

UFRRJ

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

TESE

**Mudas Pré-Brotadas de Cana-de-açúcar Inoculadas
com Bactérias Diazotróficas: Desenvolvimento e
Metabolismo de Nitrogênio**

Silvana Gomes dos Santos

2017



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

**MUDAS PRÉ-BROTADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADAS
COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS: DESENVOLVIMENTO E
METABOLISMO DE NITROGÊNIO**

SILVANA GOMES DOS SANTOS

Sob a Orientação da Pesquisadora
Veronica Massena Reis

e Co-orientação do Professor
Leandro Azevedo Santos

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, no curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ
Julho de 2017

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

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

S237m Santos, Silvana Gomes dos, 1987-
Mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com
bactérias diazotróficas: desenvolvimento e metabolismo
de nitrogênio / Silvana Gomes dos Santos. - 2018.
81 f.: il.

Orientadora: Veronica Massena Reis.
Coorientador: Leandro Azevedo Santos.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Agronomia-Ciência do Solo, 2018.

1. Sacharum officinarum L. 2. Promoção de
crescimento. 3. Nitrogênio. 4. Diazotróficas. I.
Massena Reis, Veronica, 1961-, orient. II. Azevedo
Santos, Leandro, -, coorient. III Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Agronomia-Ciência do
Solo. IV. Título.

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

SILVANA GOMES DOS SANTOS

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

TESE APROVADA EM 11/07/2017.

Veronica Massena Reis. Dra. Embrapa Agrobiologia
(Orientadora)

Nelson Mazur. Dr. UFRRJ

André Marques dos Santos. Dr. UFRRJ

Gabriela Alves Cavalcanti. Dra. UFRRJ

Márcia Soares Vidal. Dra. Embrapa Agrobiologia

Nivaldo Schultz. Dr. UFRRJ

DEDICATÓRIA

À minha sobrinha Patrícia Silva Santos.
(In memoriam)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela sua presença durante todos os dias da minha vida e por me conferir força, saúde, determinação e sensibilidade que possibilitaram a execução desse trabalho.

Aos meus pais, Antônio Batista e Maria Gomes, que venceram todas as dificuldades para me proporcionar uma formação de qualidade, e por me amparar em todos os momentos de dificuldade.

Ao meu esposo Carlos Prestes, pelo amor e carinho, por sua imensurável ajuda e por tornar os dias difíceis mais curtos e, pelo conforto da sua companhia, os dias felizes mais longos.

Aos meus irmãos (a), sobrinhos (a) e cunhados (a) pelo amor, carinho e pelo voto de confiança, em especial, a minha irmã Simeire que não mediu esforços para contribuir na minha formação, comemorando comigo cada conquista alcançada.

Aos meus Orientadores, Veronica Massena Reis e Leandro Santos Azevedo, por serem exemplos como pessoas e profissionais e pela grande contribuição na minha formação.

Às bolsistas e amigas, Flaviane e Camila, que contribuíram de forma significativa e decisiva para execução deste trabalho, cada linha escrita nessa tese expressa a minha imensa gratidão pelo grande esforço de cada uma.

Aos técnicos Lúcio e Wilson e aos bolsistas do Laboratório de Gramíneas, em especial, ao Willian, Otávio, Alisson, Farley e Gabriela, pelo auxílio nos experimentos e pela amizade.

Aos Laboratórios de Fertilidade e Nutrição mineral de plantas da UFRRJ pela disponibilidade de equipamentos e/ou reagentes.

À equipe de apoio aos experimentos da Embrapa Agrobiologia, em especial, ao Claudinho, Marildo, Ernane, Aurélio e Arley.

Aos amigos, Leilson e Orlando, pelos treinamentos necessários à realização de diversas análises e às amigas Andrea, Mayan e Erika pela amizade sincera durante todo esse tempo e pelos momentos de descontração.

Ao meu amigo Ronaldo Amaral, sempre presente, minha base de conselhos valiosos, aquele com quem posso contar em qualquer circunstância.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e à Embrapa Agrobiologia pela formação.

À CAPES e à FAPERj pelas bolsas de estudo.

Ao curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do solo pela excelência na infraestrutura e pela equipe extraordinária que contribuíram significativamente na minha formação profissional e pessoal.

Ao Instituto Federal do Pará e aos professores dessa instituição que por meio do curso técnico em agropecuária fizeram-me conhecer e desejar aprender mais sobre agronomia.

Ao sistema de acesso à educação do Brasil que possibilitou através da disponibilidade de bolsas de estudo e outros incentivos, que uma filha de agricultores de baixa renda se tornasse doutora, minha eterna gratidão.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Silvana Gomes dos Santos, filha de Antônio Batista dos Santos Sobrinho e Maria Gomes dos Santos, nasceu em 7 de janeiro de 1987, na cidade de Tucuruí, estado do Pará. Em 2002 concluiu o ensino fundamental na Escola Municipal de Ensino Fundamental Professora Raimunda Tavares e ingressou na antiga Escola Agrotécnica Federal de Castanhal atual (IFPA) para concluir o ensino médio e Técnico em Agropecuária em 2004. Durante o curso foi bolsista do Instituto Internacional de Educação no Brasil atuando em projetos de Desenvolvimento e divulgação de técnicas agroecológicas na referida Instituição. No ano 2007, iniciou o curso de Especialização em Manejo Florestal na mesma Instituição, deixando-o incompleto para adentrar na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em 2007. Graduando-se em Agronomia em 2011. No início de sua graduação, dedicou-se a estudar Fertilidade de solo, estagiando no Laboratório de análises químicas do solo da UFRRJ. Em seguida, entrou na Embrapa Agrobiologia, sendo bolsista de Iniciação Científica, atuando diretamente no projeto de pesquisa, Inoculante Múltiplo de Pseudomonas: Uma estratégia Biotecnológica para incrementar a produção de hortaliças com bolsas CNPq e Faperj (2008 a 2011). No período de fevereiro de 2012 a fevereiro de 2014, cursou mestrado no curso de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo da UFRRJ, como bolsista da CAPES, desenvolvendo sua dissertação intitulada de “Potencial de fungos endofíticos negros (*Dark septate endophytes*) em colonizar e reduzir efeitos de estresse hídrico em plantas de arroz”, junto aos laboratórios de Ecologia Microbiana da Embrapa Agrobiologia e Biologia do solo – UFRRJ. Em março de 2014, iniciou o curso de doutorado no mesmo programa e instituição com bolsa Capes inicialmente e, posteriormente, como bolsista Nota 10 da Faperj com a tese “Mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas: desenvolvimento e metabolismo de nitrogênio” junto aos laboratórios de Gramíneas da Embrapa Agrobiologia e Nutrição mineral de plantas da UFRRJ, concluindo-a na presente data.

RESUMO

SANTOS, Silvana Gomes. **Mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas: desenvolvimento e metabolismo de nitrogênio.** 2017. 81 f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2018.

O desenvolvimento inicial e o metabolismo de nitrogênio (N) das variedades de cana-de-açúcar RB867515, IACSP95-5000, RB966928 e RB92579 foram avaliados por meio da inoculação das bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd), *Herbaspirillum seropedicae* (Hs) -, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Hr), *Paraburkholderia tropica* (Pt) e *Nitrospirillum amazonense* (Na) isoladamente ou em mistura. Quatro experimentos foram conduzidos em casa de vegetação a partir de três etapas sequenciais de cultivo: Brotação dos minitoletes em caixa com areia e vermiculita estéril, desenvolvimento em tubetes contendo substrato comercial multiplant e em sistema hidropônico a partir de solução de Hoagland modificada para duas doses de N, alta (3mM) e baixa (0,3mM) e sobre a restrição do nutriente por 72h. Avaliou-se o acúmulo de biomassa e os parâmetros radiculares (área, volume e comprimento) logo após a germinação, a biomassa das plantas e biometria após tubetes. Durante e após o sistema hidropônico, obteve-se a atividade das enzimas nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS), frações solúveis e acúmulo de biomassa e nutrientes. A mistura bacteriana e a estirpe Hr apresentaram melhores resultados na biomassa, atividade da NR e acúmulo de N na variedade RB966928, já na variedade RB867515 a mistura e a inoculação das estirpes Na, Gd e Pt apresentaram melhores resultados no desenvolvimento e metabolismo de N das mudas. Incrementos na MSR das variedades RB867515, IACSP95-5000 e RB92579 foram observados em até 50% através da inoculação da mistura logo após a brotação. Este efeito também foi observado no volume e área radicular e no aumento de aproximadamente 30% no comprimento de raízes finas na variedade RB867515. Após cultivo em tubetes as mudas inoculadas de todas as variedades apresentaram maior MSR, porém somente a RB867515 e a IACSP95-5000 apresentaram incrementos na MSPA. A inoculação das bactérias isoladas ou em mistura promoveu aumento na atividade da NR nas folhas e raízes sobre restrição de N e da GS nas folhas, independente da dose de N. A inoculação aumentou os teores de N-Nitrato nas folhas e reduziu nas raízes, incrementou os teores de N-amino e reduziu os teores de açúcares solúveis, indicando melhoria no processo de assimilação de N. Ao final do cultivo hidropônico, a inoculação da mistura proporcionou maior biomassa seca das plantas e aumento no acúmulo de nutrientes das variedades RB867515 e RB966928. Bactérias diazotróficas alteraram o metabolismo de N e promoveram o desenvolvimento das mudas de cana-de-açúcar. Maiores efeitos foram observados no sistema radicular sobre baixa disponibilidade de N e dependente do genótipo.

Palavras-chave: *Sacharum officinarum* L. Promoção de crescimento. Nitrogênio. Diazotróficas.

