



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM SOQUEIRA DE CANA-DE-AÇÚCAR COM *Azospirillum brasiliense* E NA COMPATIBILIDADE COM AGROQUÍMICOS**

ANA CAROLINA MAROSTICA LINO

2018

ANA CAROLINA MAROSTICA LINO

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM SOQUEIRA DE CANA-DE-AÇÚCAR COM *Azospirillum brasiliense* E NA COMPATIBILIDADE COM AGROQUÍMICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Solos, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Gaspar Henrique Korndörfer

Co-orientador

Prof. Dr. Hamilton Seron Pereira

UBERLÂNDIA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

L758f Lino, Ana Carolina Marostica, 1988  
2018 Fixação biológica de nitrogênio em soqueira de cana-de-açúcar com  
*Azospirillum brasiliense* e na compatibilidade com agroquímicos / Ana  
Carolina Marostica Lino. - 2018.  
79 f. : il.

Orientador: Gaspar Henrique Korndörfer.  
Coorientador: Hamilton Seron Pereira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.739>  
Inclui bibliografia.

1. Agronomia - Teses. 2. Cana-de-açucar - Adubação - Teses. 3.  
Nitrogênio - Fixação - Teses. 4. Produtos químicos agrícolas - Teses. I.  
Korndörfer, Gaspar Henrique. II. Pereira, Hamilton Seron. III.  
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia. IV. Título.

---

CDU: 631

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

ANA CAROLINA MAROSTICA LINO

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM SOQUEIRA DE CANA-DE-AÇÚCAR COM *Azospirillum brasiliense* E NA COMPATIBILIDADE COM AGROQUÍMICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Solos, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 09 de Fevereiro de 2018.

Prof<sup>a</sup>. Dr. Lucélia Alves Ramos

UFU

Dr. Gustavo Alves Santos

KP Consultoria

Dr. Caio Fortes

BASF



Prof. Dr. Gaspar Henrique Korndörfer  
ICIAG-UFU  
(Orientador)

UBERLÂNDIA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2018

Aos meus pais,

**Luiz Carlos** e **Rosimeiri**, agradeço pelo exemplo de vida, de caráter, pelo carinho, atenção, ensinamentos e dedicação à minha formação pessoal e profissional

Aos meus queridos avós,

em especial à vó **Nair**, pelo amor incondicional, carinho e inspiração.

## **OFEREÇO**

Ao meu irmão,

**Diego** e sua família, principalmente à minha afilhada, **Lívia**, agradeço pelos dias felizes, apoio nos dias mais tristes e por ter me dado uma das melhores experiências, ser madrinha.

Ao meu marido,

**Marcelo**, pelo amor, companheirismo, por fazer parte desse momento e por me incentivar a cada dia ser melhor.

Aos amigos e familiares,

por fazerem parte da minha vida e formação pessoal.

## **DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida, pela minha família, pelo conhecimento e pelas oportunidades de viver momentos e realizar sonhos, mesmo nas horas em que não fui perseverante em confiar.

À Universidade Federal de Uberlândia – UFU, em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Gaspar Henrique Korndörfer, e co-orientador, Prof. Dr. Hamilton Seron Pereira, pela orientação e oportunidade deste trabalho.

Ao Gustavo Alves Santos, pela ajuda e pelo apoio na condução deste trabalho, e pela atenção, paciência e ensinamentos desprendidos em todo o período em que trabalhamos juntos.

À toda a galera do Lafer, pela ajuda na instalação, condução e análises do experimento, em especial para o Antônio Neto, Thiago Prudente, Luiz Felipe, Luiz Henrique, Bruno Guimarães, Lucélia Ramos e Bruno Nicchio.

À professora Nilvanira e a técnica do laboratório LABAC Lara, pela ajuda no desenvolvimento e aprendizado dos experimentos realizados com a bactéria no laboratório.

Ao Caio Fortes pelo apoio, ensinamentos e por fazer parte da minha formação profissional.

Ao Centro de Tecnologia Canavieiro – CTC, onde estou tendo a oportunidade de trabalhar e me capacitar, especialmente aos profissionais Cláudimir P. Penatti, Ivo F. Bellinaso, Antônio C. Joaquim, Mauro Violante e Fernando Sesso, pelos ensinamentos e auxílio na conclusão deste trabalho.

Às usinas Bioenergética Aroeira e Açucareira Guaíra pela disponibilização da área experimental e todos os outros recursos necessários na condução do experimento.

À Capes pelo tempo de auxílio financeiro para o projeto.

À empresa Stoller por acreditar no potencial desse estudo.

A todos que puderam contribuir direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho e que fizeram parte desta minha jornada,

**MUITO OBRIGADA!**

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
2.1 A cultura da cana-de-açúcar ( <i>Saccharum officinarum L.</i> ) .....	10
2.2 Nutrição em cana-de-açúcar .....	10
2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio .....	12
2.3.1 FBN na nutrição de plantas .....	12
2.3.2 FBN na cultura da cana-de-açúcar.....	13
2.3.3 <i>Azospirillum brasilense</i> .....	15
REFERÊNCIAS .....	18
CAPÍTULO 1 – Compatibilidade biológica de <i>Azospirillum brasilense</i> com agroquímicos utilizados no manejo fitossanitário em cana-de-açúcar .....	24
RESUMO .....	24
ABSTRACT .....	25
1 INTRODUÇÃO.....	26
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1 Produtos utilizados .....	27
2.2 Multiplicação da bactéria.....	28
2.3 Antibiograma .....	29
2.4 Delineamento experimental.....	31
2.5 Avaliações .....	31
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
3.1 Multiplicação da bactéria.....	33
3.2 Contagem da bactéria .....	34
3.3 Antibiograma .....	36
4 CONCLUSÕES .....	40
REFERÊNCIAS .....	41
CAPÍTULO 2 – Aplicação foliar de <i>Azospirillum brasilense</i> no desenvolvimento, produção e qualidade da cana-de-açúcar .....	43
RESUMO .....	43
ABSTRACT .....	44
1 INTRODUÇÃO.....	45

2 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.1 Caracterização do produto contendo <i>Azospirillum brasiliense</i> .....	46
2.2. Delineamento experimental.....	46
2.3 Instalação.....	47
2.4 Avaliações .....	48
2.5 Análises estatísticas .....	51
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	52
3.1 Concentração de N foliar.....	52
3.2 Quantidade de perfilhos por metro .....	54
3.3 Extração de N pela parte aérea .....	57
3.4 Produção de colmos e de açúcar.....	60
3.5 Parâmetros de qualidade.....	64
3.6 Considerações finais .....	69
4 CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS .....	71
ANEXOS .....	76
Anexo A – Caracterização das variedades plantadas nos experimentos. ....	76
Anexo B – Caracterização química e física do solo da área de instalação do experimento. .....	77
Anexo C – Contagem de bactérias no solo.....	78
Anexo D – Informações pluviométricas das áreas experimentais.....	79

## **1 INTRODUÇÃO**

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), sendo considerada uma das culturas de maior importância econômica, e com matéria-prima que permite os menores custos de produção de açúcar e álcool pelo fato da energia consumida no processo ser proveniente dos próprios resíduos.

A fertilização nitrogenada na cultura da cana-de-açúcar apresenta baixa eficiência, com pequeno aproveitamento do nitrogênio (N) aplicado. Aumentar a eficiência do uso de N ainda é um desafio, e o inoculante à base de bactérias diazotróficas pode ser uma alternativa eficaz (SCHULTZ et al., 2012).

A função de transformar o N existente no ar atmosférico em formas assimiláveis para plantas - Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) - é realizada por bactérias fixadoras (diazotróficas), sendo a enzima universal, envolvida no processo, conhecida como nitrogenase. Urquiaga et al., (2012), conduziram experimento utilizando o método de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  e balanço de N para quantificar a contribuição da FBN em dez variedades de cana-de-açúcar, e obtiveram valores superiores a 60% de N, absorvido pela planta, proveniente das bactérias.

O gênero *Azospirillum* é um dos mais estudados entre as bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal, e vem sendo utilizado em inoculantes para culturas como a da cana-de-açúcar, para a qual estudos obtiveram resultados positivos principalmente no desenvolvimento da planta e na produtividade.

O mercado brasileiro de fertilizantes é frágil e com grande dependência de importações. É fundamental, portanto, encontrar alternativas para o uso mais eficiente dos fertilizantes e, nesse contexto, alguns microrganismos, como as bactérias diazotróficas, podem desempenhar um papel relevante e estratégico para garantir altas produtividades a baixo custo. Portanto, é interessante conhecer se a aplicação de produtos agroquímicos pode vir a prejudicar o desenvolvimento da bactéria.

Baseado no exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da aplicação via foliar de *Azospirillum brasiliense* sobre a produtividade e qualidade da cana-de-açúcar, bem como encontrar a dose ideal, a fim de reduzir ou mesmo suprir a necessidade de adubação nitrogenada de cobertura em soqueira, e verificar a compatibilidade com agroquímicos usualmente utilizados na cultura.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**

A cana-de-açúcar é uma gramínea semiperene, membro da família Poaceae, que desde o período colonial tem se apresentado como uma cultura de grande importância para a economia brasileira, com receita bruta no ano de 2015 de R\$ 50.296 milhões, fechando em 23% a mais do que no ano de 2014. (CONAB, 2017a).

O Brasil é o maior produtor mundial dessa cultura de grande importância para o agronegócio brasileiro, e considerada uma das grandes alternativas para o setor de biocombustíveis devido ao grande potencial na produção de etanol e aos respectivos subprodutos. Além da produção de etanol e açúcar, as unidades de produção têm buscado operar com maior eficiência, até mesmo com geração de energia elétrica, auxiliando na redução de custos e contribuindo para a sustentabilidade da atividade (CONAB, 2017b).

A produção de açúcar no Brasil foi de aproximadamente 40 milhões de toneladas na safra 17/18, a maior produção das últimas quatro safras, ocupando no mundo o primeiro lugar na produção e na exportação desse produto, seguido da Índia e da União Europeia. Esse aumento na produção de açúcar pode ser justificado pela redução da safra na Índia e à abertura de novos mercados na União Europeia, porém, o mesmo fez com que houvesse redução na produção de etanol hidratado de aproximadamente 2,6% quando comparado à safra anterior (CONAB, 2017b; USDA, 2017).

A área cultivada com cana-de-açúcar até dezembro da safra 2017/18 foi de aproximadamente 10 milhões de hectares, com área colhida de 8,7 milhões de hectares, número 3,4% menor em relação ao ocorrido na safra passada. A produção foi de 636 milhões de toneladas com produtividade média de  $72,7 \text{ t ha}^{-1}$ , e aumento de 2,8 % no açúcar total recuperável - ATR (média de  $138 \text{ t ha}^{-1}$ ) quando comparado com a safra anterior (CONAB, 2017b).

### **2.2 Nutrição em cana-de-açúcar**

As quantidades de nutrientes extraídas do solo pela cana-de-açúcar variam de acordo com os métodos de cultivo, variedade, tipo de solo e disponibilidade de

nutrientes no solo. Na maioria das pesquisas a ordem de extração dos macronutrientes é de K > N > Ca > Mg > S > P (MAEDA, 2009).

Trabalhos realizados por Oliveira et al. (2010) com a alocação de nutrientes na parte aérea da cana-planta apresentaram, em média, valores de 179, 25, 325, 226 e 87 kg ha<sup>-1</sup> de N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O, Ca e Mg, respectivamente, o que proporcionou a seguinte ordem decrescente de extração: K > Ca > N > Mg > P. Valores semelhantes foram encontrados por Franco et al. (2007), em que o acúmulo de nutrientes na parte aérea da variedade SP81-3250 na colheita de cana-planta apresentaram a seguinte ordem decrescente: K > N > Ca > S > Mg > P. Já Coleti et al. (2006), estudando as variedades RB835486 e SP81-3250, encontraram para cana-planta, a seguinte ordem de extração de nutrientes: K > N > S > P > Mg > Ca, e na cana-soca: K > N > P > Mg > S > Ca.

Raij et al. (1996), apresentaram que as faixas de teores foliares adequados de nutrientes para a cana-de-açúcar são: N (18-25 g kg<sup>-1</sup>), P (1,5-3,0 g kg<sup>-1</sup>), K (10-16 g kg<sup>-1</sup>), Ca (2-8 g kg<sup>-1</sup>), Mg (1-3 g kg<sup>-1</sup>) e S (1,5-3,0 g kg<sup>-1</sup>). Enquanto Malavolta (1981), apresenta os níveis críticos para a cana-de-açúcar de: N (16 g kg<sup>-1</sup>), P (1,2 g kg<sup>-1</sup>), K (12 g kg<sup>-1</sup>), Ca (4 g kg<sup>-1</sup>), Mg (2 g kg<sup>-1</sup>) e S (2 g kg<sup>-1</sup>).

Korndörfer (1994) cita que a adubação é uma prática que interfere de diversas maneiras na qualidade da cana-de-açúcar. A adubação nitrogenada está associada a um maior crescimento vegetativo e, portanto, maior umidade na cana, além disso, pode diminuir o teor de sacarose dos colmos.

O N é um dos nutrientes que está diretamente relacionado com o rendimento das culturas, tendo baixa disponibilidade principalmente em solos tropicais e subtropicais. Além do carbono e hidrogênio, o N é o nutriente mais abundante na matéria viva, participando na composição de moléculas de ácido nucleicos, proteínas e polissacarídeos entre outras. Entretanto, apesar de ser requerido pelos seres vivos e encontrado em abundância na natureza, ele se apresenta na forma não assimilada, necessitando, portanto, de uma transformação para uma forma combinada que facilite sua assimilação (FRANCO; DÖBEREINER, 1994). A transformação desse nutriente presente no ambiente em forma assimilável pela planta pode ser realizada por bactérias fixadoras de N.

Resultados de pesquisa em diferentes variedades e classes de solo revelam que a exigência nutricional de N para a produção de uma tonelada de colmo por hectare (TCH) variou de 0,92 a 1,80 kg (ORLANDO FILHO et al., 1980; COLETI et al., 2006; TASSO JUNIOR et al., 2007; FRANCO et al., 2008). Essa variação é justificada pela

resposta de cada variedade ao nutriente, segundo pesquisas, a relação percentual entre quantidade exportada e extraída pode variar de 18 a 70% (OLIVEIRA et al., 2010), e só a quantidade exportada pode variar de 16 a 60% de todo o N acumulado na parte aérea (COALE et al., 1993; WOOD et al., 1996; KORNDORFER et al., 1997; GAVA et al., 2001; RAKKIYAPPAN et al., 2007).

Nas socas, as respostas à adubação nitrogenada são mais frequentes, entretanto, são expressivas as diferenças entre as doses aplicadas e a quantidade acumulada pela cultura. No Brasil, são aplicados, em média, 45 kg ha<sup>-1</sup> de N na cana-planta e 80 kg ha<sup>-1</sup> nas socas, ao passo que o acúmulo de N total nas folhas verdes e secas e nos colmos pode chegar a 260 kg ha<sup>-1</sup> na cana-planta (VITTI et al., 2011) e, em média, a 120 kg ha<sup>-1</sup> nas socas (BAPTISTA et al., 2014).

O acúmulo de N em quantidades expressivamente superiores às doses aplicadas nos canaviais brasileiros tem estimulado a investigação sobre o benefício da interação da cana-de-açúcar com bactérias endofíticas fixadoras de N, e quanto à possibilidade de se fornecer parte do N acumulado pela planta por meio da FBN (DOBEREINER, 1961). Estima-se que a contribuição da FBN para a nutrição nitrogenada da cana-de-açúcar no Brasil pode contribuir com pelo menos 40 kg ha<sup>-1</sup> de N (URQUIAGA et al., 2012).

## **2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio**

### **2.3.1 FBN na nutrição de plantas**

Alguns microrganismos são capazes de transformar o N presente na atmosfera em forma assimilável para a planta (amônia – NH<sub>3</sub>), sendo essa transformação denominada de FBN. A interação entre plantas e microrganismos fixadores de N, denominada endossimbiose, é determinada em parte pelo genótipo da planta que serve como abrigo, proporcionando ambiente com umidade favorável e proteção contra dessecção, temperatura e estresse luminoso, enquanto a bactéria fornece o N. A planta também disponibiliza compostos de carbono como glicose, frutose e sacarose, que servem como alimento para esses microrganismos (REIS et al., 2000).

Granade et al. (1990) demonstrou que a fertilização nitrogenada pode reduzir a incidência de doenças em trigo e que a concentração de N tem sido requerida para conservar certa quantidade de proteínas nas sementes, mantendo-se a saúde das plantas. Assim, todo o N requerido pela planta deverá vir de fertilizantes, com a ressalva de que

aquelas que, vivem em simbiose com bactérias fixadoras de N, podem utilizá-los em menor quantidade.

Estima-se que a contribuição de N fixado biologicamente na cultura da soja seja de 139 a 170 milhões de toneladas por ano, enquanto que a fixação química contribui com apenas 49 milhões de toneladas por ano (PEOPLES; CRASWELL, 1992), de modo que a substituição de fertilizantes minerais pela inoculação com bactérias que fazem FBN como as do gênero *Bradyrhizobium* sp., 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.

As bactérias fixadoras de N podem ter sua eficiência comprometida quando em contato com agroquímicos que podem reduzir a capacidade de suporte do crescimento e pode estar associada à menor eficiência de utilização dos recursos presentes no meio pela bactéria. Em condições de estresse, parte da energia disponível ao organismo é despendida para manter mecanismos celulares e bioquímicos de tolerância ao estressor, em detrimento do crescimento, reduzindo o coeficiente de rendimento microbiano (SCHIMEL et al., 2007).

Entretanto, Santos et al. (2005) observaram incrementos na taxa respiratória por unidade de biomassa microbiana em resposta à adição de agroquímicos ao solo, sendo essa taxa diretamente proporcional às doses aplicadas.

Assim, percebe-se a necessidade de verificar se produtos aplicados na cultura podem vir a alterar a eficiência da bactéria fixadora de N aplicada na planta. Por essa razão, as empresas que produzem produtos biológicos devem fornecer informações de compatibilidade de seus produtos com a maioria dos agroquímicos utilizados (MEDEIROS, 2011).

### **2.3.2 FBN na cultura da cana-de-açúcar**

Há muitas evidências de que a cana-de-açúcar seja beneficiada pela interação com bactérias diazotróficas (BODDEY et al., 2001). Döbereiner (1961) sugeriu que as altas produtividades alcançadas, com baixo uso de fertilizantes nitrogenados poderiam ser explicadas por contribuições da associação das plantas com organismos que fazem FBN. Posteriormente muitas espécies destes organismos foram isoladas da rizosfera da cana-de-açúcar e detectadas dentro de tecidos vegetais (JAMES, 2000; PERIN et al., 2006; THAWEENUT et al., 2011; FISCHER et al., 2012; CASTRO-GONZALEZ et al., 2012).

As formas pelas quais a associação pode beneficiar o desenvolvimento e a produtividade das plantas são: FBN (URQUIAGA et al., 1992); produção de hormônios promotores de crescimento, como o ácido indolacético (AIA) (SUMAN et al., 2001); solubilização de fosfatos, (SINGH et al., 2007; SHUKLA et al., 2008); aumento no teor de C orgânico do solo; e aumento de N e retenção de nutrientes essenciais na rizosfera (YADAV et al., 2009).

Diversos estudos foram conduzidos para confirmação do potencial natural das bactérias diazotróficas em fixar o N da atmosfera na cultura da cana (YONEYAMA et al., 1997; BODDEY et al., 2001; URQUIAGA et al., 2012). Nessas avaliações, foram constatados valores da contribuição relativa da FBN entre zero e 70% do N acumulado. As principais razões apontadas para essa grande variabilidade foram diferenças varietais, visto que a eficiência da FBN é dependente do genótipo da planta (URQUIAGA et al., 1992 e BODDEY et al., 2001), de condições edafoclimáticas e diferenças nas metodologias de avaliação (UNKOVICH et al., 2008).

Döbereiner; Duque (1980) demonstraram em suas pesquisas que em solos fertilizados com baixa ou nenhuma aplicação de N, as contribuições da FBN observadas poderiam fornecer de 30% a 70% da necessidade de N em cana-de-açúcar.

