anos de Ridesa**. 1 ed. Curitiba: Graciosa, 156 p. 2015.

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

DUTRA, L. F.; DONINI, L. P.; SILVA, S. D. A.; SILVA, N. D. G.; THIEL, F. B.; VITÓRIA, J. M.; ZACARIAS, F. M. **Protocolo de Micropropagação de Cana-de-açúcar**. Circ. Técnica Embrapa Agrobiol. 128. p. 1–8. 2011.

FIETZ, C. R.; SILVA, C. J.; COMUNELLO, E.; FLUMIGNAN, D. L.; LEME FILHO, J. R. A. **Época preferencial para plantio da cana-de-açúcar de ano e meio, com base no risco climático, na região sul de Mato Grosso do Sul**. Circ. Técnica Embrapa Agrobiol. 35. p. 1–8. 2015.

GIL P.T.; FONTES P.C.R.; CECON P. R.; FERREIRA F. A. **Índice SPAD para o diagnóstico do estado de nitrogênio e para o prognóstico da produtividade de batata**. Horticultura Brasileira 20: 611-615. 2002.

GÍRIO, L. A. S.; DIAS, F. L. F.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; SCHULTZ, N.; BOLONHEZI, D.; MUTTON, M. A. **Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas**. Pesq. agropec. bras., v.50, n.1, p.33-43, 2015.

GOES, T.; MARRA, R. **A expansão da cana-de-açúcar e a sua sustentabilidade.**

EMBRAPA. 2008. Disponível em:

<<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/>>. Acesso em: 15 de agosto de 2018.

GUIMARÃES, S. L.; CAMPOS, D. T. S.; BALDANI, V. L. D.; JACOB-NETO, J.

Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em cultivares de arroz. Revista Caatinga, v.23, n.4, p. 32-39, 2010.

HERMANN, E.R.; CÂMARA, G.M.S. **Um método simples para estimar a área foliar de cana-de-açúcar.** Revista da STAB, 17: 32-34. 1999.

KURIAMA, F.; KURODA, E. K.; GUERGOLETTI, K. B.; GARCIA, S.; NOBREGA, G. M. A., TSUJI, K.; HARADA, K.; KIROOKA, E. Y. **Potencial de biodegradação de microcistinas por microrganismos.** Eng Sanit Ambient, 17: 181-186. 2012.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. **Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas.**

Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.42, n.10, p.1459-1465, 2007.

LIRA-CADETE, L.; FARIAS, A. R. B.; RAMOS, A. P. S.; COSTA, D. P.; FREIRE, F.

J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. **Variabilidade genética de bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar capazes de solubilizar fosfato inorgânico.**

Biosci. J., Uberlândia, v. 28, Supplement 1, p. 122-129, Mar. 2012.

MARQUES JÚNIOR, R. B.; CANELLAS, L. P.; SILVA, L. S.; OLIVARES, F. L.

Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. R. Bras. Ci. Solo, v.32, n.3, p.1121-1128, 2008.

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 21:197-200. 1996.

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

OLIVEIRA, E. C. A.; FREIRE, J. F.; OLIVEIRA, R. I.; OLIVEIRA, A. C.; FREIRE, M. B. G. S. **Acúmulo e alocação de nutrientes em cana-de-açúcar.** Revista Ciência Agronômica, v.42, p.579- 588, 2011.

ORLANDO FILHO, J.; MACEDO, N.; TOKESHI, H. **Seja doutor do seu canavial.** Inf. Agron., 67:1-16, 1994.

PANDOLFO, C.; BRAGA, H. J.; SILVA JR, V. P. da; MASSIGNAM, A. M., PEREIRA, E. S.; THOMÉ, V. M. R.; VALCI, F.V. **Atlas climatológico digital do Estado de Santa Catarina.** Florianópolis: Epagri, 2002. Disponível em: <http://www.ciram.epagri.sc.gov.br/ciram_arquivos/arquivos/atlasClimatologico/atlasClimatologico.pdf>. Acessado em: 10/06/2017.

PEDROSA, F. O.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R.; CRUZ, L. M.; AYUB, R. A. **Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses.** PLoS Genet 7: e1002064. 2011.

PEREIRA, W.; LEITE, J. M.; HIPÓLITO, G. S.; SANTOS, C. L. R.; REIS, V. M. **Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas.** Revista Ciência Agronômica, v. 44, n. 2, p. 363-370, 2013.

POMPERMAYER, R.S.; PAULA, D.R. **Estimativa do potencial brasileiro de produção do biogás através da biodigestão da vinhaça e comparação com outros energéticos.** Enc. Energ. Meio Rural, n.3, 2003.

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

PROCÓPIO, S.O.; FERNANDES, M. F.; TELES, D. A.; SENA FILHO, J. G.; CARGNELUTTI FILHO, A.; VARGAS, L. **Toxicidade de herbicidas utilizados na**

cultura da cana-de-açúcar à bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*.