ABSTRACT

SANTOS, Silvana Gomes. **Pre-budded seedlings of sugarcane inoculated with diazotrophs: development and nitrogen metabolism.** 2017. 81 p. Thesis (Doctorate, Science in Agronomy, Soil Science). Institute of Agronomy, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2018.

The initial development and nitrogen metabolism (N) of the varieties of sugarcane RB867515, IACSP955000, RB966928 and RB92579 were evaluated by inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd), *Herbaspirillum seropedicae* (Hs) - *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Hr), *Paraburkholderia tropica* (Pt) and *Nitrospirillum amazonense* (Na) isolated or in mixture. Three experiments were conducted in a greenhouse from three sequential stages of cultivation: the micro seed sprouting in a box with sand and sterile vermiculite, developing in core containing Multiplant commercial substrate and hydroponic system through modified Hoagland's solution for two doses of N, high (3 mM) and low (0.3 mM) and under nutrient restriction for 72 h. We evaluated shoot and roots biomass and the radicular parameters (area, volume and length) after germination and plant biomass and biometrics after core stage. During and after the hydroponic system we obtained nitrate reductase (NR) and glutamine synthetase (GS) activity, soluble fractions and accumulation of biomass and nutrients. The bacterial mixture and strain Hr showed better biomass, NR activity and N accumulation in the variety RB966928, already in variety RB867515 the mixture and the inoculation of the Na, Gd and Pt strain showed better results in the development and metabolism of N. Seedlings increases in MSR of var. RB867515, IACSP95-5000 and RB92579 were observed in up to 50% by inoculation of the blend soon after sprouting, this effect was also observed in root volume and area, and in the approximately 30% increase in the length of fine roots in the variety RB867515. After cultivation in tubes, inoculated seedlings of all varieties showed higher MSR, and only RB867515 and IACSP95-5000 showed increases in MSPA. The inoculation of the bacteria isolated or in mixture promoted an increase in NR activity in the leaves and roots on restriction of N and GS in leaves independent of the dose of N. The inoculation increased the N-nitrate levels in the leaves and reduced in the roots, increased the N-amino contents and reduced the soluble sugars, indicating an improvement in the assimilation process of N. At the end of the hydroponic cultivation the inoculation of the mixture provided higher dry biomass of the plants and increase in the accumulation of nutrients of varieties RB867515 and RB966928. Diazotrophic bacteria alter the metabolism of N and promote the development of sugarcane seedlings. Greater effects are observed in the root system, on low availability of N and dependent on the genotype.

Keywords: *Sacharum officinarum* L. Growth promotion. Nitrogen. Diazotrophics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema demonstrativo da composição e sequência dos ensaios experimentais. ... 17
- Figura 2.** Etapas do cultivo de cana-de-açúcar. Brotação em caixas contendo areia e vermiculita (A e B). Desenvolvimento em tubetes contendo substrato comercial multiplant (C) e em sistema hidropônico com solução nutritiva (D). 22
- Figura 3.** Sistema radicular de plântulas de cana-de-açúcar aos 16 dias após o plantio, inoculadas ou não com o inoculante misto de bactérias diazotróficas (vide Tabela 2)..... 26
- Figura 4.** Desdobramento da interação entre inoculação (mistura bacteriana, vide Tabela 2) e variedades no comprimento de raízes finas aos 16 dias após o plantio e inoculação dos minitoletes. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para inoculação e minúsculas para variedade, não diferem pelo teste F a 5% de significância. Espessura de raízes finas = $(0.5 < L \leq 1.5)$, L= Comprimento. Valores médios de 4 repetições. A barra significa o erro padrão. 27
- Figura 5.** Acúmulo de biomassa seca de parte aérea-MSPA, massa seca de raiz - MSR (a) e relação entre a massa seca MSR e MSPA (b) em mudas de cana-de-açúcar, variedade RB867515 aos 20 dias após o plantio e inoculação de cinco bactérias diazotróficas de forma isolada e uma mistura contendo as cinco estirpes (vide Tabela 2). Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância. Valores médios de 4 repetições. A barra significa o erro padrão. 28
- Figura 6.** Desdobramento da interação significativa entre variedade e inoculação (mistura bacteriana, vide Tabela 2) no número de folhas de mudas de cana-de-açúcar 30 dias após o transplantio para tubetes. Letras iguais maiúsculas para inoculação e minúsculas para variedade não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade. Valores médios de 6 repetições. A barra significa o erro padrão. 30
- Figura 7.** Relação entre massa seca de raiz e parte aérea (MSR/MSPA) de mudas de cana-de-açúcar, variedade RB966928 (a) e RB867515 (b) após cultivo em tubetes e inoculadas com bactérias diazotróficas descritas na Tabela 2 de forma isolada e um tratamento contendo o inoculante misto (mistura) com as cinco estirpes bacterianas. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância. Valores médios de 4 (a) e 5 (b) repetições. A barra significa o erro padrão. 32
- Figura 8.** Massa seca de raízes do tolete (primária) e do perfilho (secundária) de mudas de cana-de-açúcar, variedade RB966928 (experimento 1) aos 30 dias após cultivo em tubetes e aos 40 dias após plantio e inoculação das bactérias diazotróficas descritas na Tabela 2 de forma isolada e um tratamento contendo o inoculante misto (mistura) com as cinco estirpes bacterianas. Valores médios de 4 repetições. A barra significa o erro padrão. 32
- Figura 9.** Sistema radicular de mudas de cana-de-açúcar variedade RB966928 cultivadas em tubetes contendo substrato comercial Multiplant® aos 30 dias após a brotação e aos 40 dias após a inoculação da mistura das cinco bactérias utilizadas como inoculante (vide Tabela 2) em comparação ao tratamento controle (não inoculado). 33
- Figura 10.** Sistema radicular da variedade RB867515 de cana-de-açúcar cultivada aos 48 dias em solução de Hoagland modificada para 3 mM e 0,3 mM de nitrogênio e inoculada ou não (controle) com o inoculante misto de bactérias diazotróficas (vide Tabela 2). 34
- Figura 11.** Desdobramento da interação entre variedades de cana-de-açúcar e inoculação (mistura bacteriana, vide Tabela 2) para massa seca de raiz – MSR (a) e entre dose de nitrogênio e inoculação para número de perfilhos (b). Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para inoculação e minúsculas para variedade e dose de nitrogênio não diferem

- pelo teste F a 5% de probabilidade. Valores médios de 12 repetições. A barra significa o erro padrão. 35
- Figura 12.** Desdobramento da interação entre variedade, inoculação (mistura bacteriana, vide Tabela 2) e dose de nitrogênio para massa seca de raízes (MSR) de cana-de-açúcar (experimento 3). Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para inoculação e minúsculas para dose de N, não diferem pelo teste F a 5% de probabilidade. Valores médios de 5 repetições. A barra significa o erro padrão. 35
- Figura 13.** Sistema radicular de mudas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, aos 104 dias após a inoculação de cinco bactérias diazotróficas isoladas e em mistura (vide Tabela 2 e aos 58 dias após o transplantio para o sistema hidropônico, mudas aos 20 dias sobre baixa dose de N (0,3 mM). 37
- Figura 14.** Desdobramento da interação significativa entre dose de nitrogênio e inoculação no número de folhas das mudas de cana-de-açúcar, variedade RB867515 (experimento 4) aos 58 dias após transplantio para solução nutritiva de Hoagland modificada para 2 doses de N (0,3 e 3,0 mM) e aos 104 dias após a inoculação de bactérias diazotróficas e plantio dos mini-toletes. Letras iguais maiúsculas entre dose e minúsculas dentro de cada dose não diferem estatisticamente pelo teste Skott-Knott ($p \leq 0.05$). Valores médios de 4 repetições. 38
- Figura 15.** Relação entre massa seca de raiz e parte aérea (MSR/MSPA) de mudas de cana-de-açúcar, variedade RB966928 (a) e RB867515 (b) após cultivo em sistema hidropônico e inoculadas com bactérias diazotróficas descritas na Tabela 2 de forma isolada e um tratamento contendo o inoculante misto (mistura) com as cinco estirpes bacterianas. (*) A falta dos tratamentos Na e Gd na figura (a) indica que eles não fizeram parte no experimento de hidroponia na variedade RB966928. Valores médios de 4 repetições. 39
- Figura 16.** Percentual de incremento na massa seca da parte aérea-MSPA (a) e na massa seca de raiz-MSR (b) de variedades de canas-de-açúcar inoculadas com a mistura das cinco estirpes bacterianas (vide Tabela 2) em relação ao tratamento controle após as três fases de cultivo das mudas. Valores médios de 4 repetições na fase de brotação, 5 na fase de tubetes e de 10 na fase de hidroponia. 40
- Figura 17.** Percentual de incremento na massa seca da parte aérea-MSPA (a) e na massa seca de raiz-MSR (b) de variedades de canas-de-açúcar inoculadas com a mistura das cinco estirpes bacterianas (vide Tabela 2) em relação ao tratamento controle após as três fases de cultivo das mudas. Valores médios de 5 repetições. 41
- Figura 18.** Desdobramento da interação entre variedade e inoculação (mistura bacteriana, vide Tabela 2) para atividade da enzima nitrato redutase (NR) em raízes de mudas de cana-de-açúcar, variedades RB867515 e IACSP95-5000 (experimento 2) após crescimento durante 30 dias sobre 3,0mM de N (a) e após 72 horas em solução sem N (b). Valores médios de 12 repetições. A barra significa o erro padrão. 47
- Figura 19.** Desdobramento da interação entre variedade e nitrogênio para atividade da enzima nitrato redutase (NR) em folhas (a) e raízes (b) de mudas de cana-de-açúcar, variedades RB867515 e IACSP95-5000 (experimento 2) após 59 dias em solução nutritiva, sendo 30 dias com dose 3,0mM de N, depois retirado o N por 72h e suprido novamente com dose alta (3,0mM) e baixa (0,3mM). Valores médios de 12 repetições. A barra significa o erro padrão. 48
- Figura 20.** Desdobramento da interação entre inoculação (mistura bacteriana, vide Tabela 2) e dose de nitrogênio (I*N) para atividade da enzima nitrato redutase (NR) em folhas (a) e raízes (b) de mudas de cana-de-açúcar, variedades RB867515 e IACSP95-5000 (experimento 2) após 59 dias em solução nutritiva, sendo 30 dias com dose 3,0mM de N,