A inoculação com bactérias diazotróficas também pode aumentar a velocidade de brotação das gemas e emissão de raízes em colmos de cana-de-açúcar utilizados para o plantio, o que também é desejável especialmente considerando o sistema atual de mudas pré-brotadas (LANDELL et al., 2012).

A descoberta da FBN pela cana-de-açúcar abriu caminho para as pesquisas para elaboração de inoculantes à base de bactérias diazotróficas (OLIVEIRA et al., 2003). Segundo Pedraza (2008), além da contribuição da FBN em cana-de-açúcar, a associação com bactérias diazotróficas possivelmente reduza o uso de fertilizantes por beneficiar as plantas de diversas formas, tais como: solubilização de fosfatos e zinco (SARAVANAN et al., 2007; ESTRADA et al., 2013), produção de reguladores de crescimento como auxinas, giberelinas e citocininas (LIN et al., 2012; SANTI et al., 2013).

Entretanto, resultados de ensaios desenvolvidos em diferentes regiões produtoras do Brasil mostraram que apenas em poucos casos o inoculante influencia na FBN, apesar de relatos de aumentos significativos na produção de biomassa aérea e raízes (PEREIRA et al., 2013; GÍRIO et al., 2015), bem como na produtividade de colmos (OLIVEIRA et al., 2006; SCHULTZ et al., 2012; SCHULTZ et al., 2014), atribuídos a

efeitos de promotores de crescimento vegetal (BASHAN et al., 2004; GÍRIO et al., 2015).

Avanços nas técnicas que utilizam a relação isotópica  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  no solo e nos tecidos das plantas desenvolvidas por Unkovich et al. (2008) evidenciam que o processo natural de FBN contribui significativamente para a nutrição nitrogenada da cana-de-açúcar (URQUIAGA et al., 2012). Essas técnicas mostram, ainda, que o isótopo  $^{15}\text{N}$  dilui-se nos tecidos das plantas com a diminuição do N disponível no solo, e que há redução gradual de  $^{15}\text{N}$  nos tecidos das plantas na medida em que o solo é exaurido com as colheitas sucessivas da cana-de-açúcar (URQUIAGA et al., 2012). Segundo Unkovich et al. (2008), a redução da concentração do isótopo  $^{15}\text{N}$  nos tecidos vegetais ocorre devido à FBN, que incorpora o  $\text{N}_2$  atmosférico com 0,3663% de átomos de  $^{15}\text{N}$  (valor padrão da atmosfera), enquanto o N disponível no solo normalmente apresenta concentrações superiores do isótopo.

Um levantamento realizado por Polidoro et al. (2001), verificou que as variedades comerciais de cana-de-açúcar RB72454 e SP80-1842 apresentaram elevado potencial para a FBN nas áreas amostradas, no entanto, o manejo da fertilidade do solo e a nutrição das plantas apresentaram tendência em influenciar na magnitude dessa contribuição.

Apesar de vários trabalhos apresentarem resultados positivos no Brasil, estudos realizados em outros países, como Austrália (BIGGS et al., 2002) e África do Sul (HOEFSLOOT et al., 2005) com o balanço de N, não encontraram nenhuma evidência para a contribuição de FBN nas variedades de cana-de-açúcar testadas sob suas condições.

### 2.3.3 *Azospirillum brasiliense*

Döbereiner (1966) encontrou, na rizosfera da grama batatais (*Paspalum notatum*), uma nova bactéria, isolada e identificada como *Azospirillum brasiliense*. Nos anos seguintes, foram isoladas de cana-de-açúcar e cereais (milho, arroz e sorgo) três novas espécies de *Azospirillum* que não somente colonizavam a rizosfera, mas também apresentavam certas estírpes capazes de infectar a planta, fornecendo o N de forma mais eficiente (BALDANI; DÖBEREINER, 1980).

O *Azospirillum brasiliense* é uma bactéria endofítica causadora de endosimbiose, gram-negativas, com formato de bastonetes e está presente em toda a parte da planta (no

caso da cana-de-açúcar, está presente nas raízes, folhas e colmos) e em todos os tipos de solo.

O uso de *Azospirillum* tem despertado grande interesse por parte de pesquisadores em biologia e fertilidade do solo, uma vez que, quando associadas à rizosfera de plantas podem contribuir para a nutrição nitrogenada destas. Segundo Okon; Vanderleyden (1997), a otimização da possível simbiose entre *Azospirillum* spp e plantas poderá resultar em incrementos de produtividade e em diminuição dos custos de produção, principalmente com a aquisição de adubos nitrogenados.

Segundo esses mesmos autores, baseando-se em dados acumulados durante 22 anos de pesquisa com experimentos de inoculação em campo, de pequenas áreas, descreveram que o gênero *Azospirillum* spp aumentou o rendimento em importantes culturas, como por exemplo, soja, milho e arroz, embora ressaltem que o ganho vai mais além do que o simples fixar biologicamente o N, pois também auxilia na ampliação da superfície de absorção das raízes da planta e, consequentemente, do volume de substrato do solo explorado. Como mecanismo de ação, muitos desses efeitos do *Azospirillum* spp nas plantas possam ser atribuídos à produção, pela bactéria, de substâncias promotoras de crescimento, entre elas auxinas, giberilinas e citocininas, e não somente à fixação biológica de N.

Além de substâncias promotoras de crescimento, *Azospirillum brasiliense* e *Azospirillum lipoferum* produzem o ácido orgânico glucônico que solubilizam fontes de fosfato inorgânico insolúvel (RODRIGUEZ et al., 2004), fazendo com que disponibilize mais P presente no solo para a planta.

No trabalho realizado por Silva et al. (2004) com *Azospirillum brasiliense* inoculado em sementes de cevada e trigo, foi observado efeito nas raízes, quando desenvolvidas em solo pobre em nutrientes, causando alterações na morfologia do sistema radicular e no aumento não apenas do número de radicelas, mas também do diâmetro das raízes laterais e adventícias (primárias e secundárias). Ocorreu também aumento na altura da planta e maior desenvolvimento. Nesse trabalho também foi verificado que o *Azospirillum brasiliense* atuou como indutor de resistência.

Todavia, segundo Cadore (2014), as bactérias do gênero *Azospirillum* são diazotróficas endofíticas facultativas e a aplicação via foliar torna-se uma alternativa de inoculação, que além de evitar possíveis incompatibilidades com determinados tipos de agroquímicos aplicados no momento do plantio podendo proporcionar efeitos prejudiciais, tem a finalidade de melhorar o estabelecimento destas bactérias, já que elas

podem se translocar, penetrar via estômato e colonizar as raízes via xilema. Porém, ainda há poucos relatos do mecanismo de absorção na folha, a forma de conversão de N e qual a eficiência para esse modo de inoculação, a qual depende de alguns fatores, tais como: genética da planta hospedeira, tipo de estirpe, temperatura no momento da aplicação, afinidade dessa bactéria (gram negativa) com os mecanismos fisiológicos da folha e dentre outros.

## REFERÊNCIAS

- BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of cereals with 'Azospirillum' spp. **Soil biology and biochemistry**, Austrália, n. 12, p. 1-18, 1980.
- BAPTISTA, R. B.; MORAIS, R. F.; LEITE, J. M.; SCHULTZ, N.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Variations in the  $^{15}\text{N}$  natural abundance of plant-available N with soil depth: their influence on estimates of contributions of biological N<sub>2</sub> fixation to sugarcane. **Applied Soil Ecology**, [S.I.], v. 73, p. 124-129, 2014.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum* plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, [S.I.], v. 50, p. 521-577, 2004. DOI: 10.1139/w04-035.
- BIGGS, I. M.; STEWART, G. R.; WILSON, J. R.; CRITCHLEY, C.  $^{15}\text{N}$  natural abundance studies in Australian commercial sugarcane. **Plant Soil**, [S.I.], v. 238, p. 21-30, 2002.
- BODDEY, R. M.; POLIDORO, J. C.; RESENDE A. S.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Use of the  $^{15}\text{N}$  natural abundance technique for the quantification of the contribution of N<sub>2</sub> fixation to grasses and cereals. **Australian Journal of Plant Physiology**, Australia, v. 28, p. 889-895, 2001.
- CADORE, R. Associação entre *Azospirillum brasiliense* e adubação nitrogenada em híbridos de milho. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2014.
- CASTRO-GONZÁLEZ, R.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; RAMIREZ-TRUJILLO, A.; ESTRADA-DE-LOS-SANTOS, P. High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. **Plant Soil**, [S.I.], v. 345, p. 155-169, 2012.
- COALE, F. J.; SANCHEZ, C. A.; IZUNO, F. T.; BOTTCHER, A. B. Nutrient accumulation and removal by sugarcane grown on everglades histosols. **Agronomy Journal**, [S.I.], v. 85, p. 310-315, 1993.
- COLETI, J.T.; CASAGRANDE, J.C.; STUPIELLO, J.J.; RIBEIRO, L.D.; OLIVEIRA, G.R. Remoção de macronutrientes pela cana-planta e cana-soca, em Argissolos, variedades RB83486 e SP81-3250. **STAB**, São Paulo, v. 24, p. 32-36, 2006.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Receita bruta mensal dos produtores rurais brasileiros**: Caderno Estatístico da Safra 2014/15. Brasília, [s.n.], v. 8, 2017a.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**: Safra 2017/18. Brasília, [s.n.], v. 4, n. 3, 77 p. Dez./2017b.

DÖBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. **Plant and Soil**, [S.I.], v. 15, p. 211-216, 1961. DOI: 10.1007/BF01400455.

DÖBEREINER, J. ‘*Azobacter papali*’ sp. Uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de paspalum. **Revista de Pesquisa em Agropecuária**, Brasil: EMBRAPA, n. 1, p. 357-365, 1966.

DÖBEREINER, 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.

ESTRADA, G. A.; BALDANI, V. L. D.; OLIVEIRA, D. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 369, p. 115-129, 2013.

FISCHER, D.; PFITZNER, B.; SCHMID, M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; REIS, V. M.; PEREIRA, W.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; HAI, B.; HOFMANN, A.; SCHLOTER, M.; MARTINEZ-ROMERO, E.; BAL-DANI, J. I.; HARTMANN, A. Molecular characterisation of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.) **Planto Soil**, v. 356, p. 83-99, 2012.

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.

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

FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. O.; VITTI, A. C.; OTTO, R.; FARONI, C. E.; SARTORI, R. H.; TRIVELIN, M. O. Acúmulo de nutrientes pela cana-de-açúcar. **STAB**, São Paulo, v. 26, p. 47-51, 2008.

GAVA, J. C.; TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W.; PENATTI, C. P. Crescimento e acúmulo de nitrogênio em cana-de-açúcar cultivada em solo coberto com palha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S.I.], v. 36, p. 1347-1354, 2001.

GÍRIO, L. A. da 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. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S.I.], v. 50, p. 33-43, 2015. DOI: 10.1590/S0100-204X2015000100004.

GRANADE, G. V.; SWEENEY, D. W.; WILLIS, W. G.; EVERSMAYER, M. G.; WHITNEY, D. A.; BONCZKOWSKI, L. C. Increasing yield and reducing disease on wheat with P and K fertilization. Atlanta: **Better Crops**, p. 26-30, 1990.

HOEFSLOOT, G.; TERMORSHUIZEN, A. J.; WATT, D. A.; CRAMER, M. D. Biological nitrogen fixation is not a major contributor to the nitrogen demand of a commercially grown South African sugarcane cultivar. **Plant Soil**, [S.I.], v. 277, p. 85-96, 2005.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, [S.I.], v. 65, p. 197-209, 2000.

KORNDÖRFER, G. H. A importância da adubação na qualidade da cana-de-açúcar: SÁ, M. E. de; BUZZETI, S. (Coordenadores). **Importância da adubação na qualidade dos produtos agrícolas**. São Paulo: Ícone, cap. 7, p. 133-142, 1994.

KORNDÖRFER, G. H.; VALLE, M. R.; MARTINS, M.; TRIVELIN, P. C. O. Avaliação do nitrogênio da uréia pela cana-planta. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, [S.I.], v. 21, p. 223-226, 1997.

LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A.; DINARDO-MIRANDA, L. L.; SCARPARI, M. S.; GARCIA, J. C.; BIDÓIA, M. A. P.; SILVA, D. N.; MENDONÇA, J. R.; KANTHACK, R. A. D.; CAMPOS, M. F.; BRANCALIÃO, S. R.; PETRI, R. H.; MIGUEL, P. E. M. **Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas**. Campinas: Instituto Agronômico, 2012. (Documentos, 109).

LIN, L.; HU, C.; ZHANG, X; CHANG, S.; YANG, L; LI, Y.; AN, Q. Plant growth promoting nitrogen-fixing enterobacteria are in association with sugarcane growing in Guangxi, China. **Microbes and environments**, Tagajo, v. 27, n. 4, p. 391398, 2012.

MAEDA, A. S. **Adubação nitrogenada e potássica em socas de cana-de-açúcar com e sem queima em solos de cerrado**. 2009. 110f. Tese de doutorado (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Engenharia do Campus de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2009.

MALAVOLTA, E. **Manual de química agrícola adubos e adubação**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1981.

MEDEIROS, F. H. V. **Biosolving: Controle biológico de doenças de plantas**. [S.I.], [s.n.], 2011.

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, p. 13-42, 2008.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated '*Azospirillum*' species can stimulate plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Nova York, v. 63, n. 7, p. 366-370, 1997.

OLIVEIRA, A. L. M. de; CANUTO, E. de L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic

bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S.I.], v. 34, p. 59-61, 2003. DOI: 10.1590/S1517-83822003000500020.

OLIVEIRA, A. L. M. de; CANUTO, E. L. de; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, [S.I.], v. 284, p. 23-32, 2006. DOI: 10.1007/s11104-006-0025-0.

OLIVEIRA, E. C. A.; FREIRE, F. J.; OLIVEIRA, R. I.; FREIRE, M. B. G. S.; SIMÕES NETO, D. E.; SILVA, S. A. M. Extração e exportação de nutrientes por variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob irrigação plena. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, p. 1343-1352, 2010.

ORLANDO FILHO, J.; HAAG, H. P.; ZAMBELLO JUNIOR, E. **Crescimento e absorção de macronutrientes pela cana-de-açúcar, variedade CB41-76, em função da idade, em solos do Estado de São Paulo**. São Paulo: IAA, 1980. 128p. (Boletim Técnico PLANALSUCAR, 2).

PEDRAZA, R. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 125, p. 25-35, 2008.

PEOPLES, M. B.; CRASWELL, E. T. Biological nitrogen fixation; investments, expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 141, n. 1, p. 13-39, 1992.

PEREIRA, W.; LEITE, J. M.; HIPÓLITO, G. de S.; SANTOS, C. L. R. dos; REIS, V. M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Revista Ciência Agronômica**, [S.I.], v. 44, p. 363-370, 2013. DOI: 10.1590/S1806-66902013000200020.

PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; CASTRO-GONZÁLEZ, R.; ESTRADA-DE-LOS-SANTOS, P.; CABELLOS-AVELAR, T.; GUEDES, H. V.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.I.], v. 72, p. 3103-3110, 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: Embrapa Agrobiologia, dez. 2001. 8p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 144).

RAIJ, B. Van; CANTARELLA, H. Milho para grão e silagem. In: RAJ, B. Van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLAN, A. M. C. (Ed.). **Boletim técnico 100**. Campinas: Instituto Agronômico, p. 56-59, 1996.

RAKKIYAPPAN, P.; THANGAVELU, S.; BHAGYALAKSHMI, K. V.; RADHAMANI, R. Uptake of nitrogen, phosphorus and potassium by soma promising mid late maturing sugarcane clones. **Sugar Technology**, [S.I.], v. 9, p. 27, 2007.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [S.I.], v. 19, p. 227-47, 2000.

RODRIGUEZ, H; GONZALES, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, [S.I.], v. 91, p. 552-555, 2004.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological fixation in non-legume plants – a review. **Annals of Botany**, Oxford, p. 1-25, 2013.

SANTOS, J. B.; JAKELAITIS, A.; SILVA, A. A.; VIVIAN, R.; COSTA, M. D.; SILVA, A. F. Atividade microbiana do solo após aplicação de herbicida em sistemas de plantio direto e convencional. **Planta Daninha**, [S.I.], v. 23, n. 4, p. 683-691, 2005.

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

SCHIMEL, J. P.; BALSER, T. C.; WALLENSTEIN, M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. **Ecology**, [S.I.], v. 88, n. 6, p. 1386–1394, 2007.

SCHULTZ, N.; MORAIS, R.F. de; SILVA, J.A. da; 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 agronômica de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S.I.], v. 47, p. 261-268, 2012.

SCHULTZ, N.; SILVA, J. A. da; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; OLIVEIRA, R. P.; CHAVES, V. A.; PEREIRA, W.; SILVA, M. F. da; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [S.I.], v. 38, p. 359-371, 2014. DOI: 10.1590/S0100-06832014000200005.

SHUKLA, S. K.; YADAV, R. L.; SUMAN, A.; SINGH, P. N. Improving rhizospheric environment and sugarcane ratoon yield through bioagents amended farm yard manure in udic ustochrept soil. **Soil and Tillage Research**, [S.I.], v. 99, p. 158-168, 2008.

SILVA, A. A. O.; FELIPE, T. A.; BACH, E. E. Ação do *Azospirillum brasiliense* no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV 95033). **ConScientiae Saúde**, São Paulo, v. 3, p. 29-35, 2004.

SINGH, K. P.; SUMAN, A.; SINGH, P. N.; LAL, M. Yield and soil nutrient balance of sugarcane plant- ratoon system with conventional and organic nutrient management in subtropical India. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, [S.I.], v. 79, p .209-219, 2007.

SUMAN, A.; SHASANY, A. K.; SINGH, M.; SHAHI, H. N.; GAUR, A.; KHANUJA, S. P. S. Molecular assessment of diversity among endophytic diazotrophs isolated from subtropical Indian sugarcane. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S.I.], v. 17, p. 39-45, 2001.

TASSO JUNIOR, L. C.; MARQUES, M. O.; CAMILOTTI, F.; SILVA, T. Extração e exportação de macronutrientes em cinco variedades de cana-de-açúcar cultivadas na região centro-norte do Estado de São Paulo. **STAB**, São Paulo, v. 25, p. 38-42, 2007.

THAWEENUT, N.; HACHISUKA, Y.; ANDO, S.; YANAGISAWA, S.; YONEYAMA, T. Two seasons study on nifH gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids): expression of nifH genes similar to those of rhizobia. **Plant Soil**, [S.I.], v. 338, p. 435-449, 2011.

UNKOVICH, M.; HERRIDGE, D.; PEOPLES, M.; CADISCH, G.; BODDEY, R.; GILLER, K.; ALVES, B.; CHALK, P. **Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural, 2008. 258p. (ACIAR monograph, 136).

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

URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F.; BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; SÁ, J. M.; BARBOSA, K.P.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and <sup>15</sup>N natural abundance data for the contribution of biological N<sub>2</sub> fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant Soil**, [S.I.], v. 356, p. 5-21, 2012.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. **Sugar: World Markets and trade**. Foreign Agricultural Service, Nov/2017. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/sugar.pdf>>. Acesso em: 19 jan. 2018.

VITTI, A. C.; FRANCO, H .C. J.; TRIVELIN, P. C. O.; FERREIRA, D. A.; OTTO, R.; FORTES, C.; FARONI, C. E. Nitrogênio proveniente da adubação nitrogenada e de resíduos culturais na nutrição da cana-planta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S.I.], v. 46, p. 287-293, 2011.

WOOD, A. W.; MUCHOW, R. C.; ROBERTSON, M. J. Growth of sugarcane under higt input conditions in tropical Australia, III. Accumulation, pastitioning and use of nitrogen. **Field Crops Research**, [S.I.], v. 48, p. 233, 1996.

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

YONEYAMA, T.; MURAOKA, T; KIM, T. H.; DACANAY, E. V.; NAKANISHI, Y. The natural <sup>15</sup>N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako, Japan. **Plant and Soil**, [S.I.], v. 189, p. 239-244, 1997. DOI: 10.1023/A:1004288008199.