Semina: Ciências Agrárias, v.35, n.5, p.2383-2398, 2014.

QUADROS, P.D.; ROESCH, L. F. W.; SILVA, P. R. F.; VIEIRA, V. M.; ROEHR, D. D.; CAMARGO, F. A. O. **Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*.** Revista Ceres, v.61, n.2, p. 209-218, 2014.

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

REIS, V. M.; SANTOS, P. E.; TENORIO-SALGADO, S. ***Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant associated bacterium.** *Int J Syst Evol Microbiol*, 54: 2155 – 2162, 2004.

REIS, A. R.; FURLANI JUNIOR, E.; BUZZETTI, S.; ANDREOTTI, M. **Diagnóstico da exigência em nitrogênio pela utilização do medidor portátil de clorofila.** Bragantia, 65:163-171, 2006.

REIS, V. M.; BALDANI, J.I.; URQUIAGA, S. **Recomendação de uma mistura de estirpes de cinco bactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação de cana-de-açúcar: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans*.** Circ. Técnica Embrapa Agrobiol. 30. p. 1–4. 2009.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M. **Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*.** Chemosphere, 66, pp. 1794-1798, 2007.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; OSBORNE, J.; THANGARAJU, M.; SA, T. M. **Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing Acetobacteraceae members: their possible role in plant growth promotion.** *Microb Ecol.*, 55: 130-140. 10.1007/s00248-007-9258-6, 2008.

SCHULTZ, N.; MORAIS, R. F.; SILVA, J. A.; BAPTISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P.; LEITE, J. M.; PEREIRA, W.; CARNEIRO JÚNIOR, J. B.; ALVES, B. J. R.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. **Avaliação agrônômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias**

diazotróficas e adubadas com nitrogênio. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.47, n.2, p.261-268, fev. 2012.

SCHULTZ, N.; SILVA, J. A.; SOUZA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; OLIVEIRA, R. P.; CHAVES, V. A.; PEREIRA, W.; SILVA, M. F.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. **Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.38, n.2, p.407-414, 2014.

SIQUEIRA, G. R.; ROTH, M. T. P.; MORETTI, M. H.; BENATTI, J. M. B.; RESENDE, F. D. **Uso da cana-de-açúcar na alimentação de ruminantes.** Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, 13:991-1008. out./dez., 2012.

SILVA, F.C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes.** Brasília, Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. 370p, 1999.

SILVA, A. M.; SANTOS, C. M.; VITORINO, H. S.; RHEIN, A. F. L. **Pigmentos fotossintéticos e índice SPAD como descritores de intensidade do estresse por deficiência hídrica em cana-de-açúcar.** Bioscience Journal, Uberlândia, v. 30, n. 1, p.173-181. 2014.

TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V. M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. **The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community.** Plant Soil, v.356, n.1, p.35-49, 2012.

TRIVELIN, P.C.O.; RODRIGUÊS, J.C.S.; VICTORIA, R.L.; REICHARDT, K. **Utilização por soqueira de cana-de-açúcar de início de safra do nitrogênio da aquamônia-15N e uréia-15N aplicado ao solo em complemento a vinhaça.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.31, p.89-99, 1996.

VIDEIRA, S. S.; ARAÚJO, J. L. S.; BALDANI, V. L. D. **Metodologia para Isolamento e Posicionamento Taxonômico de Bactérias Diazotróficas Oriundas de Plantas Não-Leguminosas.** Embrapa Documentos 234. Seropédica – RJ, p.7-13 2007.

VITTI, G.C.; QUEIROZ, F. E. C.; OTTO, R.; QUINTINO, T. A. **Nutrição e Adubação da Cana-de-açúcar.** Agência Embrapa de Informação Tecnológica. 2005a.

Disponível em:

<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Nutricao+cana+GVitti_000fh3r3vzp02wyiv80rn0etnmc6zamd.pdf>. Acesso em: 09 de julho de 2018.

VITTI, G.C.; QUEIROZ, F. E. C.; QUINTINO, T. A. **Micronutrientes na cana-de-açúcar: mitos e realidades**. Piracicaba: Potafos, In: II SIMPÓSIO DE TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR. 39p., 2005b.

VITTI, A.C.; TRIVELIN, P.C.O.; GAVA, G.J.C.; PENATTI, C.P.; BOLOGNA, I.R.; FARONI, C.E.; FRANCO, H.C.J. **Produtividade da cana-de-açúcar relacionada ao nitrogênio residual da adubação e do sistema radicular**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.42, p.249-256, 2007.

ZOLIN, C. A.; PAULINO, J.; BERTONHA, A.; FRESITAS, P.S.L.; FOLEGATTI, M. **V. Estudo exploratório do uso da vinhaça ao longo do tempo**. I. Características do solo. Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient., 15. pp. 22-28. 2011.