- depois retirado o N por 72h e suprido novamente com dose alta (3,0mM) e baixa (0,3mM) (coleta 3). Valores médios de 12 repetições. A barra significa o erro padrão.... 48
- Figura 21.** Desdobramento da interação entre variedade e inoculação (mistura bacteriana, vide Tabela 2) para atividade da enzima nitrato redutase (NR) em raízes de mudas de cana-de-açúcar, variedades RB92579 e RB966928 (experimento 3) após 46 dias em solução nutritiva, sendo 25 dias com dose 3,0mM de N, depois retirado o N por 72h e suprido novamente com dose alta (3,0mM) e baixa (0,3mM) (coleta 3). Valores médios de 10 repetições. A barra significa o erro padrão. 50
- Figura 22.** Desdobramento da interação entre variedade e dose de nitrogênio (a) e entre inoculação (mistura bacteriana, vide Tabela 2) e dose de N (b) para atividade da enzima nitrato redutase (NR) em raízes de mudas de cana-de-açúcar, variedades RB92579 e RB966928 (experimento 3) após 46 dias em solução nutritiva, sendo 25 dias com dose 3,0mM de N, depois retirado o N por 72 h e suprido novamente com dose alta (3,0mM) e baixa (0,3mM) (coleta 3). Valores médios de 10 repetições. A barra significa o erro padrão. 51
- Figura 23.** Atividade da enzima nitrato redutase em mudas de cana-de-açúcar, variedade RB966928 inoculadas com as bactérias diazotróficas isoladas e um tratamento contendo as cinco estirpes bacterianas (mistura, vide Tabela 2). Plantas cultivadas durante 40 dias em solução nutritiva de Hoagland modificada com 3mM de nitrogênio. Coleta realizada 24 horas (a) e 7 dias (b) após a troca de solução. Valores médios de 4 repetições. A barra significa o erro padrão. 51
- Figura 24.** Atividade da enzima nitrato redutase (NR) em folhas de cana-de-açúcar variedade RB867515 aos 104 dias após o plantio e inoculação de bactérias diazotróficas isoladas e uma mistura das cinco estirpes (vide Tabela 2). Plantas aos 58 dias após cultivo em solução nutritiva, sendo 30 dias fornecido solução com 3,0 mM de nitrogênio, depois solução sem N por 72 h e permanecendo durante 25 dias com a solução alta (3mM) e baixa (0,3mM) de N. Valores médios de 4 repetições. A barra significa o erro padrão.... 52
- Figura 25.** Atividade da glutamina sintetase (GS) em folhas e raízes de cana-de-açúcar variedade RB867515 aos 104 dias após o plantio e inoculação de bactérias diazotróficas isoladas e uma mistura das cinco estirpes (vide Tabela 2). Plantas aos 58 dias após cultivo em solução nutritiva, sendo 30 dias fornecido solução com 3,0 mM de nitrogênio, depois solução sem N por 72 h e permanecendo durante 25 dias com a solução alta (3mM) e baixa (0,3mM) de N. Valores médios de 8 repetições. A barra significa o erro padrão. .53
- Figura 26.** Efeito da dose de nitrogênio na atividade da glutamina sintetase (GS) em folhas e raízes de cana-de-açúcar variedade RB867515 aos 104 dias após o plantio e inoculação de bactérias diazotróficas (mistura bacteriana, vide Tabela 2) e aos 58 dias após cultivo em solução nutritiva, sendo 30 dias fornecido solução com 3,0 mM de nitrogênio, depois solução sem N por 72 h e permanecendo durante 25 dias com a solução alta (3mM) e baixa (0,3mM) de N. Valores médios de 8 repetições. A barra significa o erro padrão.... 53
- Figura 27.** Desdobramento da interação entre variedade e inoculação (mistura bacteriana, vide Tabela 2) para teores de N-amino (a) e dose de nitrogênio e inoculação para teores de N-NO_3^- (b) em raízes de mudas de cana-de-açúcar (experimento 2) após 30 dias em solução nutritiva com dose 3,0mM de N (a), e após 59 dias em solução nutritiva, sendo 30 dias com dose 3,0mM de N, depois retirado o N por 72 h e suprido novamente com dose alta (3,0mM) e baixa (0,3mM) (b). Valores médios de 12 repetições. A barra significa o erro padrão. 60
- Figura 28.** Desdobramento da interação entre variedade e inoculação (mistura bacteriana, vide Tabela 2) para acúmulo de nitrogênio e fósforo total em mudas de cana-de-açúcar, variedades RB867515 e IACSP95-5000 (experimento 2) após 59 dias em solução

nutritiva, sendo 30 dias com dose 3,0mM de N, depois retirado o N por 72 h e suprido novamente com dose alta (3,0mM) e baixa (0,3mM) (coleta 3). Médias seguidas de letras iguais, maiúscula para inoculação e minúscula para variedade, não diferem pelo teste F a 5% de significância. Valores médios de 8 repetições. A barra significa o erro padrão.....65

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Características das espécies bacterianas presente no inoculante recomendado para de cana-de-açúcar quanto as características de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV)..... 9
- Tabela 2.** Identificação, local e meio de isolamento das bactérias diazotróficas utilizadas no inoculante misto produzido na Embrapa Agrobiologia para cana-de-açúcar. Adaptado de Oliveira et al. (2003)..... 20
- Tabela 3.** Análise química do substrato comercial Multiplant® utilizado no desenvolvimento das mudas de cana-de-açúcar em tubetes. 20
- Tabela 4.** Solução nutritiva modificada de Hoagland utilizada no crescimento das mudas de cana-de-açúcar com 5 mM NO₃⁻ e 0,5 mM de NH₄⁺ (solução 1) e com 0,25 mM de NO₃⁻ e 0,05 mM NH₄⁺ (solução 2). 20
- Tabela 5.** Acúmulo de biomassa e parâmetros radiculares de variedades de cana-de-açúcar aos 15 dias após inoculação da mistura bacteriana (vide Tabela 2) e plantio em areia e vermiculita estéril. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F a 5% de significância. Valores médios de 8 repetições. CV= Coeficiente de variação..... 27
- Tabela 6.** Promoção de crescimento de mudas de cana-de-açúcar pelo inoculante múltiplo de bactérias diazotróficas (vide Tabela 2) após cultivo em tubetes. Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem pelo teste F a 5% de significância. Valores médios de 12 (experimento 2) e 10 (experimento 3) repetições. CV= coeficiente de variação. 29
- Tabela 7.** Número mais provável de células bacterianas (NMP) em massa fresca (MF) de raízes de duas variedades de cana-de-açúcar após 30 dias a inoculação da mistura bacteriana (vide Tabela 2) em comparação ao tratamento controle (não inoculado). 29
- Tabela 8.** Acúmulo de biomassa e parâmetros de crescimento de mudas de cana-de-açúcar, variedade RB966928 (experimento 1) e RB867515 (experimento 4) aos 30 dias após cultivo em tubetes e aos 40 (RB966928) e 56 (RB867515) dias após plantio e inoculação das bactérias diazotróficas. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância. Valores médios de 4 (RB966928) e 5 (RB867515) repetições. CV = coeficiente de variação. 31
- Tabela 9.** Mudas de cana-de-açúcar após cultivo em sistema hidropônico com solução de Hoagland modificada para duas concentrações de nitrogênio (0,3 e 3 mM) e inoculadas com o inoculante misto de bactérias diazotróficas (vide Tabela 2)..... 34
- Tabela 10.** Promoção de crescimento de mudas de cana-de-açúcar por bactérias diazotróficas isoladas e a mistura das cinco estirpes do inoculante (vide Tabela 2) aos 80 dias após inoculação e aos 40 dias após cultivo em sistema hidropônico com solução nutritiva de Hoagland modificada para 3mM de nitrogênio. 36
- Tabela 11.** Parâmetros de crescimento da variedade RB867515 de cana-de-açúcar aos 58 dias após transplantio para solução nutritiva de Hoagland modificada para 2 doses de N (0,3 e 3,0 mM) e aos 104 dias após a inoculação de bactérias diazotróficas (mistura bacteriana, vide Tabela 2) e plantio dos minitoletes. 38
- Tabela 12.** Atividade da enzima nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS) em mudas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas (mistura bacteriana, vide Tabela 2) durante o desenvolvimento em solução nutritiva durante 25 dias sobre 3,0 mM de nitrogênio (coleta 1) e após 72 h sob restrição do nutriente (coleta 2) e após 26 dias