## CAPÍTULO 1 – Compatibilidade biológica de *Azospirillum brasiliense* com agroquímicos utilizados no manejo fitossanitário em cana-de-açúcar

### RESUMO

LINO, ANA CAROLINA MAROSTICA. **Compatibilidade biológica de *Azospirillum brasiliense* com agroquímicos utilizados no manejo fitossanitário em cana-de-açúcar.** 2018. 18 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.<sup>1</sup>

A associação entre bactérias diazotróficas e plantas de cana-de-açúcar, em vários trabalhos, mostra que pode se resultar em menor necessidade de aplicações de adubos nitrogenados. Porém, a eficiência da fixação biológica de nitrogênio pode ser afetada por agroquímicos, para isso é necessário que os produtos aplicados sejam seletivos à bactéria. O estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade de *Azospirillum brasiliense* a agroquímicos utilizados no manejo fitossanitário em cana-de-açúcar. O experimento foi montado com placas de Petri em delineamento inteiramente casualizado utilizando seis produtos foliares comerciais (Clorantraniliprole, Thiamethoxam, Lambda-cialotrina + Clorantraniliprole, Etiprole, Fipronil e óleo mineral), cada um em cinco concentrações (não diluído; diluído uma, duas, três e quatro vezes), um padrão (água) e uma testemunha (antibiótico). Foi realizado o isolamento e a multiplicação de *Azospirillum brasiliense* presente em um produto comercial, para realização dos antibiogramas, e confirmado, através de testes bioquímicos, se a colônia de bactéria obtida em laboratório era a desejada. Após a confirmação, as bactérias foram multiplicadas em placas de Petri e ao meio foram colocados papéis circulares de filtro adicionando diluições dos produtos testados. Os produtos testados não influenciaram negativamente o crescimento da colônia da bactéria estudada, em condições controladas - “*in vitro*”, em nenhuma das diluições testadas, com exceção ao ingrediente ativo Lambda-cialotrina + Clorantraniliprole, que na concentração não diluída apresentou inibição. Porém, a aplicação desses produtos em campo é feita somente quando diluída. Sendo assim, os agroquímicos testados apresentaram alta seletividade a *Azospirillum brasiliense*, não inibindo seu crescimento em condições “*in vitro*”.

**Palavras-chave:** antibiograma, *Saccharum officinarum* L., agroquímicos, bactéria fixadora de nitrogênio.

---

<sup>1</sup>Comitê Orientador: Gaspar Henrique Korndörfer – UFU (Orientador) e Hamilton Seron Pereira – UFU (Co-orientador).

## ABSTRACT

LINO, ANA CAROLINA MAROSTICA. **Biological compatibility of *Azospirillum brasiliense* with agrochemicals used in phytosanitary management in sugarcane.** 18 p. 2018. Dissertation (Master in Agronomy) - Federal University of Uberlândia.<sup>2</sup>

Studies show that the association of diazotrophic bacteria with sugarcane plants can result in reduced need for nitrogen fertilization. The efficiency of biological nitrogen fixation can be affected by the use of agrochemicals, for this, it is necessary that the products applied be selective to the bacteria. Therefore, the study aimed to evaluate the sensitivity of *Azospirillum brasiliense* to agrochemicals used in phytosanitary management in sugarcane. The experiment was set using Petri dishes in a completely randomized design with six commercial foliar products (Chlorantraniliprole, Thiamethoxam, Lambda-Cyhalothrin + Chlorantraniliprole, Ethiprole, Fipronil and mineral oil), each in five concentrations (undiluted; diluted once, twice, three and four times), check treatment and control. The isolation and multiplication of *Azospirillum brasiliense* of a commercial product was performed for use in the tests. The presence of the bacteria was confirmed by biochemical tests. After confirmation, the bacteria were multiplied and the dilutions of the tested products were added with circular filter paper on the Petri dishes. The tested products did not negatively influence the colony growth of the studied bacteria, in controlled conditions - "in vitro", in none of the tested dilutions except the non diluted Lambda-Cyhalothrin + Chlorantraniliprole treatment which presented inhibition. However, the application of these products in the field is only done if diluted. Therefore, the tested agrochemicals presented high selectivity to *Azospirillum brasiliense*, not inhibiting their "in vitro" growth.

**Keywords:** antibiogram, *Saccharum officinarum* L., agrochemicals, nitrogen-fixing bacteria.

---

<sup>2</sup>Supervising Committee: Gaspar Henrique Korndörfer – UFU (Supervisor) and Hamilton Seron Pereira (Co-supervisor).

## **1 INTRODUÇÃO**

A presença de pragas e doenças na cultura da cana-de-açúcar pode causar baixa produtividade de colmos e açúcar, menor longevidade do canavial e, até mesmo, queda na qualidade industrial da matéria-prima. No controle de pragas utiliza-se manejos com produtos biológicos e químicos.

A aplicação de agroquímicos sobre culturas que realizam simbiose com bactérias fixadoras de N atmosférico pode prejudicar a eficiência na assimilação desse nutriente (MARENCO et al., 1993; NOVO et al., 1996; SANTOS et al., 2005), podendo causar danos específicos em células bacterianas, como alterações no DNA, inibição na produção de proteínas, danos oxidativos e destruição de membranas (PHAM et al., 2004).

Em soqueira de cana-de-açúcar são realizadas com frequência aplicações de inseticidas e, nessa mesma época, podem ocorrer aplicações foliares de fertilizantes e até mesmo de soluções contendo bactérias fixadoras de N como opção para incremento na nutrição das plantas. No entanto, não se sabe se há perdas na eficiência da inoculação, via foliar, como por exemplo, com bactérias como *Azospirillum brasiliense*, seguida de agroquímicos, devido a essas bactérias poderem ser afetadas pelo produto químico. Atualmente, não existem trabalhos demonstrando a sensibilidade dessas bactérias a produtos usualmente utilizados no controle de pragas na cultura da cana-de-açúcar. Essa sensibilidade das bactérias a certos produtos, como antibióticos ou outros, pode ser medida através de bioensaios conduzidos “*in vitro*”, também conhecidos como antibiogramas.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar a sensibilidade da bactéria *Azospirillum brasiliense* a agroquímicos utilizados na cultura da cana-de-açúcar.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Produtos utilizados**

Os testes de compatibilidade, também conhecidos como antibiogramas, foram realizados no Laboratório de Bacteriologia Vegetal (LABAC) da Universidade Federal de Uberlândia no período de dezembro/2016 a janeiro/2017.

No antibiograma foi utilizado um inoculante líquido comercial para obtenção do *Azospirillum brasilense* e seis agroquímicos registrados para a cultura de cana-de-açúcar, além de um antibiótico para controle da proliferação da bactéria. Os produtos foram:

- Inoculante: solução líquida da bactéria *Azospirillum brasilense* (Cepas AbV5 e AbV6 – UFPR) em concentração mínima informada de  $2 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Nome comercial: Masterfix® L gramíneas.
- Clorantraniliprole: Inseticida de contato e ingestão, recomendado para o controle de broca da cana (*Diatraea saccharalis*). Nome comercial: Altacor®. Tipo de formulação: Granulado dispersível em água (WG). Dose recomendada: 60 g ha<sup>-1</sup> em 200 L ha<sup>-1</sup> de calda.
- Thiamethoxam: Inseticida sistêmico, recomendado para o controle de cigarrinha (*Mahanarva fimbriolata*). Nome comercial: Actara 250. Tipo de formulação: WG. Dose recomendada: 1 kg ha<sup>-1</sup> em 200 L ha<sup>-1</sup> de calda.
- Lambda-cialotrina + Clorantraniliprole: Inseticida de contato e ingestão, recomendado para o controle de broca da cana (*Diatraea saccharalis*). Nome comercial: Ampligo. Tipo de formulação: Suspensão concentrada (SC). Dose recomendada: 100 mL ha<sup>-1</sup> em 200 L ha<sup>-1</sup> de calda.
- Etiprole: Inseticida de contato do grupo Fenilpirazol, recomendado para o controle de cigarrinha (*Mahanarva fimbriolata*). Nome comercial: Curbix 200. Tipo de formulação: SC. Dose recomendada: 2,5 L ha<sup>-1</sup> em 200 L ha<sup>-1</sup> de calda.
- Fipronil: Inseticida de contato e ingestão do grupo Pirazol, recomendado para controle de broca da cana (*Diatraea saccharalis*). Nome comercial: Regente 800. Tipo de formulação: WG. Dose recomendada: 40 g ha<sup>-1</sup> em 200 L ha<sup>-1</sup> de calda.

- Óleo mineral: Adjuvante do grupo químico dos hidrocarbonetos alifáticos. Nome comercial: Nimbus. Tipo de formulação: Concentrado emulsionável (SC). Dose recomendada: 1 L ha<sup>-1</sup> em 200 L ha<sup>-1</sup> de calda.
- Clorafenicol: Antibiótico utilizado para controlar a proliferação da bactéria *Azospirillum*, segundo Lopez-Reyes et al. (1989). Dose recomendada: 0,0013g mL<sup>-1</sup>

## 2.2 Multiplicação da bactéria

Na multiplicação da bactéria foram realizadas diluições seriadas em placas de Petri com meio de cultura sólido LB (Luria-Bertani) e com o uso de alça de Drigalsky. A diluição foi feita a partir de 1 mL obtido do inoculante contendo suspensão bacteriana e realizada em até sete vezes coletando uma alíquota de 100 µL da amostra com bactéria para 900 µL de água contida em tubos eppendorf, conforme descrito na Figura 1.

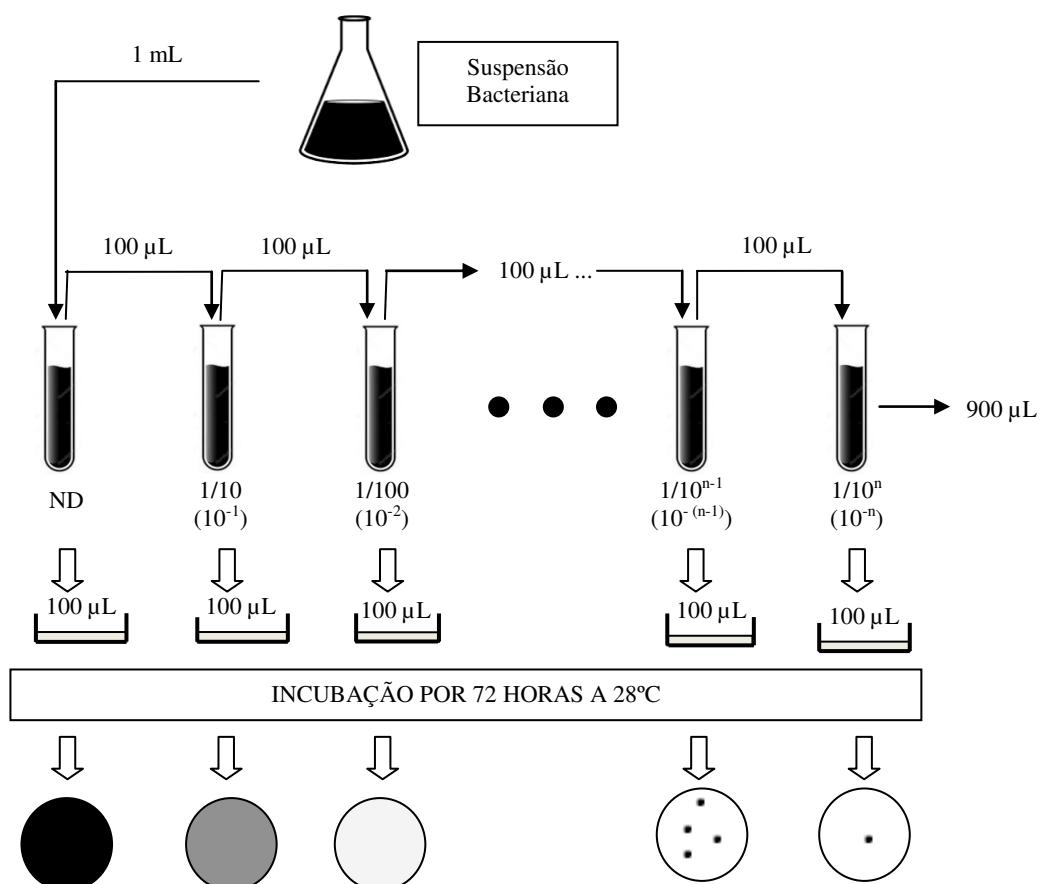


Figura 1. Procedimento para execução da técnica de multiplicação por diluições seriadas em placas e contagem de colônias de bactérias. Adaptado de Romeiro (2001). (ND significa concentração não diluída).

Após as diluições, foi realizado o plaqueamento da diluição  $10^{-1}$  com três repetições para posterior contagem de colônias e a confirmação da bactéria por meio de testes bioquímicos. Algumas das placas foram incubadas em estufa a 33°C e outras em estufa a 28°C, porém somente as placas incubadas a 28°C apresentaram colônias da bactéria, o que pode significar sensibilidade do *Azospirillum brasiliense* a altas temperaturas.

Os testes bioquímicos para identificar a bactéria foram realizados com base no trabalho de Mehnaz; Lazarovits (2006), no qual utilizaram os testes de Gram, Catalase, Oxidase, Esculina, Hidrólise da Gelatina e Arginina. Para o teste de Gram foi utilizada a solubilidade em KOH, um método para diferenciar bactérias gram-positivas de gram-negativas sem uso de coloração.

### **2.3 Antibiograma**

A metodologia adotada para realizar o antibiograma foi a descrita por Romeiro (2001), avaliando a toxidez direta dos agroquímicos através do halo de inibição do crescimento em meio de cultura.

Foram adicionados 10 mL da suspensão bacteriana ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>), obtida a partir da multiplicação da bactéria, ao meio Nutriente Líquido (NL) para cultivo sob agitação de 150 rpm, a 28°C, por 24 h.

Em placa de Petri foi vertida uma camada básica de meio ágar-água (2%), com a finalidade de garantir a uniformidade, em termos de espessura, da sobrecamada, corrigindo eventuais desníveis e irregularidades existentes no fundo da placa (ROMEIRO, 2001). Em seguida, ao meio de cultura LB semi-sólido em temperatura morna (sem estar muito quente a ponto de prejudicar a viabilidade da bactéria, e nem fria a ponto do meio solidificar) foi adicionando o NL contendo a bactéria cultivada, que então foi vertido sobre a camada básica (Figura 2).

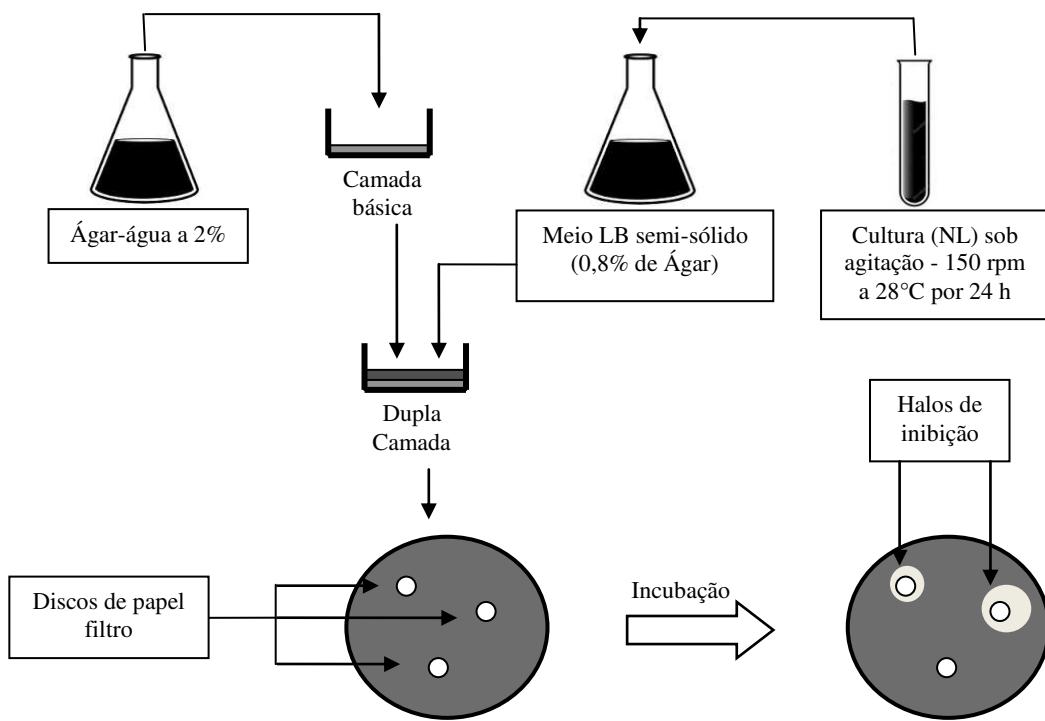


Figura 2. Procedimento para execução de antibiogramas com discos de papel filtro.  
Adaptado de Romeiro (2001).

Nos agroquímicos foram realizadas diluições seriadas em cinco concentrações sendo: não diluído (ND),  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . Para tal, concentrações conhecidas dos produtos sólidos, calculadas com base na sua massa molar correspondente e considerando o volume de calda de  $200\text{L ha}^{-1}$ , foram diluídas em 1mL de água e, para os produtos líquidos, foi utilizado 1mL do produto puro, o que corresponderam às concentrações ND. A partir dessa, por meio de diluições seriadas feitas com 0,1mL da solução contendo o produto e 0,9mL de água alcançou-se as demais concentrações.

Nas placas de Petri foram colocados sobre o meio contendo a bactéria cultivada, cinco discos de papel de filtro estéril (6mm de diâmetro) e, sobre eles, adicionados 10  $\mu\text{L}$  das soluções contendo as diferentes concentrações dos agroquímicos testados (Figura 3A). Após as diluições e as adições dos produtos, as placas foram incubadas em estufa a  $28^\circ\text{C}$ .

O antibiótico (Clorafenicol) não sofreu diluição por tratar-se de um padrão e, tanto para ele quanto para a testemunha (água) os discos foram colocados no centro das placas (Figura 3B).

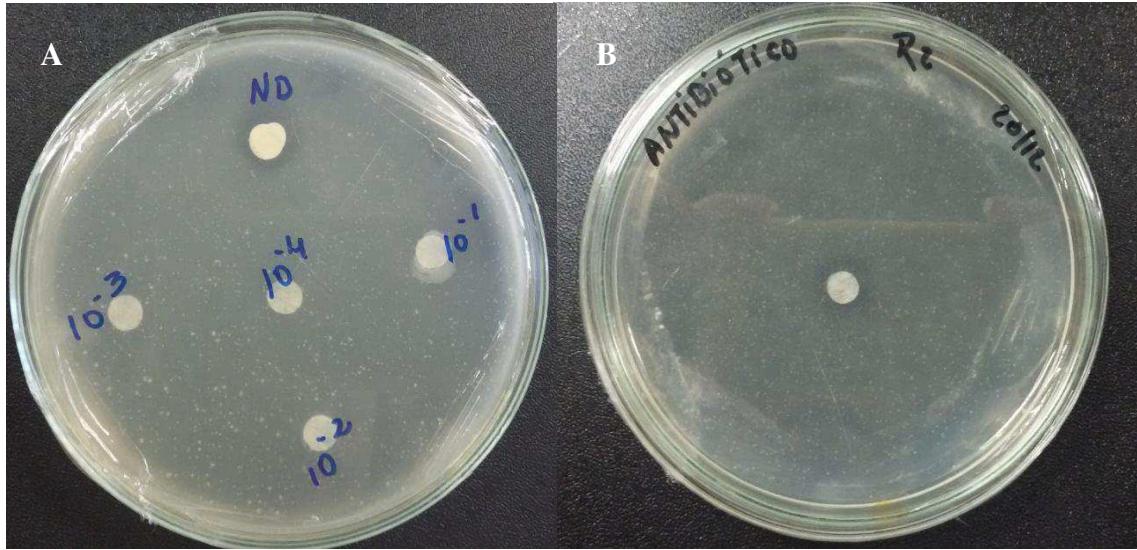


Figura 3. Placa de Petri com a posição dos discos de papel filtro nas diferentes concentrações dos produtos (A) e nas testemunhas (B).