sobre as doses 3,0 e 0,3mM de N. Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem pelo teste F a 5% de probabilidade. Valores médios de 24 repetições.	46
Tabela 13. Atividade da enzima nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS) em mudas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas (mistura bacteriana, vide Tabela 2) durante o desenvolvimento em solução nutritiva durante 25 dias sobre 3,0 mM de nitrogênio (1 coleta) e após 72 h sob restrição do nutriente (coleta 2) e após 18 dias sobre as doses 3,0 e 0,3 mM de N. Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem pelo teste F a 5% de probabilidade. Valores médios de 20 repetições.	49
Tabela 14. Frações solúveis em tecidos frescos de folhas e raízes durante o desenvolvimento das mudas de cana-de-açúcar inoculadas ou não com a mistura de bactérias diazotróficas (vide Tabela 2) e crescida em solução nutritiva durante 30 dias sobre 3,0mM de nitrogênio (1 coleta), após 72 h sob restrição do nutriente (coleta 2) e após 26 dias sobre resuprimento com as doses 3,0 e 0,3mM de N. Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem pelo teste F a 5% de probabilidade. Valores médios de 12 repetições. CV = coeficiente de variação.	58
Tabela 15. Frações solúveis em tecidos frescos de folhas e raízes durante o desenvolvimento das mudas de cana-de-açúcar inoculadas ou não com a mistura de bactérias diazotróficas (vide Tabela 2) e crescida em solução nutritiva durante 25 dias sobre 3,0mM de nitrogênio (coleta 1), após 72 h sob restrição do nutriente (coleta 2) e após 18 dias sobre resuprimento com as doses 3,0 e 0,3mM de N. Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem pelo teste F a 5% de significância. Valores médios de 10 repetições. CV = coeficiente de variação.	59
Tabela 16. Frações solúveis em tecidos frescos de folhas e raízes durante o desenvolvimento das mudas de cana-de-açúcar inoculadas ou não com bactérias diazotróficas (vide Tabela 2) e crescida em solução nutritiva durante 30 dias sobre 3,0mM, depois retirado o N por 72 h e resupridas durante 25 dias com as doses 3,0 e 0,3mM de nitrogênio (N). Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem pelo teste Skott-Knott a 5% de significância. Valores médios de 8 repetições. CV = coeficiente de variação.	61
Tabela 17. Acúmulo de nutrientes na matéria seca em variedades de cana-de-açúcar após cultivo em sistema hidropônico com solução de Hoagland modificada para duas concentrações de nitrogênio (0,3 e 3 mM) e inoculadas com o inoculante misto de bactérias diazotróficas (vide Tabela 2). Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem pelo teste F a 5% de significância. Valores médios de 24 (experimento 2) e 20 (experimento 3) repetições. CV = coeficiente de variação.	64
Tabela 18. Acúmulo de nutrientes na matéria seca nas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas isoladas e uma mistura das cinco estirpes (vide Tabela 2) após cultivo em sistema hidropônico com solução de Hoagland modificada para duas concentrações de nitrogênio (0,3 e 3 mM). Letras iguais maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Skott-Knott ($p \leq 0.05$). Valores médios de 8 repetições.	65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Cana-de-Açúcar	3
2.2. Sistema de Multiplicação de Cana-de-Açúcar - Mudanças Pré-Brotadas (MPB).....	4
2.3. Bactérias Diazotróficas como Inoculante para Cana-de-Açúcar	5
2.3.1. Produção de auxinas <i>in vitro</i>	11
2.3.2. Solubilização de fosfato de cálcio <i>in vitro</i>	11
2.3.3. Produção de sideróforo e controle biológico	12
2.3.4. Metabolismo de nitrogênio e FBN	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Tratamentos e Delineamentos Experimentais.....	18
3.2. Material Vegetal	18
3.3. Tratamento Térmico e Fúngico.....	19
3.4. Inoculação.....	19
3.5. Substratos.....	20
3.6. Condução dos Experimentos	21
3.7. Avaliação do Desenvolvimento Inicial das Mudanças em Caixa com Areia e Vermiculita Estéril e Em Substrato Multiplant® Não Estéril.....	22
3.8. Avaliações Durante e Após o Desenvolvimento das Mudanças em Sistema Hidropônico.....	22
3.9. Análise Estatística.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. Acúmulo de Biomassa e outros Parâmetros Envolvidos no Desenvolvimento Inicial de Mudanças de Cana-de-açúcar Inoculadas ou Não com Bactérias Diazotróficas	26
4.2. Metabolismo de Nitrogênio e Acúmulo de Nutrientes na Matéria Seca das Mudanças de Cana-de-açúcar	45
4.2.1. Atividades das enzimas nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS) em folha e raiz.....	45
4.2.2. Frações solúveis	57
4.2.3. Acúmulo de nutrientes na massa seca das mudanças	63
5. CONCLUSÕES	67
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma importante fonte de matéria prima para produção de açúcar e energia mundial. O Brasil é o maior produtor mundial da cultura, sendo o açúcar um dos principais produtos de exportação do país, tornando a cultura uma importante “commodity” do agronegócio brasileiro. O aumento da preocupação com o meio ambiente e a sustentabilidade dos sistemas produtivos tem transformado essa cultura em uma fonte promissora de matéria prima como alternativa aos combustíveis fósseis (CONAB, 2017).

A cana-de-açúcar possui vários fatores pelos quais apresenta sucesso de cultivo no Brasil, sendo os principais, sua alta produtividade de biomassa, associado à alta taxa fotossintética, favorecida pelas condições edafoclimáticas brasileiras (HUANG et al., 2016) e pela capacidade de adquirir parte do nitrogênio requerido via fixação biológica de nitrogênio (FBN) por bactérias diazotróficas naturalmente associadas à cultura (URQUIAGA et al., 2012). Esses fatores fazem com que a cultura seja alvo de constantes pesquisas no país, uma vez que é possível melhorar o seu desempenho e a sua sustentabilidade produtiva.

Recentemente, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) lançou o sistema de produção de mudas pré-brotadas (MPB) de cana-de-açúcar como sendo uma tecnologia que visa à produção de mudas a partir de gemas individualizadas e a aplicação de técnicas sanitárias. Esta iniciativa tem garantido maior qualidade das mudas, além de redução do volume gasto com colmos e com a manutenção da uniformidade de plantio (LANDELL et al., 2012). Contudo, assim como em outros sistemas de produção de mudas, há uma grande demanda por insumos, dentre eles, fertilizantes nitrogenados, cenário em que o uso de bactérias diazotróficas pode contribuir na redução de custos na obtenção das mudas.

De acordo com JEZ et al. (2016), o uso eficiente de nitrogênio e fósforo, a fixação de carbono e a remediação ambiental podem ser o caminho para redução de insumos no cultivo e desenvolvimento das plantas e, também, para atingir a sustentabilidade dos sistemas produtivos. Possibilitando, assim, a provisão de alimentos, combustível, fibras e matérias-primas a custos menores e com menor impacto ambiental, além de apresenta-se, ainda, como uma das estratégias a ser explorada, tornando-se necessária à compreensão das interações plantas-microbioma para uso potencial da microbiota na agricultura, uma vez que microrganismos são capazes de assimilar e fornecer nutrientes aos vegetais e de conferir proteção a agentes bióticos e abióticos.

Bactérias diazotróficas são reconhecidas pela capacidade de fixar nitrogênio atmosférico e disponibiliza-lo aos vegetais. Elas são comumente encontradas em associações com uma grande diversidade de espécies vegetais, como a cana-de-açúcar, e podem ser isoladas e caracterizadas para compor inoculantes para a própria planta hospedeira a fim de aumentar o efeito dos seus benefícios à cultura. A inoculação de bactérias diazotróficas pode aumentar a taxa de FBN da cana-de-açúcar e contribuir com até 50% do N necessário ao seu desenvolvimento (MEDEIROS et al., 2012). Além disso, por meio de mecanismos comuns às bactérias promotoras de crescimento vegetal, essas bactérias podem promover vários outros efeitos relacionados ao desenvolvimento das plantas (GLICK, 2012). Podendo, portanto, serem empregadas nas formulações de inoculantes, que contribuem na redução da dependência global de agroquímicos e colaboraram para sustentabilidade da agricultura (JAMES e BALDANI, 2012; AHMAD & KIBRET, 2014).

A Embrapa Agrobiologia desenvolveu e tem testado a eficiência de inoculante turfoso composto por cinco estirpes de bactérias diazotróficas de espécies diferentes (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Paraburkholderia tropica*, e *Nitrospirillum amazonense*), todas isoladas de

cana-de-açúcar e destinadas à aplicação na própria cultura (OLIVEIRA et al., 2003; 2006). Esses estudos compreendem desde a produção de veículo para inoculação (DA SILVA et al., 2012) até a eficiência dessas bactérias na cultura em cultivo a campo (PEDULA et al., 2016).

De forma geral, maiores níveis de resposta à inoculação de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar têm sido observados em ambientes com deficiência de nitrogênio, como os solos de baixa fertilidade natural (OLIVEIRA et al., 2003), e quando inoculadas em genótipos adaptados a condições de baixa fertilidade de solo, denominadas variedades “rústicas” (PEREIRA et al., 2013). No entanto, a combinação da interação estirpe e genótipo precisa ser investigada para cada condição ambiental, sobretudo quanto à disponibilidade de nitrogênio e fertilidade geral do solo. Ressalta-se que essas bactérias podem ocasionar a melhoria na absorção de nutrientes (SUMAN et al., 2005) pelo estímulo ao crescimento e às modificações na arquitetura radicular, em razão da ação de substâncias reguladoras de crescimento vegetal que são capazes de produzir (CASSÁN et al., 2014). Essa maior absorção somada a FBN podem influenciar no aumento do “pool” de N nas plantas (CARVALHO et al., 2014).

Desta forma, acredita-se que o aumento no conteúdo de N pode alterar o metabolismo de N, como a atividade de enzimas envolvidas no processo de redução e assimilação de N e que são reguladas pelo seu substrato (NOGUEIRA et al; 2001,2005; DONATO et al., 2004). Portanto, a assimilação de N, em hipótese, também pode ser influenciada pela inoculação de bactérias diazotróficas, embora estudos nesse sentido ainda não estejam disponíveis, em especial, para cana-de-açúcar, por mais que sejam importantes para melhor compreensão dos mecanismos de promoção de crescimento de plantas por bactérias diazotróficas que resulta especialmente no maior acúmulo de biomassa e nutrientes em alguns genótipos de cana-de-açúcar em condições limitantes de nitrogênio (OLIVEIRA et al., 2003; SUMAN et al., 2005).

As hipóteses desta tese são que a inoculação de bactérias diazotróficas é capaz de promover o desenvolvimento de mudas de cana-de-açúcar e que a melhoria na assimilação do nitrogênio pode ser um dos mecanismos utilizados por essas bactérias.

Os objetivos desta tese são, portanto, avaliar a resposta de quatro genótipos de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas através de análises de promoção de crescimento das mudas, mormente as do sistema radicular, e das alterações no metabolismo de nitrogênio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar é a segunda espécie agrícola brasileira considerada uma “commodity”. O setor sucroenergético formado pela cadeia produtiva do açúcar e energia a partir da cana-de-açúcar tem grande peso na geração de renda para o país, principalmente pela importância do Brasil no abastecimento mundial de açúcar (PORTAL BRASIL, 2017).

Segundo o levantamento de safra da Conab 2016/2017, a área cultivada com cana-de-açúcar no país será de aproximadamente 9 milhões de hectares com uma produção de 657,2 milhões de toneladas de colmos, 38,69 milhões de toneladas de açúcar e 27,8 bilhões de litros de etanol, sendo o Brasil o maior produtor mundial da cultura (CONAB, 2017).

A cana-de-açúcar é considerada uma das espécies cultivadas de maior eficiência energética, pois apresenta alta capacidade de converter energia solar em energia química e de armazenamento dessa energia, isso devido ao seu mecanismo fotossintético do tipo C4 (HUANG et al., 2016). Essa é uma das características pela qual a cana-de-açúcar está sendo muito utilizada na produção de energia. Além disso, a cultura apresenta menor exigência relacionada à qualidade do solo em relação a outras espécies, como cereais, considerada a cultura mais indicada a produção de biocombustível com menor impacto ambiental.

Mesmo assim, a sustentabilidade da cultura ainda é alvo de discussão, especialmente em relação às perdas de adubos nitrogenados decorrente do baixo aproveitamento de N-fertilizante pela cultura no que resulta em até 65% de perda do N aplicado (ROBINSON et al., 2011).

Sabe-se que a dependência do petróleo na matriz energética de obtenção de fertilizantes, em especial, os nitrogenados, inviabiliza a aplicação de doses elevadas de N na cultura. Todavia, no Brasil o cultivo de cana-de-açúcar tem apresentado destaque, principalmente pela seleção de variedades pouco responsivas à aplicação de N-fertilizante, em razão dos programas de melhoramento no país adotarem baixas quantidades de fertilizantes nitrogenados, fazendo com que os melhores materiais vegetais possuam baixa demanda de N-fertilizante e associação efetiva com bactérias fixadoras de nitrogênio (BALDANI et al., 2002). Por isso, a dose de N aplicado à cultura no país é considerada baixa (60 a 100 kg N ha⁻¹) em relação a outros países como Índia e China, que apresentam valores máximos de 400 e 755 kg N ha⁻¹ aplicado à lavoura (ROBINSON et al., 2011).

A baixa resposta à aplicação de fertilizantes nitrogenados pela cana-de-açúcar ocorre principalmente durante o primeiro ano de cultivo. Isso se deve, entre outros fatores, ao N oriundo da mineralização da matéria orgânica do solo (BASANTA et al., 2003), da palhada, acumulado nos toletes e no sistema radicular (TRIVELIN et al., 2002) e da contribuição da FBN por bactérias associadas a cultura (BODDEY et al., 2001, 2003, UQUIARGA et al., 1992; 2012).

A partir do segundo ciclo (“soqueira”), a cultura apresenta maiores respostas à aplicação de N fertilizante. De acordo com Franco et al. (2011), a maior contribuição ocorre durante o desenvolvimento inicial da soqueira com valores de até 70% de nitrogênio derivado do fertilizante (NDFP). No final do ciclo da cana soca, esses valores são reduzidos a 30%. Enquanto que em “cana-planta” os autores observaram que os valores de NDFP reduziram de 40% na fase inicial para 10% na colheita final.

Não há dúvidas que esse estudo serve como motivação para se explorar outras fontes de N na nutrição da cana-de-açúcar, em especial a FBN, uma vez que a própria cultura já se

utiliza naturalmente desse mecanismo. Possibilitando, assim, a garantia de maior sustentabilidade ao sistema de produção da cultura, principalmente por reduzir a perda de N.

A colheita do colmo, parte comercializável da cana-de-açúcar, e cultivo contínuo da cultura em tanques contendo solo não adubados com N mostram que o processo de extração e exportação de N pela cultura não promoveu o esgotamento das reservas de N do solo, evidenciando que o N do sistema poderia estar sendo repostado pelo processo de FBN (URQUIAGA et al., 1992). Além disso, essas bactérias são capazes de promover o crescimento, a proteção e a nutrição das plantas por vários outros mecanismos (MOREIRA et al., 2010; BULGARELLI et al., 2013).

A utilização de insumos biológicos de bactérias capazes de proporcionar tais benefícios em conjunto com as demais tecnologias empregadas no sistema produtivo da cana-de-açúcar pode elevar a sustentabilidade da cultura. Nesse sentido, foi incorporado recentemente ao cultivo de cana-de-açúcar no Brasil, um novo sistema de produção de mudas de cana-de-açúcar, no qual as lavouras são formadas a partir de mudas selecionadas com alta qualidade nutricional e sanitária, denominado Sistema de Produção de Mudanças Pré-brotadas (LANDELL et al., 2012).

2.2. Sistema de Multiplicação de Cana-de-Açúcar - Mudanças Pré-Brotadas (MPB)

O plantio convencional de cana-de-açúcar, predominante, consiste ou na sulcação do solo com níveis de umidade adequados e distribuição de mudas do tipo minirrebolos ou na deposição de cana inteira seguida de picação e cobrição. Neste sistema as gemas depositadas ficarão dependentes de diversos fatores bióticos e abióticos para que possa ocorrer a germinação, sendo os mais relevantes a umidade do solo, a temperatura e o período de latência da gema (JADOSKI et al., 2012).

As mudas utilizadas nesse sistema são partes do colmo da planta que pode apresentar de 1 a 3 gemas, chamadas de “colmo-semente” e que apresenta uma série de desuniformidades, oriunda de fatores fisiológicos, morfológicos, climáticos e de manejo (XAVIER et al., 2014). Os colmo-semente são obtidos a partir de canas jovens, com oito a dez meses, plantadas em condições ótimas, bem fertilizadas, com controle de pragas e doenças. É necessária a distribuição de no mínimo 12 gemas por metro de sulco. Para o plantio em épocas de estiagem, é necessário dar preferência para densidade de 15 a 18 gemas por metro linear. Portanto, a demanda de mudas dependendo da época de plantio e condições fitossanitárias do viveiro podem variar de 10 a 20 toneladas por hectare.

Assinala-se que a baixa densidade de gemas pode acarretar em falhas no canavial e o excesso torna o cultivo demasiadamente oneroso (VITTI e MAZZA, 2002).

Nesse contexto, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) desenvolveu recentemente a tecnologia de Mudanças Pré-Brotadas (MPB). Este sistema trata-se de um novo conceito no método de multiplicação de cana-de-açúcar, que visa à produção de mudas em tubetes nas condições de viveiro e o uso de efetivamente uma planta em condições de campo (LANDELL et al., 2012).

Segundo os autores, no sistema MPB as mudas são produzidas a partir de corte da cana, chamados minirrebolos, onde estão as gemas. Logo após, passam por uma seleção visual e tratamento com fungicida, para, posteriormente, serem dispostas em caixas de brotação com temperatura e umidade controladas. Ao final, são inseridas em tubetes que passam por duas fases de aclimação. Todo esse processo tem duração de 60 dias.

Desenvolvido principalmente para conter a disseminação do besouro *Sphenophorus levis*, praga da soqueira da cana-de-açúcar disseminada pela propagação via colmo (DINARDO-MIRANDA e FRACASSO 2010), o sistema MPB pode apresentar outras vantagens relevantes, como, por exemplo, a redução da quantidade de unidades propagativas

(colmo) em até 90% em comparação ao sistema convencional. Além disso, esse sistema pode aumentar a sanidade do estande, em razão do maior controle fitossanitário das mudas, e possibilitar, ainda, a adoção de máquinas menos onerosas no plantio. Portanto, o MPB visa a um ganho econômico pela eficiência na implantação de viveiros, pelo replantio de áreas comerciais e pela expansão e renovação de áreas plantadas de cana-de-açúcar.

Porém, faz-se necessário salientar que o sucesso do MPB depende do desenvolvimento de outras técnicas que garanta a sustentabilidade do sistema. Neste sentido, um dos problemas a ser estudado com mais profundidade seria as estratégias de nutrição das mudas em viveiros, uma vez que a aplicação de fertilizantes pode levar à salinização dos substratos e ao comprometimento do desenvolvimento das mudas, principalmente do sistema radicular (JADOSKI et al., 2012).

Uma das alternativas apontadas por Landell et al. (2012) para solucionar esse problema seria a realização do parcelamento das adubações, principalmente as nitrogenadas, em diversas aplicações. No entanto, essa prática pode representar um aumento significativo no custo operacional o que poderia tornar o sistema mais oneroso.