#### 2.4 Delineamento experimental

Para cada produto, o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com sete tratamentos, sendo: cinco concentrações (ND,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ), testemunha somente com água e o padrão com antibiótico, com três repetições. As concentrações  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  representam a dose recomendada da maioria dos produtos, com exceção do Thiamethoxam (dose recomendada estaria entre  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$ ) e Etiprole (diluições de  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$  seriam as equivalentes à recomendação de campo).

Com o auxílio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2008), a comparação entre os tratamentos foi feita mediante testes de médias - Tukey a 0,05 de significância.

#### 2.5 Avaliações

A primeira avaliação foi a de identificação da bactéria, expressa pelo resultado visual de cada um dos testes bioquímicos realizados.

Avaliou-se também o número de colônias da bactéria (Figura 4), por meio de contagem de colônias realizada 72 horas após a incubação.



Figura 4. Colônia de *Azospirillum brasiliense* em placa de Petri com meio LB.

O número de colônias observadas na placa de Petri foi multiplicado pela diluição da solução contendo a bactéria, gerando os resultados de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL conforme apresentado na Equação 1.

$$\text{EQUAÇÃO 1: } \text{UFC} = \text{NC} \times 10^{\text{nd}} \times 10$$

NC = número de colônias;

nd = número de vezes em que a solução contendo a bactéria foi diluída;

10 = fator de transformação da unidade  $\mu\text{L}$  para mL.

Por fim, foram avaliados os halos de inibição por meio de medição do diâmetro médio, com auxílio de uma régua, e não houve crescimento bacteriano após 48 horas de incubação. O não crescimento da bactéria é facilmente identificado pela mudança de cor, saindo de uma coloração turva para uma transparente. A não turbidez no meio demonstra que não houve proliferação da bactéria.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Multiplicação da bactéria

Confirmou-se através dos resultados visuais dos testes de Gram (Figura 5A), Catalase (Figura 5B), Oxidase (Figura 5C), Esculina (Figura 5D), Hidrólise da Gelatina (Figura 5E) e Arginina (Figura 5F) a presença da bactéria *Azospirillum brasiliense* no produto comercial utilizado.

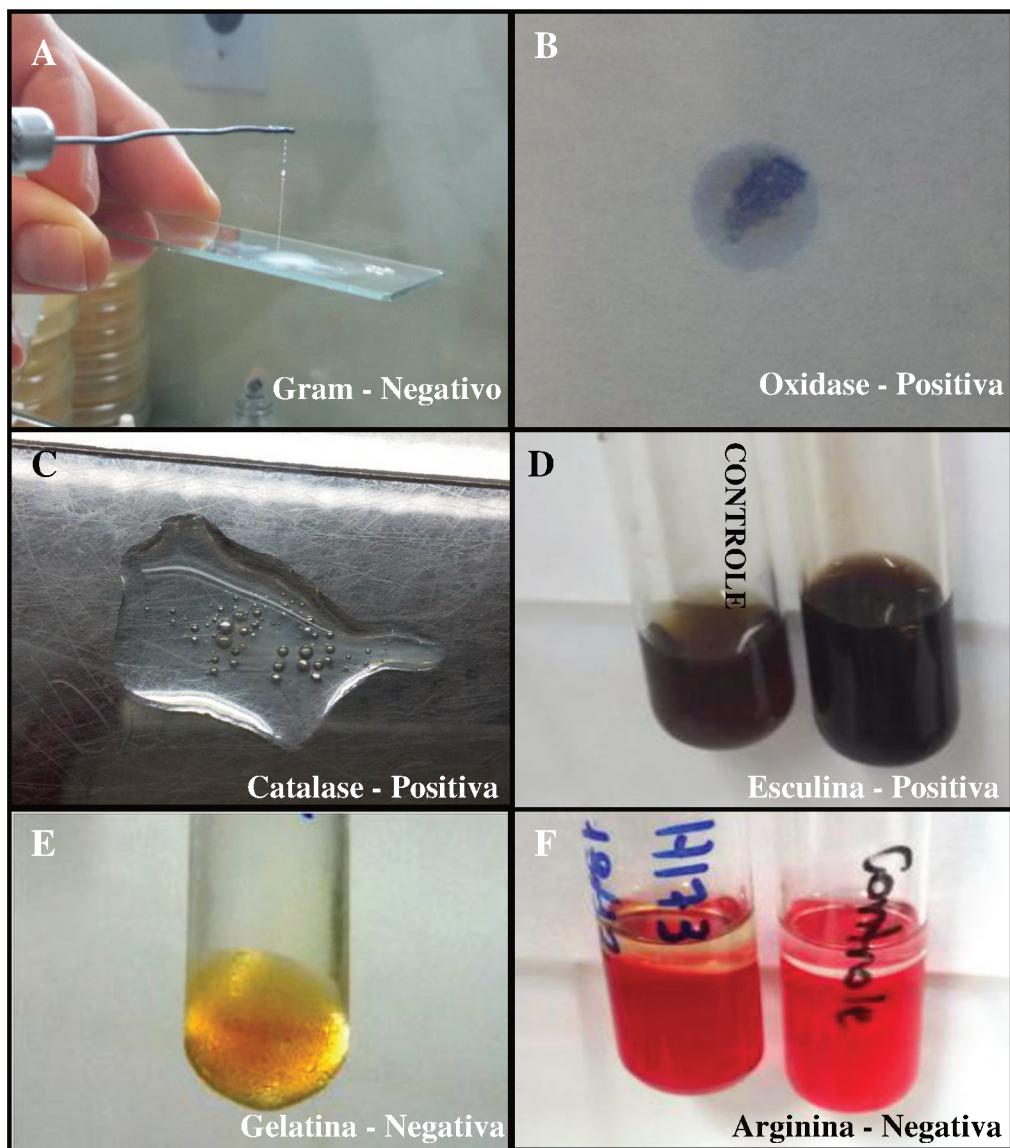


Figura 5. Resultado visual de testes biológicos de Gram (A), Oxidase (B), Catalase (C), Esculina (D), Hidrólise da Gelatina (E) e Arginina (F) confirmando que a bactéria multiplicada era *Azospirillum brasiliense*.

O *Azospirillum brasiliense*, segundo o trabalho de Mehnaz; Lazarovits (2006), é uma bactéria gram-negativa, ou seja, possui camada de lipopolissacarídeo na parede celular que facilmente é dissolvido em KOH 3%, o que torna o meio viscoso (Figura 5A).

As bactérias podem produzir a enzima oxidase, que na presença de oxigênio, forma um composto de tonalidade arroxeadas em um curto intervalo de tempo (Figura 5B) quando utilizado Tetrametil Parafenilenodiamino Dihidrocloreto a 1%. O *Azospirillum brasiliense* é uma bactéria que produz a enzima oxidase sendo um importante diferencial entre bactérias gram-negativas.

Algumas bactérias são capazes também de produzir a enzima catalase, como é o caso do *Azospirillum brasiliense*, que na presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), libera oxigênio, sendo verificado com a presença de bolhas (catalase positiva) (Figura 5C).

O teste de Hidrólise da Gelatina determina a habilidade da bactéria em produzir enzimas proteolíticas (gelatinase) que liquefazem a gelatina. Nesse caso, a bactéria em estudo não produz a enzima, fazendo com que o meio se mantenha solidificado (Figura 5E).

A Arginina é utilizada para verificar se a bactéria é capaz de produzir amônia, na ausência de oxigênio, tornando o meio alcalino. Se houver crescimento bacteriano no teste, haverá reação alcalina e mudança na coloração do indicador vermelho de fenol para rosa-escuro, o que não ocorre para o *Azospirillum brasiliense* (Figura 5F).

A hidrólise da Esculina gera glicose e esculetina, que reagem com íons férricos do meio resultando em um complexo de coloração preta, sendo essa uma reação característica de *Azospirillum brasiliense* (Figura 5D).

### 3.2 Contagem da bactéria

O número de colônias da bactéria encontrado na contagem foi de 146 em solução diluída uma vez, resultando em  $1,46 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> de *Azospirillum brasiliense*, valor abaixo do informado pelo produto de  $2 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (Figura 6).



Figura 6. Resultado da diluição de  $10^{-1}$  em meio LB e contagem de colônias de *Azospirillum brasilense* por milímetro.

O valor baixo da UFC mL<sup>-1</sup> encontrado no processo de multiplicação, pode ser devido ao meio de cultura utilizado não ter sido o mais adequado para o seu desenvolvimento. Existem outros meios de cultura utilizados para isolamento de *Azospirillum brasilense* como o NFb (Figura 7A), BMS (Meio Basal com Sacarose) (Figura 7B) e BDA (Batata Dextrose Ágar) (Figura 7C) (DÖBEREINER et al., 1999; BALDANI et al., 2014), que poderiam apresentar valores diferentes do encontrado.

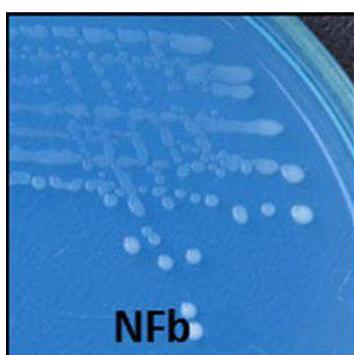


Figura 7A



Figura 7B



Figura 7C

Figura 7. Meios de cultura NFb (7A), BMS (7B) e BDA (7C) de isolamento de *Azospirillum brasilense* (BALDANI et al., 2014).

Outros fatores que podem ter feito com que o produto não apresentasse o valor mínimo informado seria devido a problemas com armazenamento, transporte e outras condições que possam ter gerado mortalidade da bactéria quando em produção.

### 3.3 Antibiograma

Os resultados do antibiograma demonstraram que não houve inibição do crescimento de *Azospirillum brasiliense* na presença dos agroquímicos (Tabela 1).

Tabela 1. Diâmetro (mm) do halo de inibição ao crescimento de *Azospirillum brasiliense* na presença de agroquímicos em diferentes diluições.

Ingredientes Ativos	Diluição <sup>(1)</sup>				
	Não diluído	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
----- mm -----					
Clorantraniliprole	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Thiamethoxan	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Lambda-cialotrina+clorantraniliprole	3,7 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Etiprole	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Fipronil	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Adjuvante	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Testemunha	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
Clorafenicol	11,7 b	11,7 b	11,7 b	11,7 b	11,7 b
CV(%)	117,6	14,0	14,0	14,0	14,0
DMS	6,4	0,6	0,6	0,6	0,6

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

Apesar ter formado halo de inibição do crescimento de *Azospirillum brasiliense* pelo ingrediente ativo Lambda-cialotrina+clorantraniprole (Tabela 1), deve-se ressaltar que a dose que comprometeu o crescimento da bactéria foi a não diluída (Figura 8A), ou seja, 100 vezes maior que a dose recomendada para a cultura. Portanto, a sua utilização na dose recomendada não prejudicaria o desenvolvimento do isolado testado.

O único resultado que apresentou inibição do crescimento da bactéria, formando halo de inibição de 11,7 mm de diâmetro médio, foi o do Clorafenicol (Tabela 1), o que já era esperado, pois esse produto é utilizado para assepsia de meios contendo *Azospirillum brasiliense* e outras bactérias. A Figura 8H mostra a formação do halo de inibição do crescimento da bactéria.

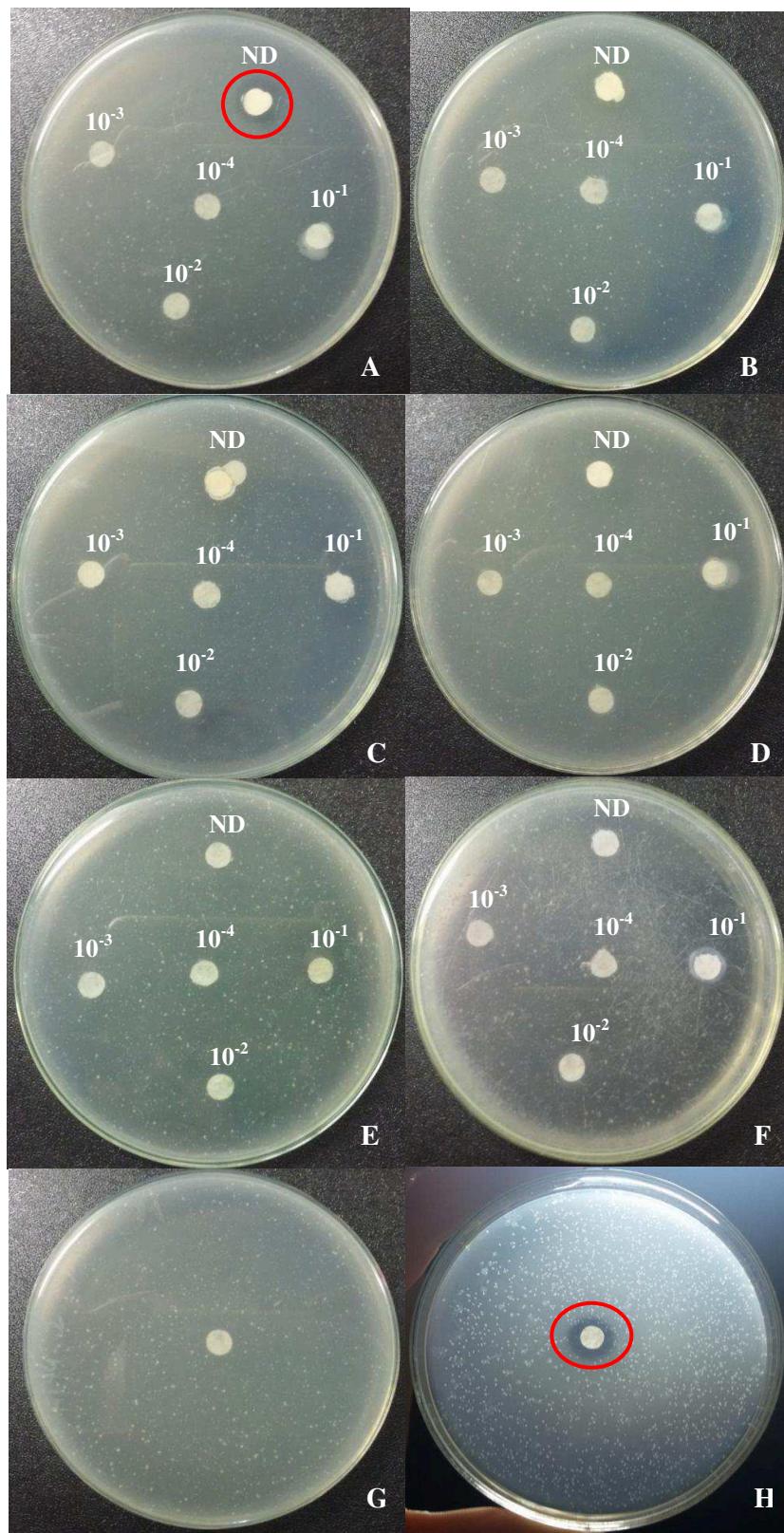


Figura 8. Compatibilidade de *Azospirillum brasiliense* a agroquímicos. A- Lambda-cialotrina + Clorantraniliprole (Ampligo); B- Fipronil (Regente); C- Clorantraniliprole (Altacor); D- Etiprole (Curbix); E- Thiamethoxam (Actara); F- Adjuvante (Nimbus); G- Água; H- Clorafenicol (Antibiótico).

Fernandes et al. (2013), avaliando cinco tipos de inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar, verificaram que os ingredientes ativos imidacloprid, fipronil, thiamethoxam, endosulfan e carbofuran não ocasionam nenhum efeito deletério à FBN “*in vitro*” de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, assim como observado nesse estudo, que além dos ingredientes ativos fipronil e thiamethoxan, os inseticidas clorantraniliprole, lamda-cialotrina+clorantraniliprole e etiprole também não ocasionaram inibição do crescimento de *Azospirillum brasiliense*.

No entanto, esses mesmos autores verificaram incrementos na duração da fase de latência (lag) observados na presença de thiamethoxan e endosulfan, bem como do tempo de geração com o carbofuran, evidenciaram a ocorrência de efeitos inibitórios destes inseticidas sobre o crescimento de *G. diazotrophicus* nas condições testadas.

Efeitos positivos de inseticidas sobre o crescimento microbiano têm sido relatados, como os apresentados por Kanungo et al. (1995), que mostraram que aplicações sequenciadas de carbofuran promoveram incremento na população de *Azospirillum* sp. e *Azotobacter* sp. na rizosfera de plantas de arroz.

Apesar dos dados obtidos nesse ensaio não terem demonstrado efeito negativo na interação de produtos químicos com bactéria, existem outros trabalhos que demonstram que alguns produtos podem inibir o crescimento e desenvolvimento de alguns microrganismos.

Gomez et al. (1998) registraram que a adição do inseticida methidathion em meio de cultura promoveu significativa redução do crescimento e da atividade nitrogenase de *Azospirillum brasiliense*. O inseticida monochrotophos inibiu em 44 e 46% a atividade nitrogenase das bactérias *Rhodobacter spheroids* e *Rhodopsseudomonas palustres*, respectivamente. (CHALAM et al., 1997).

Os dados obtidos no presente trabalho foram decorrentes da utilização dos inseticidas na formulação comercial, ou seja, o ingrediente ativo mais todos os demais ingredientes da formulação, tal qual o mesmo é comercializado e, consequentemente, utilizado na agricultura.

Segundo Malkones (2000), os aditivos presentes na formulação dos agroquímicos podem afetar os microrganismos e, em certos casos, até modificar o efeito do agroquímico. Apesar do adjuvante utilizado nesse estudo não apresentar efeito inibidor em *Azospirillum brasiliense*, Kishinevsky et al. (1988), acredita ser possível que solventes, surfactantes e agentes molhantes presentes nas formulações comerciais

contribuem para os efeitos inibitórios no crescimento de rizóbios, ou de outro grupo de bactérias fixadoras de N.

Cabe ressaltar ainda que a extração de resultados obtidos “*in vitro*” onde se possui grande controle de variáveis envolvidas, para situação “*in vivo*”, precisa ser feita com extrema cautela, visto que comprovar a sensibilidade de uma bactéria à agroquímicos em condições “*in vitro*” por meio de bioensaios específicos não assegura, necessariamente, a repetibilidade do resultado obtido a campo (FRIGO; ROMEIRO, 1988; ROMEIRO, 1984a; ROMEIRO, 1984b; ROMEIRO, 1984c; ROMEIRO, 1984d). Porém, o teste “*in vitro*” mantém a bactéria em exposição máxima ao produto químico, o que não ocorre a campo devido a fatores externos que agem sobre o produto, como por exemplo, radiação solar, deriva e ventos, os quais amenizam a ação do princípio ativo (CAVALCANTI et al., 2002). Sendo assim, espera-se que os produtos testados considerados compatíveis com a bactéria por meio dos resultados encontrados também o sejam quando aplicados em campo.

## **4 CONCLUSÕES**

Os ingredientes ativos Clorantraniliprole, Thiamethoxam, Lambda-cialotrina+ Clorantraniliprole, Etiprole, Fipronil e também o adjuvante aplicados no controle químico de pragas em doses recomendadas para a cultura da cana-de-açúcar, apresentaram seletividade a *Azospirillum brasiliense*, não inibindo seu crescimento em condições “*in vitro*”.