Desta maneira, a utilização de um insumo biológico a base de bactérias diazotróficas eficientes na FBN e promoção de crescimento de cana-de-açúcar pode ser uma estratégia biotecnológica viável a ser empregada no sistema MPB visando à redução de insumos e à aceleração no processo de obtenção das mudas.

2.3. Bactérias Diazotróficas como Inoculante para Cana-de-Açúcar

Bactérias diazotróficas são procariotos que possuem o complexo enzimático nitrogenase e por isso elas são capazes de reduzir gás nitrogênio atmosférico (N_2) e disponibilizar nitrogênio aos vegetais, pelo processo denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN). Além disso, essas bactérias estão inseridas no grande grupo das “Plant Growth–Promoting Rhizobacteria” (PGPRs), que são bactérias associadas às plantas e capazes de promover o crescimento das plantas por vários mecanismos (BULGARELLI et al., 2013).

As plantas das espécies leguminosas formam com estas bactérias, denominadas rizóbios, uma interação específica do tipo simbiótica. Na simbiose a planta hospedeira modifica parte do tecido radicular para formação do nódulo, local destinado ao abrigo das bactérias e troca de produtos entre os simbioses. Esta interação leguminosa-rizóbio é bastante caracterizada e muitos dos mecanismos já se encontram bastante claros (KRAISER et al., 2011).

Sabe-se também que uma grande diversidade de gêneros de bactérias diazotróficas também formam associações com gramíneas (PITTOL et al., 2015). No entanto, pela ausência de uma estrutura especializada como o nódulo em leguminosas, torna-se mais difícil a compreensão dos mecanismos e resultados das interações entre planta-bactéria (BODDEY et al., 2001).

Pesquisas com bactérias diazotróficas associadas em plantas não-leguminosas iniciaram por volta de 1950 pela pesquisadora Dra. Joanna Döbereiner. O trabalho pioneiro desenvolvido por Döbereiner e Ruschel (1958) isolou espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Beijerinckia* de cana-de-açúcar. Nos dias atuais, por meio de técnicas independentes de cultivos, sabe-se que uma grande diversidade de gêneros de bactérias diazotróficas e/ou promotoras de crescimento vegetal estão associados a cultura (YEOH et al., 2015).

As bactérias diazotróficas associadas às gramíneas são desde as associativas facultativas até as endofíticas obrigatórias. As associativas relacionam-se àquelas que apresentam baixa sobrevivência no solo e que colonizam em maior proporção a superfície dos

tecidos das plantas, já as endofíticas obrigatórias apresentam muito baixa sobrevivência no solo e alta população no interior dos tecidos vegetais (BALDANI et al., 1997). O caráter endofítico pode ser reconhecido como uma fase na vida das bactérias, descrito como um estágio avançado de infecção em que a bactéria permanece mais intimamente relacionada com a planta hospedeira, realizando uma relação mutualística. Em relação a esse caráter, as bactérias são classificadas em endofíticas obrigatórias e facultativas, sendo as obrigatórias dependentes da planta hospedeira para seu crescimento e sobrevivência, enquanto que as facultativas dependem da planta hospedeira apenas durante um estágio do seu ciclo de vida (HARDOIM et al., 2008).

Entre as bactérias diazotróficas e/ou promotoras de crescimento vegetal isoladas de plantas de interesse agrícola, destacam-se alguns gêneros. O gênero *Azospirillum* é o mais representativo do grupo das bactérias associativas. Bactérias desse gênero colonizam preferencialmente a rizosfera, mas são também capazes de penetrar e colonizar o interior dos tecidos vegetais. Esse gênero apresenta a produção de auxinas e outros compostos indólicos como principal característica promotora de crescimento vegetal (CASSÁN et al. 2014). Em cana-de-açúcar as espécies *A. brasilense* e *A. lipoferum* são encontrados em raízes, colmos e folhas, já a *Nitrospirillum amazonense* (Sin. *A. amazonense*) é comumente encontrada em raízes e colmos (REIS JUNIOR et al., 2000). As espécies *A. brasilense* e *A. lipoferum* foram descritas por Tarrand et al. (1978) e a *N. amazonense*, por Magalhães et al. (1983), sendo recentemente reclassificada (LIN et al., 2014). Diversas outras espécies do gênero *Azospirillum* foram descritas posteriormente, como *A. halopraeferens*, (REINHOLD et al., 1987) *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989), *A. largimobile* (BEM DEKHIL et al., 1997), *A. doebereineriae* (ECKERT et al., 2001), *A. oryzae* (XIE & YOKOTA, 2005), *A. melinis* (PENG et al., 2006), *A. canadense* (MEHNAZ et al., 2007a), *A. zae* (MEHNAZ et al., 2007b), *A. rugosum* (YOUNG et al., 2008), *A. picis* (LIN et al., 2009), *A. formosense* (LIN et al., 2012), *A. fermentarium* (LIN et al., 2013a), *A. humicireducens* (ZHOU et al., 2013), *A. soli* (LIN et al., 2015). Totalizando, assim, 17 espécies descritas, demonstrando a grande diversidade do gênero e seu uso potencial como inoculante para gramíneas. Já o gênero *Nitrospirillum* apresenta apenas duas espécies, *N. amazonense* e *N. iridis* (*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: LPSN, 2017*)

O gênero *Herbaspirillum* é representado nesse estudo pelas espécies *H. seropedicae* e *H. rubrisulbalbicans* como sendo as mais antigas e isoladas a partir do rizoplano de plantas de milho, arroz, sorgo e cana-de-açúcar, podendo também ser encontrado no interior dos tecidos de cana-de-açúcar e capim elefante (BALDANI et al. 1996; REIS JUNIOR et al., 2000). A espécie *H. seropedicae* foi a primeira espécie descrita por BALDANI et al. (1986), seguida pela espécie *H. rubrisulbalbicans* (BALDANI et al., 1996), que é reconhecida também como patógeno de alguns genótipos de cana-de-açúcar, visto que causa estrias mosqueada nas folhas, sintomas que provoca a redução da área foliar e conseqüentemente a taxa fotossintética das plantas (OLIVARES et al., 1997). Ambas as espécies (*H. seropedicae*, *H. rubrisulbalbicans*) são produtoras eficientes de compostos indólicos (STRADA et al., 2012). Além dessas espécies, várias outras foram descritas posteriormente e apresentaram potencial para agricultura (REIS, 2016).

Estirpes do gênero de *Herbaspirillum* são eficientes em colonizar as superfícies externas das plantas (raízes, colmos e folhas) e também os interiores, podendo ser encontradas nos espaços intercelulares (OLIVARES et al, 1996). O gênero *Herbaspirillum* atualmente possui 17 espécies descritas isoladas de plantas e de vários outros ambientes, como água, solo e sedimentos (*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: LPSN, 2017*).

A espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus*, também usada na mistura bacteriana do inoculante para cana-de-açúcar, foi descrita por Cavalcante & Döbereiner (1988) e é considerada endofítica obrigatória por possuir baixa sobrevivência no solo, capaz de crescer

em meio ácido e na presença de alta concentração de açúcar (REIS & TEIXEIRA, 2015). Esta espécie tem alta capacidade de solubilizar fosfato de cálcio (CRESPO et al., 2011), compostos de zinco (ZnO, ZnCO₃ e Zn₃(PO₄)₂) (SARAVANAN et al., 2007) e exercer biocontrole "*in vitro*" contra fungos fitopatogênicos (ARECENBIA et al., 2006). A espécie *Burkholderia tropica*, descrita inicialmente por Reis et al. (2004), foi recentemente reclassificada para o novo gênero *Paraburkholderia* por Oren e Garrity (2015), tornando-se *P. tropica*. Também solubiliza fosfatos (BERNABEU et al., 2016) e realiza biocontrole "*in vitro*" de fungos fitopatogênicos (TENORIO – SALGADO et al., 2014).

Atualmente o gênero *Gluconacetobacter* é composto por 24 espécies e o gênero *Paraburkholderia* apresenta 64 espécies descritas (*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*: LPSN, 2017).

De acordo com Olivares et al. (1996), as bactérias que vivem endofiticamente, por colonizarem o interior dos tecidos vegetais, apresentam-se mais protegidas das altas taxas de oxigênio inibitórias para a atividade da enzima nitrogenase, têm acesso a fontes de carbono mais prontamente disponível e ainda livre da competição existente no solo. Fato esse que pode favorecer a sua relação com a planta hospedeira, em especial, a capacidade de realizar FBN. Já as bactérias associativas, por colonizarem preferencialmente a região do solo sobre influência das raízes (rizosfera) e a superfície das raízes (rizoplane), sofrem mais influência dos fatores bióticos e abióticos, sendo, portanto, menos especializadas na FBN, entretanto, podem produzir diferentes compostos promotores de crescimento vegetal a serem utilizados pelas plantas (KENNEDY et al., 2004; CASSÁN et al 2014).

Dessa maneira, a combinação de diferentes gêneros bacterianos capazes de explorar nichos diferentes e com funções complementares e/ou adicionais pode ser empregada na formulação de insumos biológicos. Nesse sentido, um estudo desenvolvido por Oliveira et al. (2002) mostrou que diferentes gêneros de bactérias diazotróficas quando inoculados em cana-de-açúcar podem atuar na promoção de crescimento vegetal de forma isolada e também apresentar efeitos sinérgicos quando em conjunto.

A partir desse estudo, a Embrapa Agrobiologia desenvolveu um inoculante turfoso para cana-de-açúcar, contendo cinco estirpes bacterianas de espécies diferentes: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, estirpe BR11281^T = PAL-5^T (Gd), *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe BR11335 = HRC54 (Hs), *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, estirpe BR11504 = HCC103 (Hr), *Paraburkholderia tropica*, estirpe BR11366^T = PPe 8^T (Pt) e *Nitrospirillum amazonense*, estirpe BR11145 = CBAMc (Na), como mostrado na Tabela 1.

Esse inoculante tem demonstrado, ao longo de vários estudos em condições de casa de vegetação e campo, efeito promotor de crescimento na cultura, através do acúmulo de biomassa e nutrientes, como fósforo (P), potássio (K) e N, algumas vezes não relacionados à FBN (SCHULTZ et al., 2012; 2014; PEREIRA et al., 2013). Além disso, pesquisa relacionadas a veículos alternativos de inoculação estão sendo testados em estudos paralelos (da SILVA et al., 2012), uma vez que a turfa utilizada atualmente como veículo apresenta uma grande limitação do ponto de vista ambiental.

Essas bactérias que compõem o inoculante em estudo são bastante relatadas em associação com cana-de-açúcar e suas características descritas *in vitro* faz acreditar que sejam as principais responsáveis pelas altas taxas de FBN e crescimento da cultura (BALDANI et al., 1997; BODDEY et al., 2001). Entretanto, ressalta-se que a promoção de crescimento das plantas por diazotróficas vai além da FBN, pois outros mecanismos como produção de substâncias reguladoras de crescimento vegetal, solubilização de fosfatos, produção de sideróforos, melhoria na absorção e assimilação de nutrientes e biocontrole de doenças também podem ser via de promoção de crescimento de plantas por essas bactérias, pelos quais também são reconhecidas como bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) (SPAEPEN et al., 2009; GLICK et al., 2012; BULCARELLI et al., 2013; CASSÁN et al.,

2014). Alguns desses mecanismos já foram identificados *in vitro* como controle biológico (ARECENBIA et al., 2006; TENORIO – SALGADO et al., 2014), solubilização de fosfato (CRESPO et al., 2011; BERNABEU et al., 2016) e produção de compostos indólicos (RODRIGUES et al., 2016).

Embora BPCP sejam capazes de estabelecer associação e promover efeitos benéficos a uma grande diversidade de espécies vegetais (AHEMAD e KIBRET et al., 2014), respostas à inoculação são bastante variáveis, dependente da interação planta-bactéria. Os fatores, estirpe bacteriana, espécie e/ou genótipo vegetal e ambiente são os reguladores dessa interação (MOUTIA et al., 2010; VARGAS et al., 2012; PITTOL et al., 2015).

A quantidade de N disponível às plantas é um dos principais fatores ambientais que limita a ação de bactérias diazotróficas no desenvolvimento das plantas. Já foi verificado que a quantidade de N no solo influencia a associação dessas bactérias com a cana-de-açúcar (MEDEIROS et al., 2006), visto que maiores respostas à inoculação de bactérias diazotróficas ocorrem em ambientes com restrição de nitrogênio e/ou na presença de até 50% da dose recomendada para a cultura (SUMAN et al., 2013; GÍRIO et al., 2015). Portanto, solos de baixa fertilidade natural podem ser potencialmente mais favoráveis à aplicação destas bactérias e ao efeito na contribuição da FBN (OLIVEIRA et al., 2003; 2006). Além disso, genótipos recomendados para ambiente de restrição de fertilidade de solo podem apresentar melhores efeitos da inoculação (PEREIRA et al., 2013).

Segundo Bashan & Bashan (2010), a promoção de crescimento das plantas por BPCV pode ocorrer por meio de um conjunto ou de uma cascata de mecanismos (produção de auxinas, sideróforos, solubilização de fosfatos, controle biológico, indução de resistência, entre outros), na qual um mecanismo estimula o outro, ou através de mecanismos independentes que são ativados em condições ambientais específicas, como seca, salinidade, toxicidade e outras condições adversas, requeridas pela espécie vegetal.

Já Ahemad & Kibret. (2014) acreditam que os efeitos das bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento e rendimento das culturas são considerados aditivos, acontecem através de múltiplos mecanismos, os quais não funcionam de forma independente.

Apesar dos inúmeros mecanismos citados, os comumente relatados estão relacionados à produção de substâncias reguladoras de crescimento vegetal, à solubilização de fosfatos, à produção de sideróforos, ao controle biológico de fitopatógenos e à FBN (GLICK et al., 2012; BULCARELLI et al., 2013), mecanismos que já foram identificados nas espécies bacterianas (Tabela 1) que compõe o inoculante múltiplo produzido na Embrapa Agrobiologia e recomendado para cana-de-açúcar.

Tabela 1. Característica das espécies bacterianas presentes no inoculante recomendado para cana-de-açúcar quanto às características de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV).

Espécie bacteriana	Características de BPCV		Referência
<i>Nitrospirillum amazonense</i>	Produção de fitohormônios	Auxina, 3,34 - 19,27 µg/ml	Radwan et al. (2002) Reis-Junior et al. (2004)
	FBN	NH ₄ ⁺ , 4,5 - 188,9 nmol C ₂ H ₄ /mg protein/h	Rodrigues et al. (2008)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Produção de fitohormônios	Auxina, 4,85 - 24,74 µg/ml	Radwan et al. (2002) Estrada et al. (2013)
	FBN	NH ₄ ⁺ , 159 - 600 nmol C ₂ H ₄ /mg protein/h	Estrada et al. (2013) Alves et al. (2014)
	Solubilização de nutrientes	Fósforo, 15-17 mg P L ⁻¹ , não forma halo de solubilização em meio sólido	Estrada et al. (2013)
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	Produção de fitohormônios	Auxina, 7,53 - 28,6 µg/ml	Radwan et al. (2002)
	FBN	NH ₄ ⁺ , 100 - 800 nmol C ₂ H ₄ /mg protein/h	Alves et al. (2014)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Produção de fitohormônios	Auxina, 11,5 - 96,5 µg/ml Giberelina, 0,26 µg/ml	Rodrigues et al. (2016) Rao e Salvagi (2017)
	FBN	NH ₄ ⁺ , 416,93 nmol C ₂ H ₄ /mg protein/h	Anitha e thangaraju (2010)
	Controle biológico	Inibição de <i>Xanthomonas albilineans</i> , <i>R. bataticola</i> e <i>E. mayds</i>	Arecenia et al. (2006) Rao e Salvagi. (2017)
	Solubilização de nutrientes	Fósforo, 239 mg P L ⁻¹ , 20-31 mm de zona de solubilização	Estrada et al. (2012)
		Zinco, zona de solubilização 15-38 mm.	Madhaiyan et al. (2004) Saravan et al. (2007)
		Hidroxiato, catecolatos e salicilatos	Rao e Salvagi (2017)
	Produção de sideróforos	Hidroxiato, catecolatos e salicilatos	Logeshwaran et al. (2009)

Continua...

Continuação da **Tabela 1.**

Espécie bacteriana	Características de BPCV		Referência
<i>Paraburkholderia tropica</i>	Produção de fitohormônios	Auxina, 0,03 - 19,3 µg/ml	González et al. (2001)
	FBN	NH ₄ ⁺ , 8 - 500 nmol C ₂ H ₄ /mg protein/h	Alves et al. (2016)
	Controle biológico	Inibição de <i>F. culmorum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>S. rolfsii</i> e <i>C. gloesporioides</i>	Tenorio-Salgado et al. (2014)
	Solubilização de nutrientes	Fósforo, halo de 7,1 a 9,7 mm de solubilização, até 50 mg P L ⁻¹	Caballero et al. (2011) Bernabeu et al (2016)
	Produção de sideróforos	Hidroamato	Caballero et al. (2007)

2.3.1. Produção de auxinas *in vitro*

A produção de substâncias reguladoras de crescimento vegetal faz parte do metabolismo da maioria dos gêneros bacterianos. Já foi relatado que aproximadamente 80% das espécies bacterianas rizosféricas possuem competência para produção de substâncias promotoras de crescimento de plantas (KHALID et al., 2004).

BPCP são capazes de produzir diversas substâncias reguladoras de crescimento vegetal, como: auxinas, giberelinas, citocininas e etileno. Dentre estas substâncias a mais relatada e de maior efeito no crescimento das plantas associadas às bactérias são as auxinas (SPAEPEN et al., 2009; CASSAN et al., 2014).

As auxinas são substâncias que em pequenas concentrações provocam grandes efeitos no crescimento das plantas, possuem mais de uma via de síntese, além de várias estruturas químicas identificadas. Dentre as auxinas, a comumente descrita e encontrada em maiores concentrações no metabolismo bacteriano é o ácido indol-3-acético (AIA) (GLICK, 2012).

O AIA produzido pelas bactérias pode estar envolvido em diversos processos relacionados à interação com a planta hospedeira, como, sinalização molecular, fitoestimulação e promoção de crescimento vegetal (SPAEPEN et al., 2007).

De acordo com Spaepen e Vanderleyden. (2011), o AIA produzido pelas bactérias pode aumentar “pool” de auxinas no interior das plantas e se relacionar a respostas fisiológicas nos tecidos vegetais e ainda ser exsudado pelas raízes. Desta forma, ele pode servir de nutriente e sinal molecular a comunidade bacteriana presente. A síntese de hormônios, como o AIA, estimulam principalmente o desenvolvimento do sistema radicular, contribuindo para absorção de água e nutrientes pelas plantas e conseqüentemente maior acúmulo de biomassa (SPAEPEN et al., 2009).