## REFERÊNCIAS

- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant Soil**, [S.I.], p. 413-431, 2014.
- CAVALCANTI, R. S.; MOINO JUNIOR, A.; SOUZA, G. C.; ARNOSTI, A. Efeito dos produtos fitossanitários fenpropatrina, imidacloprid, iprodione e tiametoxam sobre o desenvolvimento do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivos do Instituto Biológico**, [S.I.], v. 69, n. 1, p. 17-22, 2002.
- CHALAM, A. V.; SASIKALA, C.; RAMANA, C. V.; UMA, N. R.; RAO, P. R. Effect of pesticides on the diazotrophic growth and nitrogenase activity of purple nonsulfur bacteria. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [S.I.], v. 58, p. 463- 468, 1997.
- DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V. L. D. **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 1999. 38p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 110).
- FERNANDES, M. F; PROCÓPIO, S. de O.; TELES, D. A.; SENA FILHO, J. G.; CARGNELUTTI FILHO, A.; ANDRADE, C. R. Crescimento e fixação biológica de nitrogênio de *Gluconacetobacter diazotrophicus* na presença de inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. **Revista Ciências Agrárias**, [S.I.], v. 56, n. 1, p. 12-18, jan./mar., 2013.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, [S.I.], v. 6, n. 2, p. 36-41, jul./dez. 2008.
- FRIGO, P. J. G.; ROMEIRO, R. S. Absorção de sulfato de estreptomicina por raízes de pimentão (*Capsicum annuum*). **Fitopatologia Brasileira**, [S.I.], v. 13, p. 129, 1988.
- GOMEZ, F.; SALERON, V.; RODELAS, B.; MARTINEZ-TALED, M. V.; GONZALEZ-LOPEZ, J. Response of *Azospirillum brasiliense* to the pesticides bromopropylate and methidathion on chemically defined media and dialysed-soil media. **Ecotoxicology**, [S.I.], v. 7, p. 43-47, 1998.
- KANUNGO, P. K.; ADHYA, T. K.; RAO, V. R. Influence of repeated application of carbofuran on nitrogenase activity and nitrogen fixing bacteria associated with rhizosphere of tropical rice. **Chemosphere**, [S.I.], v. 31, p. 3249-3257, 1995.
- KISHINEVSKY, B.; LOBEL, R.; LIFSHITZ, N.; GURFEL, D. Effects of some commercial herbicides on rhizobia and their symbiosis with peanuts. **Weed Research**, [S.I.], v. 28, p. 291-296, 1988.

LOPEZ-REYES, L.; SOTO-URZUA, L.; MASCARUA-ESPARZA, M. A.; HERRERA-CAMACHO, I.; CABALLERO-MELLADO, J. Antibiotic resistance and  $\beta$ -lactamase activity in *Azospirillum*. **Soil Biologic Biochem**, México, v. 21, n. 5, p. 651-655, 1989.

MALKONES, H. P. Comparison of the effects of differently formulated herbicides on soil microbial activities- a review. **Journal of Plant Diseases and Protection**, [S.I.], v. 8, p. 781-789, 2000.

MARENCO, R.; LOPES, N. F.; MOSQUIM, P. R. Nodulation and nitrogen fixation in soybeans treated with herbicides. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, [S.I.], v. 5, n. 1, p. 121-126, 1993.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation Effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on Corn Plant Growth Under Greenhouse Conditions. **Springer Science+Busines Media**, Ontario, Canada, v. 51, p. 326-335, 2006.

NOVO, M. C. S. S.; CRUZ, L. S. P.; PEREIRA, J. C. V. N. A.; NAGAI, V.; AMBRÓSIO, L. A. Efeito de linuron e oryzalin no crescimento da planta, na fixação simbiótica do nitrogênio e na produtividade da soja. **Planta Daninha**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 65-81, 1996.

PHAM, C. H.; MIN, J.; GU, M. B. Pesticide induced toxicity and stress response in bacterial cells. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [S.I.], v. 72, p. 380-386, 2004.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV, 2001. 279 p.

ROMEIRO, R. S. Bioanálise para estudo de persistência e absorção de estreptomicina em folhas de maracujá. **Fitopatologia Brasileira**, [S.I.], v. 9, p. 431, 1984a.

ROMEIRO, R. S. Bioeletroforese como método para detecção e quantificação de estreptomicina em tecidos vegetais. **Fitopatologia Brasileira**, [S.I.], v. 9, p. 431, 1984b.

ROMEIRO, R. S. Métodos bioanalíticos para detecção e quantificação de antibióticos em tecidos de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, [S.I.], v. 9, p. 430, 1984c.

ROMEIRO, R. S. Translocação de estreptomicina em folhas de maracujá. **Fitopatologia Brasileira**, [S.I.], v. 9, p. 431, 1984d.

SANTOS, J. B.; FERREIRA, E. A.; KASUYA, M. C. M.; DA SILVA, A. A.; PROCOPIO, S. D. O. Tolerance of *Bradyrhizobium* strains to glyphosate formulations. **Crop Protection**, [S.I.], v. 24, n. 6, p. 543-547, 2005.

## CAPÍTULO 2 – Aplicação foliar de *Azospirillum brasiliense* no desenvolvimento, produção e qualidade da cana-de-açúcar

### RESUMO

LINO, ANA CAROLINA MAROSTICA. **Aplicação foliar de *Azospirillum brasiliense* no desenvolvimento, produção e qualidade da cana-de-açúcar.** 2018. 36 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.<sup>3</sup>

Fixação biológica de nitrogênio com bactéria, como por exemplo, *Azospirillum brasiliense*, em cana-de-açúcar, vem sendo apresentada como alternativa econômica e ambientalmente sustentável pois pode diminuir a necessidade de adubos nitrogenados, sem que haja perdas na produtividade. O objetivo deste trabalho foi verificar a resposta da aplicação de *Azospirillum brasiliense* com e sem adubação nitrogenada em soqueira de cana-de-açúcar. O experimento foi realizado em duas unidades produtoras localizadas em Tupaciguara-MG e Guaíra-SP, em áreas de soqueira das variedades RB855156 e RB966928, respectivamente. O delineamento foi de blocos casualizados, com quatro repetições e oito tratamentos sendo eles aplicações combinadas de 60 kg ha<sup>-1</sup> de N com doses diferentes (0,2, 0,4, 0,6 e 0,8 L ha<sup>-1</sup>) da solução contendo a bactéria, somente doses de N (60 e 120 kg ha<sup>-1</sup>) e da bactéria (0,8 L ha<sup>-1</sup>), e a testemunha sem aplicação de N e da bactéria. Foi avaliada quantidade de perfilhos 60, 90 e 120 dias após a aplicação, concentração de N na folha e extraído pela planta, produção de colmos (TCH) e açúcar (TAH), e análises da qualidade da matéria prima (ATR, Pol, Brix, pureza e fibra). A aplicação da bactéria via foliar em cana-soca, não interferiu na concentração de N foliar, ATR, Brix, Fibra e Pol, nas duas variedades estudadas. A variedade RB966928 foi responsiva à aplicação foliar de *Azospirillum brasiliense* obtendo aumento na produção de colmos e de açúcar em relação à testemunha. A aplicação foliar *Azospirillum brasiliense* em cana-soca apresenta potencial de utilização indicando ser uma alternativa de uso para reduzir o custo com a adubação nitrogenada.

**Palavras-chave:** bactéria fixadora de nitrogênio, *Saccharum officinarum* L., cana-soca, produção de colmos, produção de açúcar.

---

<sup>3</sup>Comitê Orientador: Gaspar Henrique Korndörfer – UFU (Orientador) e Hamilton Seron Pereira – UFU (Co-orientador).

## ABSTRACT

LINO, ANA CAROLINA MAROSTICA. **Foliar application of *Azospirillum brasilense* on sugarcane development, production and quality parameters.** 2018. 36 p. Dissertation (Master in Agronomy) - Federal University of Uberlândia.<sup>4</sup>

Biological nitrogen fixation by bacteria, as *Azospirillum brasilense*, in sugarcane crop, has been presented as an economic and environmental sustainable alternative, as it can reduce the need of nitrogenous fertilizers without yield loss. The objective of this study was to verify the response for spraying *Azospirillum brasilense* with or without nitrogen fertilization in ratoon cane. The experiment was established in two producing units located in Tupaciguara-MG and Guaíra-SP, in ratoon areas of RB855156 and RB966928 varieties, respectively. The experimental design was completely randomized block with eight treatments and four replications with the combined applications of 60 kg ha<sup>-1</sup> N with different doses (0.2, 0.4, 0.6 and 0.8 L ha<sup>-1</sup>) of solution containing the bacteria, only N doses (60 and 120 kg ha<sup>-1</sup>), only bacteria solution dose (0.8 L ha<sup>-1</sup>) and the control without N and the bacteria application. It was evaluated the amount of tillers 60, 90 and 120 days after application, foliar N content and N extracted by the plant, cane and sugar yield and quality parameters as TRS. Foliar bacteria application did not affected foliar N content, TRS, total soluble solids, fiber and sucrose content, in the two varieties studied. The variety RB966928 was responsive to the leaf spraying of the product containing *Azospirillum brasilense* obtaining a significantly increase in the cane and sugar yield in relation to the control. The *Azospirillum brasilense* leaf spraying in sugarcane ratoon presents potential of use, indicating to be an alternative of use to reduce cost of nitrogen fertilization.

**Keywords:** nitrogen-fixing bacteria, *Saccharum officinarum* L., ratoon cane, cane yield, sugar yield.

---

<sup>4</sup>Supervising Committee: Gaspar Henrique Korndörfer – UFU (Supervisor) and Hamilton Seron Pereira (Co-supervisor).

## **1 INTRODUÇÃO**

Um dos principais desafios do setor sucroenergético é conseguir produzir mais cana com o menor custo, uma meta a ser seguida em qualquer contexto agrícola. A inoculação de bactérias fixadoras de N pode ser considerada uma alternativa para contribuir para que o setor consiga atingir esse objetivo, pois estudos demonstram que a FBN pode permitir ganhos de produtividade reduzindo a utilização de insumos de alto custo.

A nutrição adequada da cana-de-açúcar é uma prática comprovadamente reconhecida como sendo uma das principais responsáveis pelos incrementos de produtividade da cultura. Considerando que a adubação mineral é a mais utilizada para o fornecimento de nutrientes e por representar grande parte dos custos de produção, buscar alternativas para as unidades produtoras de açúcar e álcool, visando diminuir esses custos, representa uma grande contribuição dos órgãos de pesquisa (RAMOS, 2013).

Aumentar a eficiência das fontes de N é um desafio e a inoculação com bactérias diazotróficas pode ser uma alternativa eficiente, já que a FBN pode trazer benefícios quanto a melhorias na produtividade, no desenvolvimento da planta e até mesmo na resistência a estresse hídrico. Para isso são necessárias investigações para determinar como estas bactérias irão se desenvolver e realizar a fixação de N com baixa ou sem a necessidade de serem alimentadas com adubos nitrogenados sintéticos. Se bem-sucedido, isso ajudaria o meio ambiente, reduziria o custo de produção e ajudaria os agricultores, principalmente dos países em desenvolvimento, que não podem comprar fertilizantes nitrogenados (COCKING, 2007).

Atualmente existem poucos trabalhos demonstrando a eficiência da FBN por meio da aplicação de bactérias em cana-soca via foliar, portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a resposta da aplicação de *Azospirillum brasiliense* com ou sem adubação nitrogenada em soqueira de cana-de-açúcar.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Caracterização do produto contendo *Azospirillum brasiliense***

Para o estudo da aplicação de *Azospirillum brasiliense* via foliar em soqueira de cana-de-açúcar, foi utilizado o MASTERFIX® L GRAMÍNEAS, um inoculante líquido comercial contendo a bactéria (Cepas AbV5 e AbV6 – UFPR) com concentração mínima informada de  $2 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Produto utilizado nas culturas de arroz, milho e trigo.

### **2.2. Delineamento experimental**

O experimento foi montado em um delineamento experimental de blocos casualizados, com oito tratamentos e quatro repetições (Tabela 1).

Tabela 1. Doses do inoculante e de N utilizadas em cada tratamento.

Tratamentos		
Dose <i>A. brasiliense</i> (L ha <sup>-1</sup> )		Dose de N (kg ha <sup>-1</sup> )
0,0		0
0,0		120
0,0		60
0,2		60
0,4		60
0,6		60
0,8		60
0,8		0

As parcelas experimentais foram compostas por cinco linhas de cana com 10 m de comprimento espaçadas a 1,5 m entre si, totalizando assim 60 m<sup>2</sup> de área por parcela. Entre as parcelas foram adotados espaços nas cabeceiras com dois metros sem cana (Figura 1).



Figura 1A



Figura 1B

Figura 1. Imagem aérea da área experimental (1A) e vista lateral das parcelas (1B)

### 2.3 Instalação

O ensaio foi instalado em áreas de cana-soca em duas unidades produtoras de cana-de-açúcar: Usina Bioenergética Aroeira (Tupaciguara-MG) e na Usina Açucareira Guaíra (Guaíra-SP), nos estágios de 2º (variedade RB855156) e 3º (variedade RB966928) cortes respectivamente. As variedades são bastante utilizadas nessas regiões e apresentam características semelhantes como maturação precoce e boa brotação, mas diferem, por exemplo, quanto ao perfilhamento, recomendação de ambientes de produção e teores de sacarose (ANEXO A) (RIDESA, 2010).

O solo das áreas são classificados como LATOSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico com textura muito argilosa (76% de argila) em Tupaciguara-MG (ANEXO B – Tabela 1B) e LATOSOLO VERMELHO Distroférrico com textura muito argilosa (68% de argila) em Guaíra-SP (ANEXO B – Tabela 2B) (EMBRAPA, 2013). Suas caracterizações químicas e físicas detalhadas estão apresentadas em anexo (Tabela 1B e Tabela 2B, ANEXO B).

A contagem das bactérias diazotróficas presentes nesses solos foi  $5,54 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup> de solo seco na área experimental localizada em Tupaciguara-MG, e  $1,28 \times 10^7$  UFC g<sup>-1</sup> de solo seco em Guaíra-SP (ANEXO C – Tabela 1C).

A aplicação dos tratamentos (Tabela 1) ocorreu no início da estação chuvosa sendo no final de outubro de 2016 em Guaíra-SP e começo de novembro de 2016 em Tupaciguara-MG, aproximadamente 60 dias após a colheita.

A fonte de N utilizada foi o Nitrato de Amônio (33% N), aplicado manualmente em faixa a aproximadamente 25 cm ao lado da linha de cana (Figura 2A). A aplicação

da bactéria foi feita em solução de concentração variável de acordo com os tratamentos (Tabela 1), via foliar, com auxílio de um pulverizador costal de CO<sub>2</sub> com volume de calda de 233L ha<sup>-1</sup> (Figura 2B). A pulverização do inoculante ocorreu nas horas com temperaturas mais amenas do dia (a partir das 18h e 30min na Usina Bioenergética Aroeira, e a partir das 07h e 30min na Usina Açucareira Guaíra, com duração de no máximo duas horas de aplicação), o que foi evidenciado pelo bom molhamento das folhas (Figura 2C).



Figura 2A



Figura 2B



Figura 2C

Figura 2. Aplicação do adubo nitrogenado (2A), da solução contendo a bactéria (2B) e molhamento foliar após a aplicação (2C).

As informações pluviométricas nas áreas, nos meses que ocorreram as instalações dos experimentos, foram de 366 mm na Usina Bioenergética Aroeira (ANEXO D – Tabela 1D) e 55 mm na Usina Açucareira Guaíra (ANEXO D – Tabela 2D).

## 2.4 Avaliações

Aos 60 e 90 dias após a aplicação (DAA) foi realizada a contagem do número de perfilhos. Com 120 DAA, além da contagem de perfilhos, foi realizada também a coleta de folhas com a primeira bainha visível (TVD) (Figura 3) de duas plantas por linha em cada parcela, para que fosse feita a análise do teor de N foliar seguindo a metodologia descrita pela Embrapa (2009).



Figura 3. Característica da bainha da folha TVD coletada para análises de N foliar (GUIMARÃES, 2016).

As colheitas dos experimentos ocorreram em maio de 2017 (181 DAA) na Usina Bioenergética Aroeira (variedade RB855156), e novembro de 2017 (377 DAA) na Usina Açucareira Guaíra (variedade RB966928).

Na colheita da Usina Bioenergética Aroeira foram cortados manualmente três metros lineares de cana, sem falhas maiores que 50 cm, das três linhas centrais, realizando desponte e retirada de excesso de palha (Figura 4A), e as amostras foram pesadas manualmente com o auxílio de um tripé acoplado em uma balança (Figura 4B).

Na Usina Açucareira Guaíra foram cortadas manualmente dez metros lineares de cana das três linhas centrais, sendo feito desponte e retirando o excesso de palhada, e em seguida foi realizada a pesagem com célula de carga acoplada a uma carregadeira (Figura 4C). O peso dos colmos obtido foi extrapolado para toneladas por hectare, resultando na produtividade - TCH (toneladas de colmo por hectare).



Figura 4<sup>a</sup>



Figura 4B



Figura 4C

Figura 4. Amostras de cana cortada manualmente por parcela (4A), e pesagem dos colmos realizada com balança acoplada a um tripé (4B) e com célula de carga em uma carregadeira (4C).

Para a realização das análises de qualidade da matéria prima, foram amostrados, aleatoriamente, 10 colmos dentre os cortados para pesagem e encaminhados ao laboratório da usina (PCTS – Pagamento de Cana por Teor de Sacarose) a qual gerou o resultado de Açúcar Total Recuperável (ATR – kg t<sup>-1</sup>), Sólidos Solúveis Totais (Brix em %), Pureza do Caldo (%), Fibra industrial (%) e Teor de sacarose (Pol do caldo em %). Com os resultados de TCH e de ATR, foram calculados os valores de produção de açúcar por hectare (TAH) de cada tratamento.

Durante a colheita, foram cortadas 10 canas seguidas da linha central de cada tratamento (Figura 5A) para análise de N extraído pela planta. As plantas selecionadas foram trituradas inteiras (com colmos, palmitos e folhas) (Figura 5B), o material obtido foi misturado e uma amostra de 1kg retirada e levada para secar em estufa (Figura 5C). Após a secagem da amostra, foi realizada a pesagem do material seco e a moagem antes de serem levadas ao laboratório para análise de N seguindo a metodologia descrita pela Embrapa (2009).



Figura 5<sup>a</sup>



Figura 5B



Figura 5C

Figura 5. Feixe com 10 canas (5A) antes de serem triturados (5B) sendo posteriormente misturados e coletada uma amostra (5C) para análise do teor de N extraído pela planta.

O valor de N obtido nas análises foi multiplicado ao peso da massa seca calculando assim a quantidade de N extraído por quilograma de massa seca de cada tratamento.

## 2.5 Análises estatísticas

Com o auxílio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2008) as médias foram comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott a 0,10 de significância. As comparações com a testemunha e com a maior dose de N foram realizadas pelo teste de Dunnett a 0,05 de significância e, para as doses (0, 0,2, 0,4, 0,6 e 0,8 L ha<sup>-1</sup> do inoculante), em caso de significância do teste de F, foram feitas regressões, as quais estão representadas por gráficos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Concentração de N foliar

Existem indícios na literatura que mostram que a inoculação com bactérias diazotróficas pode favorecer, em alguns casos, o acúmulo e concentração de nutrientes nas plantas pela fixação biológica de nitrogênio (MUÑOZ-ROJAS; CABALLERO-MELLADO, 2003; SARAVANAN et al., 2007; ESTRADA, 2013; LIN et al., 2012).

A concentração de N na folha de cana-de-açúcar aos 120 dias após a aplicação do inoculante foi semelhante em todos os tratamentos, tanto para a variedade RB855156 quanto para a RB966928, conforme demonstrado na tabela 2.

Tabela 2. Concentração de N na folha de cana-soca das variedades RB855156 e RB966928 aos 120 dias após a aplicação de doses de N combinadas ou não com doses do produto contendo *Azospirillum brasiliense* aplicada via foliar.

Dose <i>A. brasiliense</i> L ha <sup>-1</sup>	Tratamentos Dose de N kg ha <sup>-1</sup>	N foliar <sup>(1)</sup>	
		RB855156 ----- g kg <sup>-1</sup> -----	RB966928
0	60	20,65 a	18,73 a
0,2	60	20,28 a	16,80 a
0,4	60	20,48 a	16,98 a
0,6	60	19,88 a	15,93 a
0,8	60	20,83 a	18,20 a
0,8	0	19,95 a	16,10 a
0	120	20,20 a	16,63 a
0	0	19,78 a	16,28 a
CV (%)		5,90	13,41

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 0,10 de significância.

\*+ Valores diferentes pelo teste de Dunnett a 0,05 de significância.

O teor de N foliar da variedade RB855156 está dentro da faixa ideal considerada por Raij et al. (1996), cujos valores são de 18 a 25 g kg<sup>-1</sup>, no entanto, a variedade RB966928 apresentou níveis críticos de N (próximos a 16 g kg<sup>-1</sup>), segundo Malavolta (1981), com exceções aos tratamentos com apenas 60 kg ha<sup>-1</sup> de N e com 60 kg ha<sup>-1</sup> de N mais 0,8 L ha<sup>-1</sup> do inoculante (Tabela 2).

Ao verificar o comportamento das doses crescentes do inoculante combinado com 60 kg ha<sup>-1</sup> de N mineral, não foi encontrado modelo de regressão para as

variedades RB855156 e RB966928 e, nos dois casos, a dose que apresentou as menores concentrações de N foliar ( $19,9$  e  $15,9 \text{ g kg}^{-1}$  respectivamente) foi a de  $0,6 \text{ L ha}^{-1}$  da bactéria (Figura 6).

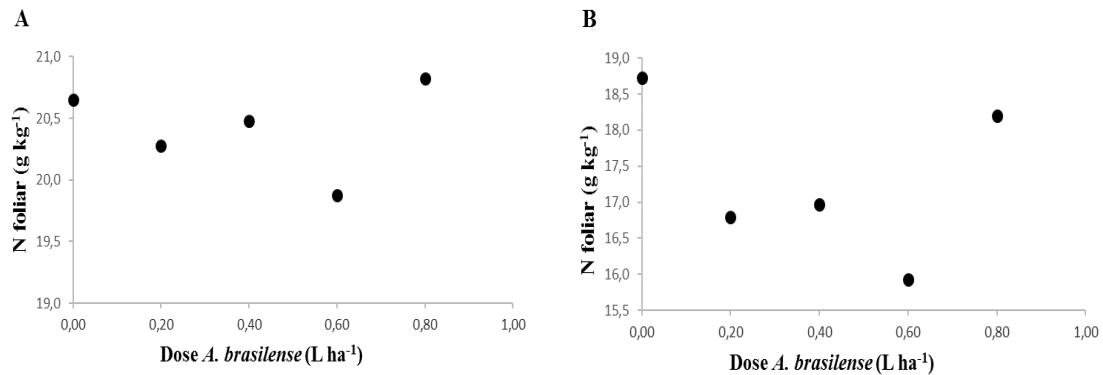


Figura 6. Concentração de N foliar pela planta das variedades de cana-de-açúcar RB855156 (A) e RB966928 (B) após a aplicação de doses do inoculante com *Azospirillum brasiliense* via foliar em soqueira.

No trabalho realizado por Guimarães (2016), no qual foram testados dois tipos de inoculantes contendo bactérias diazotróficas com diferentes formas de aplicação, ao contrário do que obtido no experimento (Tabela 2), verificou-se que *Azospirillum brasiliense* via pulverização foliar, em cana-planta, favoreceu o aumento do teor de N foliar.

Costa (2014), ao estudar o efeito da aplicação de inoculante composto por bactérias diazotróficas, associado a doses de N fertilizante, verificou que a aplicação de inoculante em soqueira implicou em aumento do teor foliar de N com incremento em produção de colmos.

Prado Junior (2008), ao avaliar o comportamento de duas variedades de cana-de-açúcar frente à inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* no sulco de plantio e a aplicação de fontes nitrogenadas, percebeu que os tratamentos estudados não aumentaram o teor de N nas folhas TVD aos 8 meses. Por outro lado, em casa de vegetação Muthukumarasamy et al. (1999) observaram aumento significativo no conteúdo de N nas folhas de cana.

Há controvérsias quanto à técnica da análise foliar para avaliar o estado nutricional da cana-de-açúcar. Nem sempre a análise da folha diagnóstico representa o

potencial de absorção do nutriente ao longo do ciclo da cultura, conforme Orlando Filho et al. (2001).

### 3.2 Quantidade de perfilhos por metro

Para a variedade RB855156 a aplicação do inoculante na dose de 0,2 L ha<sup>-1</sup> reduziu a quantidade de perfilhos aos 60 DAA em relação ao tratamento com 120 kg ha<sup>-1</sup> de N, sem uso de bactéria fixadora de N (Tabela 3). Diferente dos demais períodos de avaliação, aos 90 DAA os tratamentos apresentaram comportamento semelhantes, com média de 18,0 perfilhos por metro (Tabela 3). Aos 120 DAA observa-se que as doses intermediárias do inoculante (0,4 e 0,6 L ha<sup>-1</sup>) combinadas com N (60 kg ha<sup>-1</sup>) obtiveram valores semelhantes aos tratamentos com N (60 e 120 kg ha<sup>-1</sup>), sendo maiores do que a testemunha (Tabela 3).

Tabela 3. Quantidade de perfilhos por metro em cana-soca, variedade RB855156, em função da aplicação de doses de N combinadas ou não com doses do produto contendo *Azospirillum brasiliense* aplicada via foliar.

Tratamentos		Número de perfilhos <sup>(1)</sup>		
Dose <i>A. brasiliense</i> L ha <sup>-1</sup>	Dose de N kg ha <sup>-1</sup>	60 DAA	90 DAA	120 DAA
0,0	60	22,0 a	18,4 a	18,2 a
0,2	60	19,5 a*	16,8 a	16,3 b
0,4	60	22,1 a	18,7 a	18,6 a
0,6	60	22,4 a	18,7 a	17,9 a
0,8	60	22,0 a	17,9 a	17,2 b
0,8	0	20,3 a	16,8 a	16,2 b
0	120	23,9 a*	19,0 a	18,8 a
0	0	21,1 a	17,5 a	17,3 b
C.V. (%)		9,51	7,85	6,41

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 0,10 de significância;

\*+ Valores diferentes pelo teste de Dunnett a 0,05 de significância.

A quantidade de perfilhos na variedade RB966928 (Tabela 4) apresentou valores maiores quando comparado com a RB855156, o que demonstra a característica dessa variedade de alto perfilhamento em cana-soca, bom crescimento e fechamento da entre linhas (ANEXO A).

Para a variedade RB966928, somente aos 60 DAA foram observadas diferenças entre os tratamentos, sendo a testemunha o de menor quantidade de perfilhos por metro (29,4), e inferior aos tratamentos com a aplicação de 0,6 L ha<sup>-1</sup> do inoculante e também aos tratamentos com 60 e 120 kg ha<sup>-1</sup> de N (Tabela 4). Nesse mesmo período, observou que o tratamento com aplicação somente da bactéria apresentou quantidade de perfilhos inferior quando comparado a maior dose de N (120 kg ha<sup>-1</sup>) (Tabela 3). Não houve diferença entre os tratamentos aos 90 e 120 DAA, sendo 26,7 e 26,2 a média de perfilhos por metro, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Quantidade de perfilhos por metro em cana-soca, variedade RB966928, em função da aplicação de doses de N combinadas ou não com doses do produto contendo *Azospirillum brasiliense* aplicada via foliar.

Dose <i>A. brasiliense</i> L ha <sup>-1</sup>	Tratamentos kg ha <sup>-1</sup>	Número de perfilhos <sup>(1)</sup>		
		60 DAA	90 DAA	120 DAA
0,0	60	33,8 a+	27,1 a	24,1 a
0,2	60	31,4 b	27,8 a	27,2 a
0,4	60	33,1 a	26,7 a	24,5 a
0,6	60	34,0 a+	27,3 a	27,1 a
0,8	60	32,9 a	25,9 a	26,6 a
0,8	0	30,3 b*	26,1 a	27,2 a
0	120	34,8 a*	27,4 a	27,4 a
0	0	29,4 b+	25,3 a	25,8 a
C.V. (%)		6,5	6,9	9,8

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 0,10 de significância;

\*+ Valores diferentes pelo teste de Dunnett a 0,05 de significância;

A boa brotação em soqueira característica da variedade RB966928 associada à aplicação de N mineral e à ocorrência de chuva na área (ANEXO D – Figura 2D), pode explicar a diferença na quantidade inicial de perfilhos entre os tratamentos aos 60 DAA (Tabela 4).

O maior vigor das plantas aos 60 DAA pode estar associado, além da FBN, a efeitos promotores de crescimento como produção de fitormônios (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993; SUMAN et al., 2008; BASHAN et al., 2004), solubilização de fosfatos (SINGH et al., 2007; SHUKLA et al., 2008), aumento no teor de C orgânico do solo, aumento da concentração de N e retenção de nutrientes essenciais na rizosfera (YADAV et al., 2009). Esses efeitos podem estar associados ao aumento da eficiência

do sistema radicular em absorver e aproveitar melhor os nutrientes e água em camadas mais profundas do solo, proporcionando às soqueiras maior resistência ao estresse hídrico, principalmente nos primeiros meses após as colheitas.

Segundo Creus et al. (2004), a inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum*, em trigo cultivado em Argissolo na Argentina, aumentou a resistência das plantas ao estresse hídrico.

Como é de conhecimento, o N é o principal responsável pela brotação vegetativa da planta, portanto a maior disponibilidade de N para a planta no início dessa fase faz com que haja maior perfilhamento da soqueira, o que pode ser observado nos dados encontrados nas Tabelas 3 e 4. Esse alto perfilhamento inicial tende a diminuir com o passar do tempo até se estabilizar devido à competição entre as plantas por água, luminosidade e nutrientes, fazendo com que o stand apresente quantidades menores de perfilhos comparado ao início da brotação.

A quantidade de perfilhos por metro com diferentes doses do inoculante e 60 kg ha<sup>-1</sup> N mineral, não se ajustou aos modelos de regressão nos casos estudados (Figura 7). A variedade RB966928 apresentou aos 90 e 120 DAA diminuição, em torno de 20%, no número de perfilhos nos tratamentos sem a aplicação da bactéria e na dose de 0,4 L ha<sup>-1</sup> do produto contendo *Azospirillum brasiliense* (Figura 7B). A redução verificada pode ter ocorrido devido a fatores mecânicos, como por exemplo, pisoteio.

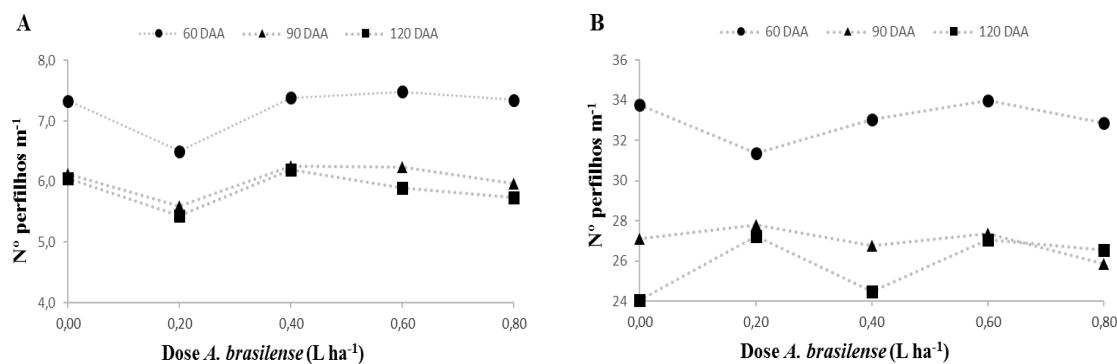


Figura 7. Número de perfilhos por metro aos 60, 90 e 120 DAA em variedades de cana-de-açúcar RB855156 (A) e RB966928 (B), após a aplicação de doses do inoculante com *Azospirillum brasiliense* via foliar em soqueira.

Oliver (2014) ao estudar o efeito da inoculação de bactérias, associado a diferentes doses de N fertilizante, observou que o uso do inoculante, aplicado de forma

injetada e foliar, e os níveis de adubação, não influenciaram significativamente na variável número de perfilhos por metro, no ciclo da cana-soca variedade RB92579. Por outro lado, Prado Jr (2008), ao testar as variedades de cana RB72454 e IACSP936006, inoculadas com bactérias diazotróficas em condições de campo, observou aumento significativo da produção de perfilhos para a variedade RB72454, inoculada com uma concentração de 107 células mL<sup>-1</sup> de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, estirpe BR11281, com pulverização no momento do corte, na linha de cana, sendo favorecida tanto pela presença de N como pela inoculação.

Na Índia, Suman et al. (2005) estudaram o efeito da inoculação de sete estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associadas a três doses de N (0, 75 e 150 kg ha<sup>-1</sup>) na variedade de cana-de-açúcar CoSe 92423, e observaram efeito significativo das estirpes sobre o número de perfilhos. Suman et al. (2013) verificaram que o inoculante composto de cinco espécies de bactérias diazotróficas (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*) associado a doses de N (0, 75 e 150 kg ha<sup>-1</sup>), promoveu incremento na produção de perfilhos e melhorou a eficiência de utilização do N fertilizante em todos os níveis de adubação.

Há ainda trabalhos, como o de Pereira (2011), em que ao avaliar a contribuição da inoculação com bactérias diazotróficas, aplicadas em mistura e individualmente, em seis variedades de cana-de-açúcar, observou que o número de perfilhos não diferiu estatisticamente do tratamento testemunha, sendo que em alguns casos, a aplicação das bactérias promoveu a redução desse parâmetro. Resultado semelhante foi encontrado no experimento com a variedade RB855156 (Tabela 3).

### **3.3 Extração de N pela parte aérea**

A variedade RB855156 não apresentou diferença entre os tratamentos para a quantidade de N extraída na parte aérea (Tabela 5), porém a RB966928 mostrou menor extração de N nos tratamentos com as menores doses do inoculante (0,2 e 0,4 L ha<sup>-1</sup>) em relação àquele com aplicação somente de 120 kg ha<sup>-1</sup> de N (Tabela 5).

Tabela 5. Quantidade de N extraído pela parte aérea da planta de cana-de-açúcar, variedades RB855156 e RB966928, em função da aplicação de doses de N combinadas ou não com doses do produto com *Azospirillum brasiliense* aplicadas via foliar na soqueira.

Tratamentos		N extraído <sup>(1)</sup>	
Dose <i>A. brasiliense</i> L ha <sup>-1</sup>	Dose de N kg ha <sup>-1</sup>	RB855156 ----- g kg <sup>-1</sup> -----	RB966928
0	60	12,6 a	10,1 a
0,2	60	12,1 a	9,0 a*
0,4	60	11,6 a	9,2 a*
0,6	60	11,9 a	9,8 a
0,8	60	11,8 a	9,7 a
0,8	0	12,9 a	9,8 a
0	120	12,1 a	11,2 a*
0	0	12,0 a	10,1 a
CV (%)		5,7	8,9

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 0,10 de significância;

\*+ Valores diferentes pelo teste de Dunnett a 0,05 de significância.

Para variedade de cana RB855156, a combinação de N mineral com doses crescentes do inoculante diminuiu a extração de N pela planta (Figura 8A), sendo a dose de 0,4 L ha<sup>-1</sup> do inoculante, a que apresentou menor quantidade de N em um quilograma de massa seca (11,6 g kg<sup>-1</sup>).

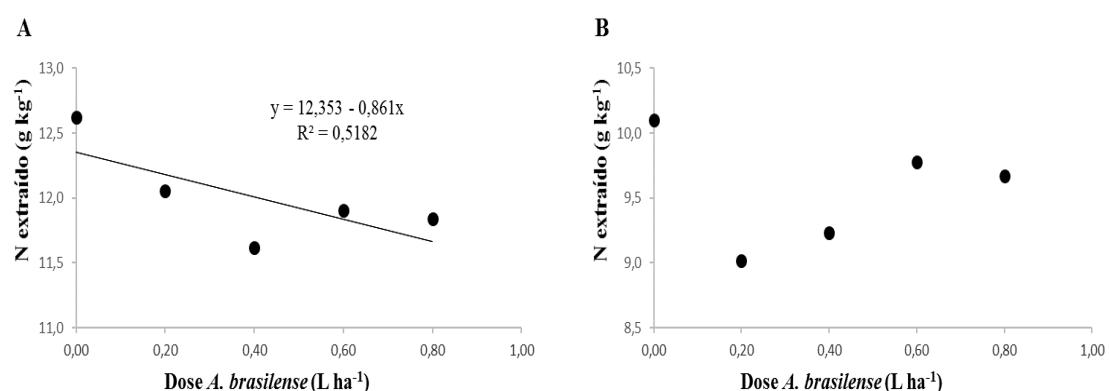


Figura 8. Quantidade de N extraído pela planta das variedades de cana-de-açúcar RB855156 (A) e RB966928 (B) após a aplicação de doses crescentes do inoculante via foliar em soqueira.

A quantidade de N extraída pela variedade de cana RB966928 em resposta à aplicação de doses crescentes do inoculante não se ajustou aos modelos “convencionais” de regressão, mas pela dispersão dos pontos. Pode-se inferir que a dose de 0,6 L ha<sup>-1</sup> apresentou maior valor (9,8 g ka<sup>-1</sup>) de N em um quilograma de massa seca da planta (Figura 8B), porém, foi menor do que o apresentado pela testemunha de 10,1 g kg<sup>-1</sup> (sem aplicação da bactéria).

A extração de N varia de variedade para variedade, o que pode justificar a diferença de resposta obtida no experimento, e ser comprovado pelo trabalho de Oliveira et al. (2010), onde os autores analisaram a extração de nutrientes em 11 variedades de cana, e dentre as testadas, a variedade que obteve a maior extração foi a RB92579 (260 kg ha<sup>-1</sup> de N), enquanto que RB872552 e RB813804 apresentaram os menores resultados (96 e 94 kg ha<sup>-1</sup> de N respectivamente). Porém, neste mesmo trabalho, quando verificada a relação entre extração do N e produção, verificaram que a RB867515 e SP78-4764 (com extração de 1,27 e 1,12 kg de N por tonelada de colmos, respectivamente) foram as variedades que mais exigiram esse nutriente, e a RB872552 e RB813804 (com 0,55 e 0,53 kg de N extraído por tonelada de colmos, respectivamente) foram as variedades com as menores exigências (cerca de 2,4 vezes menos que a RB867515).

Gírio (2014) verificou que a inoculação de bactérias diazotróficas não promoveu incremento no N total extraído da parte aérea na cana-de-açúcar, porém, a adubação nitrogenada promoveu aumento significativo, 10 vezes maior, do N acumulado quando comparado com o tratamento sem N.

A cana-planta pode acumular, na parte aérea, de 180 a 250 kg ha<sup>-1</sup> de N e, em alguns casos, como de cana irrigada, pode variar de 90 a 260 kg ha<sup>-1</sup> de N (ORLANDO FILHO; ZAMBELLO JUNIOR, 1980; OLIVEIRA et al., 2011). A cana acumula entre 100 e 200 kg ha<sup>-1</sup> de N por ano, enquanto pela fertilização nitrogenada geralmente há um acúmulo de 60 e 120 kg ha<sup>-1</sup> de N para cana-planta e cana-soca, respectivamente (OHYAMA et al, 2014).

Estudos realizados por Urquiaga et al. (1992), visando seleção de variedades comerciais de cana-de-açúcar com potencial para FBN, mostraram que a variedade RB72454 teve um acúmulo total de 265 kg N ha<sup>-1</sup>. Esse estudo foi realizado sob condições controladas onde se potencializou o rendimento da cultura e com isso a demanda potencial de N pela planta, e ficou demonstrado que nessa cultura existe uma grande variação de comportamento quanto à eficiência para FBN.

Leal (2011), ao avaliar o efeito da aplicação de um inoculante misto, composto por cinco estirpes de bactérias diazotróficas, associado à adubação nitrogenada no crescimento da cana-de-açúcar variedade RB835089, observou que a adubação nitrogenada, equivalente a  $120 \text{ kg ha}^{-1}$ , apresentou incremento de 45,3% na extração de N total da parte aérea. A aplicação do inoculante na ausência de N ocasionou aumento de 100% do N total extraído, porém, a inoculação associada à adubação nitrogenada não promoveu efeito satisfatório.

Estudos de campo mostraram que as quantidades de N acumuladas na biomassa de cana foram superiores às aplicadas pela adubação nitrogenada, e que a possível explicação para isso é a presença de bactérias fixadoras de N (LIMA et al., 1987; URQUIAGA et al., 1992; BASANTA et al., 2003; FRANCO et al., 2011; URQUIAGA et al., 2012). No entanto, apesar destes resultados positivos no Brasil, estudos realizados em outros países, como Austrália (BIGGS et al., 2002) e África do Sul (HOEFSLOOT et al., 2005) com o balanço de N não encontraram nenhuma evidência para contribuições de FBN nas variedades de cana testadas sob suas condições.

Schultz et al. (2012), ao estudar o efeito da aplicação de um inoculante, compostos por cinco estirpes e da adubação nitrogenada, em duas variedades de cana-de-açúcar, observou que o acúmulo de N total, na variedade RB72454, na cana-planta e segunda soca não foi afetado pelos tratamentos com inoculação e adubação nitrogenada. No entanto, diferença significativa foi observada na segunda soqueira da variedade RB867515, com incremento de 75,2 e 118,8% no N total das plantas, nos tratamentos com inoculação e adubação nitrogenada, equivalente a dose de  $120 \text{ kg ha}^{-1}$  de N, respectivamente.

### **3.4 Produção de colmos e de açúcar**

A produção de colmos e de açúcar da cana-soca, variedade RB855156, não apresentou diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 6). O tratamento com inoculante, sem adubação nitrogenada, mostrou produtividade de  $111 \text{ t ha}^{-1}$  igual a testemunha, então, neste caso, o benefício do inoculante dependeria da presença de N mineral.

Tabela 6. Produção de colmos (TCH) e de açúcar (TAH) da variedade de cana-de-açúcar RB855156, em função da aplicação de doses de N combinadas ou não com doses do inoculante contendo *Azospirillum brasiliense* aplicadas via foliar na soqueira.

Tratamentos		TCH <sup>(1)</sup> t ha <sup>-1</sup>	TAH <sup>(1)</sup> t ha <sup>-1</sup>
Dose <i>A. brasiliense</i> L ha <sup>-1</sup>	Dose de N kg ha <sup>-1</sup>		
0	60	102 a	12,6 a
0,2	60	105 a	12,9 a
0,4	60	125 a	15,2 a
0,6	60	123 a	15,4 a
0,8	60	117 a	13,6 a
0,8	0	111 a	13,4 a
0	120	122 a	15,1 a
0	0	111 a	13,3 a
CV (%)		14	16

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 0,10 de significância;

\*+ Valores diferentes pelo teste de Dunnett a 0,05 de significância.

Apesar de não haver diferença entre os tratamentos, nota-se que quando se compara o tratamento com 60 kg ha<sup>-1</sup> N + 0,6 L ha<sup>-1</sup> do inoculante com a testemunha (sem aplicação) houve um aumento na produção de colmos e açúcar de 12 t ha<sup>-1</sup> e 2,1 t ha<sup>-1</sup> respectivamente, o que em soqueira pode ser considerado um valor representativo. Além disso, essa mesma dosagem resultou em valores próximos da melhor condição recomendada para alta produtividade representada pelo tratamento com dose de 120 kg ha<sup>-1</sup> N, cujos valores de TCH e TAH atingiram 122 e 15,1 t ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 6).

Considerando que houve benefício do inoculante combinado com a adubação mineral na dose de 60 kg ha<sup>-1</sup> (Tabela 6), e que poderia vir a substituir a dose de 120 kg ha<sup>-1</sup> de N recomendada, e que o preço de um inoculante contendo *Azospirillum brasiliense* varia de R\$ 40,00 a R\$ 80,00 por hectare, então essa seria uma alternativa que reduziria o custo com a compra de adubos nitrogenados.

Schultz et al. (2012), em experimento realizado em campo com a variedade de cana-de-açúcar RB867515, realizaram a inoculação com bactérias diazotróficas e verificaram que os tratamentos com inoculação promoveram incrementos de desenvolvimento e produtividade similar à adição de 120 kg ha<sup>-1</sup> de N fertilizante, no

entanto, para a outra variedade estudada (RB72454) não houve resposta à adubação nitrogenada e à inoculação.

Para a variedade RB966928, com exceção ao tratamento com  $60 \text{ kg ha}^{-1}$  N + 0,4 L  $\text{ha}^{-1}$  do inoculante, os demais apresentaram TCH e TAH superiores à testemunha (Tabela 7). O destaque é o tratamento de 60 kg  $\text{ha}^{-1}$  N + 0,6 L  $\text{ha}^{-1}$  do inoculante que apresentou aumento de 22 t  $\text{ha}^{-1}$  de colmos e 2,9 t  $\text{ha}^{-1}$  de açúcar em relação à testemunha, e obteve ainda resultados próximos à melhor condição recomendada para altas produtividades representada pelo tratamento com 120 kg  $\text{ha}^{-1}$  N.

Tabela 7. Produção de colmos (TCH) e de açúcar (TAH) da variedade de cana-de-açúcar RB966928, em função da aplicação de doses de N combinadas ou não com doses do inoculante contendo *Azospirillum brasiliense* aplicadas via foliar na soqueira.

Tratamentos		Dose de N kg $\text{ha}^{-1}$	TCH <sup>(1)</sup> t $\text{ha}^{-1}$	TAH <sup>(1)</sup>
Dose <i>A. brasiliense</i> L $\text{ha}^{-1}$				
0	60		148 a	23,4 a
0,2	60		141 a	22,5 a
0,4	60		129 b	19,2 b
0,6	60		149 a	22,9 a
0,8	60		145 a	22,0 a
0,8	0		147 a	22,6 a
0	120		149 a	21,7 a
0	0		127 b	20,0 b
CV (%)			9	10

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 0,10 de significância;

\*+ Valores diferentes pelo teste de Dunnett a 0,05 de significância.

Apesar dos valores superiores com relação à testemunha, os tratamentos não diferiram entre si, verificando assim que não houve efeito significativo do inoculante na presença do N, pois a dose de 60 kg  $\text{ha}^{-1}$  de N, sem inoculante, produziu igual a todos os tratamentos em questão, ao contrário do que se observou na variedade RB855156, que precisou do N mineral para ter benefício utilizando a solução com *Azospirillum brasiliense* (Tabelas 6 e Tabela 7).

Nesse caso, se fosse aplicado apenas o inoculante com dose de 0,8 L  $\text{ha}^{-1}$ , além de reduzir o custo com a adubação nitrogenada, a produtividade obtida seria a mesma (147 t  $\text{ha}^{-1}$ ) que a dose de 60 kg  $\text{ha}^{-1}$  de N, quando comparado com a testemunha, sem N

e sem inoculante (Tabela 7), com aumento de 20 e 2,6 t ha<sup>-1</sup> na produção de colmos e açúcar respectivamente.

A baixa produtividade do tratamento com dose de 0,4 L ha<sup>-1</sup> do inoculante (129 t ha<sup>-1</sup>) era esperada quando verificada a queda acentuada da quantidade de perfilhos por metro observada aos 90 e 120 DAA (Tabela 4 e Figura 7B). Portanto, nesse caso, não se pode indicar que os valores baixos foram causados por influência ou não do *Azospirillum brasiliense* aplicado via foliar.

Esse aumento na produtividade também foi discutido pelos autores Shankariah; Hunsigi (2001), que informam que a inoculação de *Azospirillum* spp. pode vir a aumentar significativamente a produção de cana-planta e cana-soca em aproximadamente 5 a 9 t ha<sup>-1</sup> respectivamente.

As doses crescentes do inoculante não resultaram em ajuste a um modelo de regressão, mas, observa-se que as variedades responderam de forma diferente à quantidade de *Azospirillum brasiliense* aplicada (Figura 9), o que pode ser justificado pela questão da estabilidade fenotípica de cada planta, já que, segundo o consenso de Reis et al. (2000), o genótipo da planta é o fator chave para obtenção dos benefícios oriundos da fixação biológica do N, aliado à seleção de estirpes eficientes.

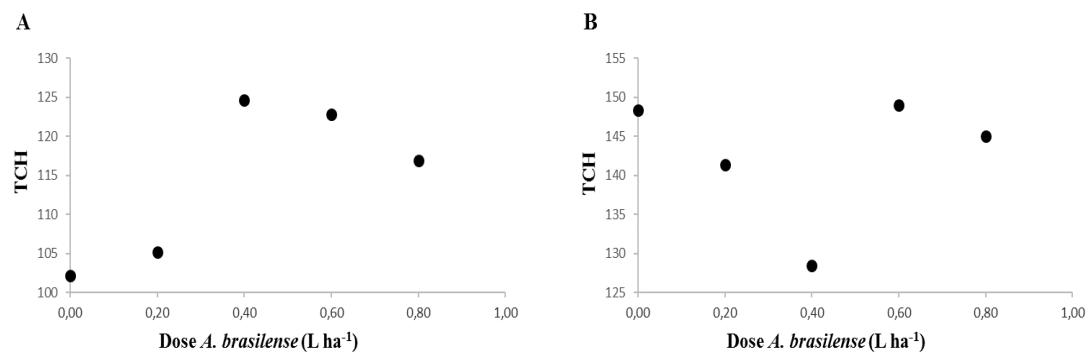


Figura 9. Produção de colmos (TCH) das variedades de cana-de-açúcar RB855156 (A) e RB966928 (B) após a aplicação de doses crescentes do produto contendo *Azospirillum brasiliense* via foliar em soqueira.

Oliveira et al. (2006) avaliaram a produtividade das variedades SP70-1143 e SP81-3250, em três solos diferentes – com elevada, média e baixa fertilidade natural – verificaram que o inoculante promoveu aumento significativo na produtividade de colmos somente no solo de baixa fertilidade. A inoculação proporcionou significativa

contribuição da FBN para a variedade de cana-de-açúcar SP70-1143, em solos de baixa fertilidade, e promoveu produtividades similares às de áreas que receberam fertilizante nitrogenado.

Com os dados obtidos nesse trabalho, pode-se dizer que a inoculação com *Azospirillum brasiliense* com ou sem N, apresentou resultados de produção de colmos e açúcar semelhantes estatisticamente àqueles da maior dose recomendada de N ( $120\text{ kg ha}^{-1}$ ), o que vale para as duas variedades estudadas, principalmente quando se utiliza a combinação de  $0,6\text{ L ha}^{-1}$  do inoculante com  $60\text{ kg ha}^{-1}$  de N (Tabela 6 e Tabela 7).

Resultados semelhantes a esses foram observados em pesquisas realizadas com a cultura do trigo as quais indicam que a inoculação de bactérias diazotróficas não substitui os fertilizantes nitrogenados, porém, promove melhor absorção e utilização do N disponível no solo (SAUBIDET et al., 2002; ROESCH et al., 2005). Neste sentido, Suman et al. (2008) mostraram que variedades de cana, com maior número de bactérias diazotróficas, não somente apresentaram maior potencial de FBN, mas também, quando submetidas à metade da dose recomendada de fertilizante nitrogenado, atingiram níveis de produtividade similares aos de plantas com a dose completa.

### **3.5 Parâmetros de qualidade**

Os valores de ATR obtidos nas duas variedades não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos (Tabela 8), porém, a variedade RB966928 apresentou o menor valor do ATR no tratamento com  $120\text{ kg ha}^{-1}$  de N. Esse fato pode ser justificado quando se verifica o percentual de pureza do tratamento em questão, e nota-se que foi o menor valor comparado aos outros (Tabela 10), inferior aos tratamentos com apenas  $60\text{ kg ha}^{-1}$  de N,  $60\text{ kg ha}^{-1}$  de N +  $0,2\text{ L ha}^{-1}$  do inoculante,  $60\text{ kg ha}^{-1}$  de N +  $0,6\text{ L ha}^{-1}$  do inoculante,  $60\text{ kg ha}^{-1}$  de N +  $0,8\text{ L ha}^{-1}$  do inoculante e testemunha (sem aplicação).

Tabela 8. Açúcar total recuperável (ATR) em cana-soca, variedade RB855156 e RB966928, em função da aplicação de doses de N combinadas ou não com doses do inoculante contendo *Azospirillum brasiliense* aplicadas via foliar.

Tratamentos		ATR <sup>(1)</sup>	
Dose <i>A. brasiliense</i> L ha <sup>-1</sup>	Dose de N kg ha <sup>-1</sup>	RB855156 kg t <sup>-1</sup>	RB966928 kg t <sup>-1</sup>
0	60	122 a	158 a
0,2	60	123 a	160 a
0,4	60	123 a	149 a
0,6	60	125 a	154 a
0,8	60	116 a	152 a
0,8	0	121 a	154 a
0	120	124 a	145 a
0	0	120 a	158 a
CV (%)		6	6

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 0,10 de significância;

\*+ Valores diferentes pelo teste de Dunnett a 0,05 de significância.

Assim como a produtividade, as doses crescentes do inoculante combinadas com 60 kg ha<sup>-1</sup> de N não resultaram em ajuste a um modelo de regressão e as variedades responderam de forma diferente à quantidade de *Azospirillum brasiliense* aplicada (Figura 10). A dose de 0,6 L ha<sup>-1</sup> foi a que apresentou o maior ATR (125 kg t<sup>-1</sup>) para a variedade RB855156, enquanto para RB966928, o maior valor de ATR foi encontrado na dosagem de 0,2 L ha<sup>-1</sup> (160 kg t<sup>-1</sup>).

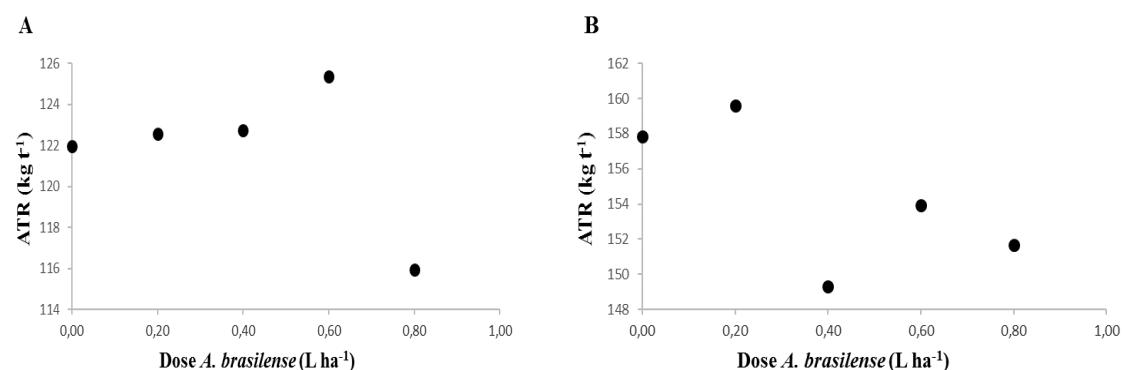


Figura 10. Açúcar total recuperável (ATR) das variedades de cana-de-açúcar RB855156 (A) e RB966928 (B) após a aplicação de doses crescentes do produto contendo *Azospirillum brasiliense* via foliar em soqueira.

O tratamento 60 kg ha<sup>-1</sup> de N + 0,8 L ha<sup>-1</sup> do inoculante, aplicado na variedade RB855156, apesar de apresentar TCH de 117 t ha<sup>-1</sup> maior do que a testemunha (111 t ha<sup>-1</sup>), o valor do ATR foi 4 kg t<sup>-1</sup> menor do que a mesma (Figura 11A).

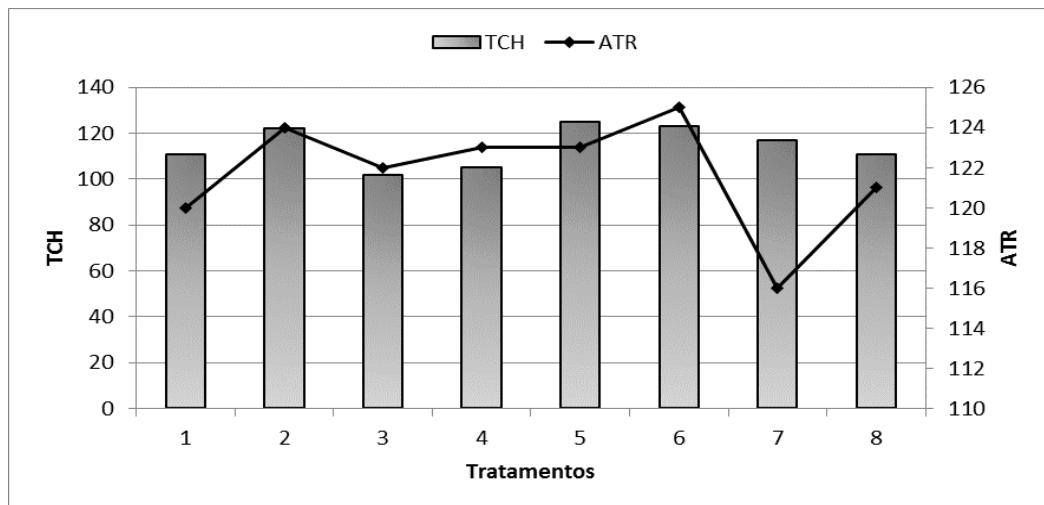


Figura 11A

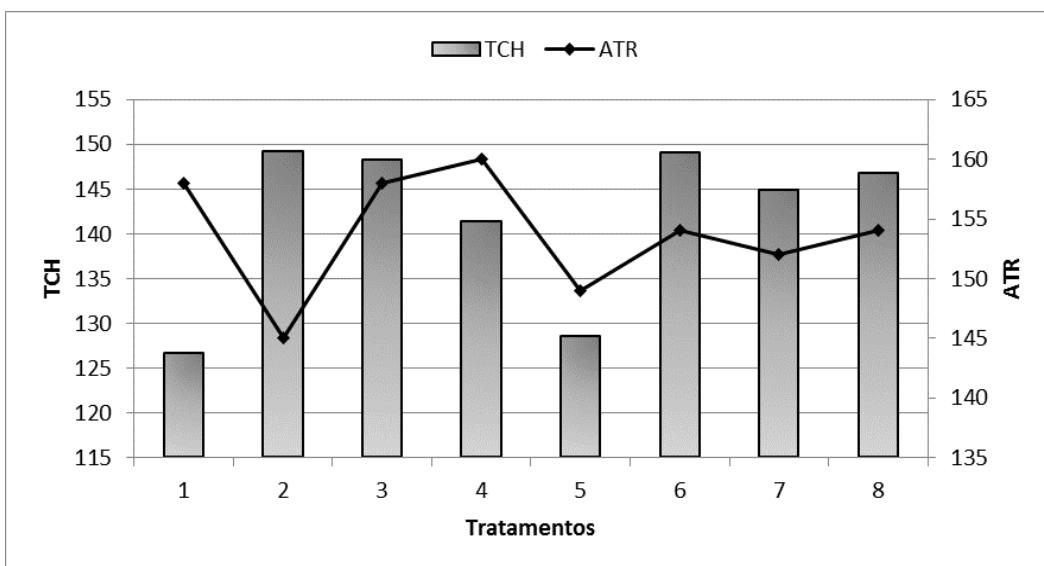


Figura 11B

Figura 11. Produtividade (TCH) e açúcar total recuperável (ATR) das variedades de cana-de-açúcar RB855156 (11A) e RB966928 (11B) em função da aplicação de doses de N mineral combinadas ou não com doses do inoculante contendo *Azospirillum brasiliense* via foliar em soqueira. 1- testemunha; 2- 120 kg ha<sup>-1</sup> de N; 3- 60 kg ha<sup>-1</sup> de N; 4- 60 kg ha<sup>-1</sup> de N + 0,2 L ha<sup>-1</sup> do inoculante; 5- 60 kg ha<sup>-1</sup> de N + 0,4 L ha<sup>-1</sup> do inoculante; 6- 60 kg ha<sup>-1</sup> de N + 0,6 L ha<sup>-1</sup> do inoculante; 7- 60 kg ha<sup>-1</sup> de N + 0,8 L ha<sup>-1</sup> do inoculante; 8- 0,8 L ha<sup>-1</sup> do inoculante.

Apesar do ATR da variedade RB966928 no tratamento com a maior dose de N ter sido inferior ( $145 \text{ kg t}^{-1}$ ) quando comparado aos outros (Tabela 8), esse mesmo tratamento apresentou a maior produção de colmos ( $149 \text{ t ha}^{-1}$ ) junto com o de  $60 \text{ kg ha}^{-1}$  de N +  $0,6 \text{ L ha}^{-1}$  do inoculante (Figura 11B), o que representou um TAH de  $21,7 \text{ t ha}^{-1}$ , diferindo da testemunha ( $20 \text{ t ha}^{-1}$ ). Portanto, o fato do ATR não ser alto, não implica em produção de açúcar inferior à dos demais, como demonstrado nesse caso.

As análises da qualidade da matéria prima da variedade RB855156 demonstraram novamente que os tratamentos não diferiram entre si (Tabela 9), o que reforça a teoria de que a variedade pode possuir genótipo pouco responsável a nutrição com N. Enquanto isso, a variedade RB966928 apresentou diferença entre os tratamentos somente para o percentual de pureza que, conforme mencionado anteriormente, foi menor para o tratamento contendo a maior dose de N mineral (Tabela 10).

Tabela 9. Análises de Brix, Pureza, Fibra e Pol em cana-soca, variedade RB855156, em função da aplicação de doses de N combinadas ou não com doses do inoculante contendo *Azospirillum brasiliense* aplicadas via foliar.

Tratamentos		Análises tecnológicas <sup>(1)</sup>			
Dose de <i>A. brasiliense</i>	Dose de N	Brix	Pureza	Fibra	Pol
L ha <sup>-1</sup>	kg ha <sup>-1</sup>		%		
0,0	60	16,8 a	82,9 a	10,6 a	12,1 a
0,2	60	17,0 a	82,3 a	10,2 a	12,2 a
0,4	60	17,0 a	82,9 a	10,5 a	12,2 a
0,6	60	17,3 a	83,0 a	10,5 a	12,5 a
0,8	60	16,3 a	80,4 a	10,2 a	11,4 a
0,8	0	16,5 a	83,4 a	10,4 a	12,0 a
0	120	16,9 a	83,7 a	10,4 a	12,4 a
0	0	16,8 a	82,1 a	10,7 a	11,9 a
C.V. (%)		5,1	3,3	3,4	7,3

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 0,10 de significância;

\*+ Valores diferentes pelo teste de Dunnett a 0,05 de significância.

Tabela 10. Análises de Brix, Pureza, Fibra e Pol em cana-soca, variedade RB966928, em função da aplicação de doses de N combinadas ou não com doses do inoculante contendo *Azospirillum brasiliense* aplicadas via foliar.

Tratamentos		Análises tecnológicas <sup>(1)</sup>			
Dose de <i>A. brasiliense</i> L ha <sup>-1</sup>	Dose de N kg ha <sup>-1</sup>	Brix	Pureza %	Fibra	Pol
0,0	60	17,8 a	89,7 a*	10,8 a	15,9 a
0,2	60	18,1 a	88,6 a*	10,0 a	16,1 a
0,4	60	17,2 a	86,8 b	11,1 a	15,0 a
0,6	60	17,5 a	88,5 a*	11,1 a	15,5 a
0,8	60	17,4 a	87,6 a*	11,1 a	15,2 a
0,8	0	17,9 a	86,3 b	11,3 a	15,4 a
0	120	17,2 a	83,7 c*	11,1 a	14,4 a
0	0	18,0 a	88,4 a	10,3 a	15,9 a
C.V. (%)		4,6	2,0	9,5	5,0

<sup>(1)</sup> Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 0,10 de significância;

\*+ Valores diferentes pelo teste de Dunnett a 0,05 de significância;

Analisando os resultados não se pode concluir se a presença da bactéria melhorou ou afetou a qualidade da matéria prima, porém, no trabalho de Guimarães (2016), a aplicação de inoculantes contendo bactérias diazotróficas associadas a adubação nitrogenada em vasos com irrigação, não promoveu efeito positivo sobre a qualidade tecnológica da cana-planta e na cana-soca, influenciando negativamente nas variáveis Brix, Pol e ATR.

Costa (2014) ao verificar o efeito da aplicação de inoculante composto por bactérias diazotróficas, associado a doses de N fertilizante sobre os aspectos quantitativos e qualitativos da produção de cana de açúcar, observou que os parâmetros qualitativos, ATR, fibra e Pol não diferenciaram estatisticamente, em relação a aplicação do inoculante e as doses de N. Vitti (2003) observou aumento dos teores de fibra e Pol com o aumento da dosagem de N, mas constatou que não houve variação significativa entre os tratamentos.

### **3.6 Considerações finais**

Os resultados mostraram que a resposta à inoculação com a bactéria *Azospirillum brasiliense* foi bastante variável e parece ser dependente de vários fatores incluindo o genótipo da planta e o ambiente.

Atualmente são poucos os relatos do mecanismo de absorção do *Azospirillum brasiliense* na folha de cana-de-açúcar e a forma de conversão do N. Novos estudos devem ser realizados visando compreender melhor a afinidade dessa bactéria com os mecanismos fisiológicos da folha, e aprimorar a metodologia de seleção de estirpes, de modo a definir aquelas que possuem maior potencial para serem usadas comercialmente na inoculação de diferentes variedades de cana-de-açúcar.

As condições do ambiente, principalmente altas temperaturas, no momento do armazenamento, transporte e da aplicação são prejudiciais à taxa de sobrevivência da bactéria, portanto, ter o controle da temperatura desde o recebimento do inoculante até o momento da aplicação é essencial para garantir a eficiência da FBN pela bactéria.

## **4 CONCLUSÕES**

Para variedade de cana-de-açúcar RB855156, houve aumento de produtividade (colmos e açúcar) com *Azospirillum brasilense* na presença de N e, independente da dose do inoculante, o recomendado seria conciliar com a aplicação de N mineral, não havendo dose ideal da bactéria para suprir a necessidade por si só.

A variedade RB966928 foi responsiva a aplicação foliar do inoculante, aumentando a produção de colmos e de açúcar quando comparada a testemunha, sendo que, a aplicação exclusiva de *Azospirillum brasilense* indica ser uma alternativa de uso para reduzir o custo com a adubação nitrogenada.

A bactéria aplicada via foliar em cana-soca, não alterou os teores de N foliar, ATR, Brix, Fibra e Pol, nas duas variedades estudadas.

## REFERÊNCIAS

- BASANTA, M. V.; DOURADO-NETO, D.; REICHARDT, K.; BACCHI, O. O. S.; OLIVEIRA, J. C. M.; TRIVELLIN, P. C. O.; TIMM, L. C.; TOMINAGA, T. T.; CORRECHEL, V.; CÁSSARO, F. A. M.; PIRES, L. F.; DE MACEDO, J. R. Management effects on nitrogen recovery in a sugarcane crop grown in Brazil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 116, p. 235–248, 2003.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; BASHAN, L. E. *Azospirillum* plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, [S.I.], v. 50, p. 521-577, 2004.
- BIGGS, I. M.; STEWART, G. R.; WILSON, J. R.; CRITCHLEY, C. <sup>15</sup>N natural abundance studies in Australian commercial sugarcane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 238, p. 21–30, 2002.
- COCKING, E. C. Introducing Symbiotic N<sub>2</sub> Fixing Bacteria into Nonlegumes. **Centre for Crop Nitrogen Fixation**, School of Biology and School of Biosciences, University of Nottingham, Nottingham, UK. 2007.
- COSTA, H. T. **Efeito do uso de inoculante e da adubação nitrogenada em soqueira de cana-de-açúcar.** 2014. 69 f. Dissertação (mestrado)-Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.
- CREUS, C. M.; SUELDO, R. J.; BARASSI, C. A. Water relations and yield in *Azospirillum* inoculated wheat exposed to drought in the field. **Review Canadian Journal of Botanic**, [S.I.], v. 2, p. 273-281, 2004.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2013.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2 ed., 2009.
- ESTRADA, G. A.; BALDANI, V. L. D.; OLIVEIRA, D. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 369, p. 115-129, 2013.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, [S.I.], v.6, n. 2, p.36-41, jul./dez. 2008.
- FRANCO, H. C. J.; OTTO, R.; FARONI, C. E.; VITTI, A. C.; DE OLIVEIRA, E. C. A.; TRIVELLIN, P. C. O. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 121. n. 1, p. 29-41, 2011.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, [S.I.], v. 54, p. 145-150, 1993.

GÍRIO, L. A. S. **Eficiência agronômica de bactérias diazotróficas na cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.).** 2014. 60f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2014.

GUIMARÃES, D. S. N. **Bactérias fixadoras de nitrogênio no desenvolvimento, produção e qualidade da cana-de-açúcar.** 2016. 38f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Uberlândia, 2016.

HOEFSLOOT, G.; TERMORSHUIZEN, A. J.; WATT, D. A.; CRAMER, M. D. Biological nitrogen fixation is not a major contributor to the nitrogen demand of a commercially grown South African sugarcane cultivar. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 277, p. 85–96, 2005.

LEAL, L. T. **Resposta de genótipos de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas no Rio Grande do Sul.** 2011. 72f. (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração em Biodinâmica e Manejo do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

LIMA, E.; BODDEY, R. M.; DOBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugarcane using a  $^{15}\text{N}$  aided nitrogen balance. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 165–170, 1987.

LIN, L.; HU, C.; ZHANG, X; CHANG, S.; YANG, L; LI, Y.; AN, Q. Plant growth-promoting nitrogen-fixing enterobacteria are in association with sugarcane growing in Guangxi, China. **Microbes and environments**, Tagajo, v. 27, n. 4, p. 391-398, 2012.

MALAVOLTA, E. **Manual de química agrícola adubos e adubação.** São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1981.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Diazotrophic Associations in sugarcane cultivation in south India. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 76, p. 171–178, 1999.

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

OHYAMA, T.; MOMOSE, A.; OHTAKE, N.; SUEYOSHI, K.; SATO, T.; NAKANISHI, Y.; ASSIS JUNIOR, C. A.; RUAMSUNGSR, S.; ANDO, S. Nitrogen fixation in sugarcane. In: OHYAMA, T. (Ed.). **Advances in biology and ecology of nitrogen fixation**, InTech, n. 3, p. 49-70, 2014.

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

OLIVEIRA, E. C. A.; FREIRE, F. J.; OLIVEIRA, R. I.; OLIVEIRA, A. C.; FREIRE, M. B. G. S. Acúmulo e alocação de nutrientes em cana-de-açúcar. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 3, p. 579-588, 2011.

OLIVEIRA, E. C. A.; FREIRE, F. J.; OLIVEIRA, R. I.; FREIRE, M. B. G. S.; SIMÕES NETO, D. E.; SILVA, S. A. M. Extração e exportação de nutrientes por variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob irrigação plena. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, p. 1343-1352, 2010.

OLIVER, R. **Interação entre bactérias diazotróficas e doses de N-fertilizante na cultura da cana de açúcar**. 2014. 64f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração em Agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

ORLANDO FILHO, J.; ROSSETTO, R.; CASAGRANDE, A. A. Micronutrientes para a cana-de-açúcar. In: FERREIRA, M. E. et al. (Ed.). **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. São Paulo: Ed. Legis Summa, v. 1, p. 355-373, 2001.

ORLANDO FILHO, J.; ZAMBELLO JUNIOR, E. Influência da adubação N-P-K nas qualidades tecnológicas da cana-planta variedade CB41-76. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 3, p. 37-44, 1980.

PEREIRA, W. **Produtividade e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas**. 2011. 70f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

PRADO JUNIOR, J. P. Q. **Qualidade e produtividade da cana-de-açúcar inoculada com *Gluconacetobacter Diazotrophicus* e adubada com nitrogênio mineral e orgânico**. 2008. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto agronômico, Campinas. 2008.

RAIJ, B. Van; CANTARELLA, H. Milho para grão e silagem. In: RAJ, B. Van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLAN, A. M. C. (Ed.). **Boletim técnico 100**. Campinas: Instituto Agronômico, p. 56-59, 1996.

RAMOS, L. A. **Resíduos orgânicos e fertilizantes minerais na cultura da cana de açúcar e alterações nas características químicas do solo**. 2013. 90 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. Critical Reviews in **Plant Sciences**, [S.I.], v. 19, p. 227-247, 2000.

REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROALCOOLEIRO – RIDESA. **Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar.** [s.n.], Curitiba, 2010.

ROESCH, L. F.; CAMARGO, F. de O.; SELBACH, P. A.; SÁ, E. S. de. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ciência Rural**, [S.I.], v. 35, p. 1201-1204, 2005.

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

SAUBIDET, M. I.; FATTA, N.; BARNEIX, A. J. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil**, [S.I.], v. 245, p. 215-222, 2002.

SHANKARIAH, C.; HUNSIGI, G. **Field Responses of sugarcane to associative N<sub>2</sub> Fixers and Plubilisers.** In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS CONGRESS, [S.I.], v. 24, p. 17-21, 2001.

SCHULTZ, N.; DE MORAIS, R. F.; DA SILVA, J. A.; BAPTISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P.; LEITE, J. M.; PEREIRA, W.; CARNEIRO JÚNIOR, J. de B.; ALVES, B. J. R.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M. Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 2, p. 261-268, fev. 2012.

SHUKLA, S. K.; YADAV, R. L.; SUMAN, A.; SINGH, P. N. Improving rhizospheric environment and sugarcane ratoon yield through bioagents amended farm yard manure in udic ustochrept soil. **Soil and Tillage Research**, [S.I.], v. 99, p. 158-168, 2008.

SINGH, K. P.; SUMAN, A.; SINGH, P. N.; LAL, M. Yield and soil nutrient balance of sugarcane plant ratoon system with conventional and organic nutrient management in subtropical India. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, [S.I.], v. 79, p. 209-219, 2007.

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

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

SUMAN, A.; SINGH, P.; LAL, M. Effects of diverse habitat biofertilizers on yield and nitrogen balance in plant-patoon crop cycle of sugarcane in subtropics. **Sugar Tech**, [S.I.], v. 15, p. 36-43, 2013.

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

URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; DE MORAIS, R. F.; BAPTISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; MAIA E SÁ, J.; BARBOSA, K. P.; DE RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and <sup>15</sup>N natural abundance data for the contribution of biological N<sub>2</sub> fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 356, p. 5 - 21, 2012.

VITTI, A. C. **Adubação nitrogenada da cana-de-açúcar (soqueira) colhida mecanicamente sem a queima prévia: manejo e efeito na produtividade.** 2003. 114 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

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

## ANEXOS

**Anexo A – Caracterização das variedades plantadas nos experimentos.**

- Caracterização da variedade de cana-de-açúcar RB855156: principal variedade para colheita no início da safra (precoce – abril/maio). Os colmos possuem crescimento ereto, diâmetro médio a fino, com internódios dispostos em leve zig-zag, cilíndricos, de tamanho médio, de cor verde-clara, com tendência a apresentarem rachaduras, e pouca cera, que, porém, é evidente na região cerosa abaixo do nó. É uma variedade de bom perfilhamento, especialmente nas socas; possui crescimento ereto e despalha fácil. Apresenta perfilhamento regular em cana-planta e muito boa em soca. Devido à sua propensão ao florescimento, recomenda-se a sua colheita sempre no início da safra, fazendo com que o seu período de utilização industrial (PUI) seja curto.

É uma variedade com alto teor de sacarose, com produtividade média e baixo teor de fibra. Não é muito exigente em ambientes de produção (baixa a média, C1 – D1), porém, recomenda-se não plantar essa variedade como cana de ano.

No aspecto fitossanitário não requer nenhum cuidado especial, pois é bastante resistente às principais doenças: carvão (*Ustilago scitaminea*), escaldadura-das-folhas (*Xanthomonas albilineans*), estrias vermelhas, ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala*) e mosaico (RIDESA, 2010).

- Caracterização da variedade de cana-de-açúcar RB966928: variedade de maturação precoce a média, podendo ser colhida de início a meio de safra. Apresenta excelente germinação em cana-planta, brotação em soqueiras muito boa, alto perfilhamento em cana-planta e em cana soca, com alto crescimento e excelente fechamento de entrelinhas.

É uma variedade de PUI médio, com alta produtividade, mas com teores de sacarose e fibra médios. Exige ambientes de produção médios a alto potencial (A2 – D1, dependendo da época de colheita).

No aspecto fitossanitário é tolerante às principais doenças: carvão (*Ustilago scitaminea*), escaldadura-das-folhas (*Xanthomonas albilineans*), estrias vermelhas, ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala*) e mosaico (RIDESA, 2010).

**Anexo B** – Caracterização química e física do solo da área de instalação do experimento.

Tabela 1B. Caracterização química e física (0-40 cm) do solo classificado como LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico (LVAd) (Fazenda São José, Tupaciguara-MG. 2016).

Prof.	pH	MO	P*	K	Al <sup>+3</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	T	V
cm	CaCl <sub>2</sub>	dag kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>			mmolc dm <sup>-3</sup>			
0-20	4,6	3,1	6,1	1,7	1,4	18	7	74	36,2
20-40	4,3	2,2	3,9	1,0	3,1	10	4	67	22,5
	<b>Argila</b>	<b>Silte</b>	<b>Areia</b>						
		----- g kg <sup>-1</sup>							
0-20	775	25	200						
20-40	750	25	225						

\*P resina

Tabela 2B. Caracterização química e física (0-40 cm) do solo classificado LATOSSOLO VERMELHO Distroférreico (LVdf) (Fazenda Santa Rita de Cássia, Guaíra - SP. 2016).

Prof.	pH	MO	P	K	Al <sup>+3</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	T	V
cm	CaCl <sub>2</sub>	dag kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>			mmolc dm <sup>-3</sup>			
0-20	4,7	2,9	11	11	39	14	5	58,3	33,1
20-40	4,8	2,1	4	11	31	10	4	46,1	31,0
	<b>Argila</b>	<b>Silte</b>	<b>Areia</b>						
		----- g kg <sup>-1</sup>							
0-40	678	93	229						

NOTA 1. Informações obtidas das Unidades Produtoras onde foram realizados os experimentos.

**Anexo C – Contagem de bactérias no solo.**

Tabela 1C. Contagem de *Bradyrhizobium* e bactérias diazotróficas.

Identificação	Umidade do solo	Bactérias Totais	<i>Bradyrhizobium</i>	Bactérias Diazotróficas
	%	UFC g <sup>-1</sup> solo seco	UFC g <sup>-1</sup> solo seco	UFC g <sup>-1</sup> solo seco
Tupaciguara	21,37	1,08 x 10 <sup>7</sup>	1,20 x 10 <sup>6</sup>	5,72 x 10 <sup>6</sup>
	21,41	7,78 x 10 <sup>6</sup>	1,08 x 10 <sup>7</sup>	9,05 x 10 <sup>6</sup>
	20,37	8,78 x 10 <sup>6</sup>	1,14 x 10 <sup>7</sup>	4,52 x 10 <sup>6</sup>
	21,68	9,24 x 10 <sup>6</sup>	7,38 x 10 <sup>6</sup>	2,90 x 10 <sup>6</sup>
<b>Média</b>	<b>21,21</b>	<b>9,15 x 10<sup>6</sup></b>	<b>7,70 x 10<sup>6</sup></b>	<b>5,54 x 10<sup>6</sup></b>
Guaíra	20,45	7,48 x 10 <sup>6</sup>	1,21 x 10 <sup>7</sup>	1,31 x 10 <sup>7</sup>
	21,33	1,13 x 10 <sup>7</sup>	1,46 x 10 <sup>7</sup>	1,43 x 10 <sup>7</sup>
	21,68	1,13 x 10 <sup>7</sup>	1,49 x 10 <sup>7</sup>	1,45 x 10 <sup>7</sup>
	21,06	9,98 x 10 <sup>7</sup>	1,13 x 10 <sup>7</sup>	9,38 x 10 <sup>6</sup>
<b>Média</b>	<b>21,13</b>	<b>3,25 x 10<sup>7</sup></b>	<b>1,32 x 10<sup>7</sup></b>	<b>1,28 x 10<sup>7</sup></b>

Analise feita no Laboratório de Microbiologia Agrícola do Departamento de Produção Vegetal da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus Jaboticabal.

**Anexo D** – Informações pluviométricas das áreas experimentais.

Tabela 1D. Precipitação coletada com auxilio de um pluviômetro instalado próximos a Fazenda São José, Tupaciguara-MG, após a instalação do experimento – 2016.

Meses	Precipitação
	mm
Novembro	366,0
Dezembro	356,5
Total	722,5

Tabela 2D. Precipitação coletada com auxilio de um pluviômetro instalado próximos a Fazenda Santa Rita de Cássia, Guaíra - SP após a instalação do experimento – 2016.

Dia*	Precipitação	
	Outubro	Novembro
	-----mm-----	
02	-	55
03	10	-
06	-	4
11	-	10
12	-	30
13	20	41
21	10	-
23	-	8
29	-	25
30	15	-
Total	55	173

\*Dias do mês em que houve precipitação.

NOTA 2. Informações obtidas das Unidades Produtoras onde foram realizados os experimentos.