Conforme Cassán et al., (2014), o gênero *Azospirillum* pode produzir até 50µL mL⁻¹ de AIA em condições *in vitro*. Spaepen et al. (2014), observaram que em condições *in vivo* a produção de auxinas é um dos principais mecanismos envolvidos no crescimento radicular das plantas por *Azospirillum brasiliense* em que a inoculação de um mutante defeituoso para produção de auxinas não apresentou efeito no desenvolvimento das raízes das plântulas de *Arabidopsis thaliana*. Observaram, ainda, que a auxina produzida pela bactéria tem efeito semelhante à aplicação de AIA sintético.

2.3.2. Solubilização de fosfato de cálcio *in vitro*

O fósforo (P) é um elemento essencial ao desenvolvimento dos vegetais e o segundo nutriente mais limitante ao crescimento das culturas. Isso se deve especialmente pelas baixas concentrações nos solos tropicais, principalmente, devido à sua origem e mobilidade (SILVA FILHO et al., 2002). Este nutriente essencial às plantas pode ser encontrado em sedimentos marinhos, solos terrestres, fosfato inorgânico dissolvido no oceano e rochas com minerais como apatita. Através do intemperismo o P contido nesses minerais foi incorporado na matéria orgânica dos solos e sedimentos ou precipitados como minerais pouco solúveis de cálcio (Ca), ferro (Fe) e alumínio (Al) (STEVENSON e COLE, 1999). A liberação de P na solução do solo pode ser controlada pela taxa de mineralização da matéria orgânica e pela atividade microbiana. BPCP podem realizar a solubilização de fósforo inorgânico e orgânico em associação com a rizosfera de diferentes espécies de plantas.

O produto do processo metabólico dessas bactérias é efetivo na solubilização e mineralização do P a partir de formas de fósforo inorgânica. A produção de ácido glucônico através da oxidação da glicose pela ação da enzima PQQ-GDH (EC 1.1.5.2) é responsável pela solubilização de fosfato em *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Paraburkholderia tropica* (CRESPO et al., 2011; BERNABEU et al., 2016)

Vários microrganismos estão envolvidos nesses processos, mas são as bactérias se destacam com o maior potencial para obtenção de fosfatos solúveis, visto que cerca de 40% das bactérias promotoras de crescimento vegetal são capazes de solubilizar P (RICHARDSON et al., 2001).

2.3.3. Produção de sideróforo e controle biológico

O ferro é elemento essencial a todos os organismos e não se encontra prontamente disponível nos ambientes, no solo este se apresenta de forma abundante, entretanto, indisponível devido à baixa disponibilidade dos óxidos de ferro (III) (RAJKUMAR et al., 2010).

Microrganismos têm desenvolvido várias estratégias para adquirir e ao mesmo tempo se proteger dos efeitos tóxicos potenciais do ferro no ambiente. Sendo que a estratégia mais eficaz é a produção de sideróforo, que podem ser definidos como ligantes específicos do Fe (III) com função de “sequestrar” e transportar o Fe (III), caracterizados como moléculas de baixo peso molecular, elaborados e excretados por microrganismos que crescem em ambientes sobre baixa concentração de ferro (BENITE et al., 2002).

Segundo Rajkumar et al., (2010), BPCP são capazes de produzir e excretar sideróforos como estratégia de controle populacional na rizosfera e desta forma inibir a presença de patógenos pela indisponibilidade de ferro no ambiente, criando uma zona de depleção e competição pelo nutriente, entretanto, este complexo ferro-sideróforo pode ser absorvido pelas plantas e depois reciclados ou destruídos.

Nove isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolados de cana-de-açúcar e a estirpe *G. diazotrophicus* PAL 5 foram capazes de produzir algum tipo de sideróforo em meio de cultivo *in vitro*, sendo que o tipo mais comumente produzido foi o hidroxamato. Os tipos de sideróforos são distintos em relação aos grupos químicos usados para quelatar o ferro, os hidroxamatos são formados pela quelação do Fe⁺³ em átomos de nitrogênio de anéis de tiazolina e oxazolina, enquanto os catecolatos complexam o Fe através da ligação a grupos hidroxílicos adjacentes de anéis de catecol (LOGESHWARAN et al., 2009). De acordo com BENITE et al. (2002), existe uma grande diversidade de compostos que complexa o ferro e que são produzidos e excretados por microrganismo. No entanto, praticamente todos os quelantes identificados até o momento pertencentes à função sideróforos contêm pelo menos um ácido hidroxâmico, um catecol e/ou um ácido α -hidroxicarboxílico como sítios ligantes.

As plantas possuem proteínas receptoras específicas na membrana celular que são capazes de reconhecer e absorver este complexo Fe-sideróforo (FARALDO-GÓMES, 2007), portanto, a produção de sideróforos pode ser uma forma de biocontrole de fitopatógenos e nutrição das plantas por bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV).

Além da competição por ferro, outros mecanismos de controle biológico de fitopatógenos por bactérias são relatados na literatura. BPCV pode agir de forma antagônica aos microrganismos fitopatogênicos através da produção de antibióticos, diversos compostos voláteis produzidos por bactérias apresentam essa característica. Bactérias podem também interromper ou confundir a sinalização de bactérias fitopatogênicas pela degradação das moléculas de acil-homoserina lactonas (AHLs), molécula responsável pela “comunicação” bacteriana na formação do quorum relacionado a patogenicidade em bactérias que causam doenças em plantas. BPCV pode promover indução de resistência sistêmica na planta hospedeira, através da indução de múltiplos mecanismos, e, ainda pode ocupar o nicho das bactérias fitopatogênicas e competir por nutriente interferindo no desenvolvimento, atividade e sobrevivência dessas bactérias (LUGTENBERG e KAMILOVA 2009).

Tenorio-Salgado et al. (2014) identificaram 18 compostos voláteis produzidos por isolados de *Paburkholderia tropica* e em laboratório verificaram que esses compostos

inibiram o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotium rolfsi*, além disso, a estipes de *P. tropica* produziram diversos sideróforos no meio a partir de diferentes fontes de carbono.

A inoculação da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* na presença da bactéria patogênica *Xanthomonas albilineans* induziu resistência em plantas de cana-de-açúcar, verificado através da maior expressão de genes relacionados à síntese de etileno, auxinas e glucanases. Etileno é capaz de induzir a transcrição de diferentes genes que codifica celulases, Quitinases, glucanases e peroxidases, enzimas relacionadas com patogênese (ARENCEBIA et al., 2006).

2.3.4. Metabolismo de nitrogênio e FBN

O nitrogênio (N) é considerado um elemento essencial às plantas, pois faz parte da constituição das moléculas mais importantes nos vegetais, tais como ATP, NAPH, NADH, clorofila, proteínas e enzimas (ALCANTARA et al., 2009). Devido a sua importância e dinâmica no solo, o N é reconhecido como um dos principais fatores limitante ao crescimento e a produtividade das culturas (MILLER & CRAMER, 2004).

A maior fonte de N não se encontra prontamente disponível para os vegetais, uma vez que está presente na atmosfera (78%) na forma de N_2 . Essa molécula apresenta uma forma bastante estável, não passível de reações químicas em condições naturais. No entanto, a disponibilidade de N aos organismos é dependente da quebra dessa molécula em formas mais simples como amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) que são facilmente assimiláveis pelas plantas. Esse processo é denominado fixação de nitrogênio e pode ocorrer através da produção de fertilizantes (indústria) ou de forma natural, por descargas elétricas (8%), reações fotoquímicas (2%) e fixação biológica de nitrogênio (FBN) realizada por bactérias ou algas azuis (90%) (TAIZ e ZEIGER, 2013).

As principais formas de aquisição de nitrogênio inorgânico pelas plantas são NO_3^- e NH_4^+ . A absorção desses íons ocorre através do transporte pela membrana plasmática das células da epiderme e do córtex das raízes por meio de transportadores do tipo uniporte e simporte respectivamente, ambos os processos dependentes de energia. Nas células radiculares o NO_3^- pode ser reduzido a NO_2^- (citossol) e posteriormente a NH_4^+ (plastídio) através da ação sequencial das enzimas nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NRi), pode ainda ser acumulado no vacúolo ou exportado para as folhas, onde poderá ser assimilado ou armazenado. Já o NH_4^+ absorvido ou gerado a partir da redução do NO_3^- é imediatamente incorporado nos esqueletos de carbono (C) pelas enzimas glutamina sintetase (GS, E.C. 6.3.1.2) e glutamato sintase (GOGAT, glutamina 2-oxoglutarato aminotransferase) (SOUZA e FERNANDES, 2006).

As plantas podem apresentar preferências na absorção entre NO_3^- e NH_4^+ , de forma geral, em situação de igualdade entre as duas fontes as plantas absorvem preferencialmente NH_4^+ , esse fato pode estar relacionado principalmente ao menor gasto energético para assimilação do amônio em comparação ao nitrato, em razão do primeiro não precisar ser reduzido para sua incorporação em aminoácidos (BREDEMEIER & MUNDSTOCK, 2000). Já foi verificado que cana-de-açúcar absorve preferencialmente NH_4^+ a NO_3^- em igualdade de condições (ROBINSON et al., 2011).

As espécies vegetais podem diferir entre o local de assimilação de N, na maioria o NO_3^- absorvido é transportado via xilema para as folhas onde é assimilado, porém em algumas espécies a assimilação de NO_3^- ocorre no próprio sistema radicular (OAKS, 1992). A baixa quantidade de NO_3^- em tecidos foliares de cana-de-açúcar indica que a folha é o local preferencial de assimilação de N na cultura, uma vez que a baixa concentração pode estar

relacionada ao fato desse ser rapidamente metabolizado quando chegar ao tecido (ISHIKAWA et al., 2009).

A absorção de N é regulada pela presença e afinidade de carregadores específicos ao nitrato e amônio e pela quantidade de N no solo. O íon de nitrogênio absorvido pelas plantas (NO_3^- ou NH_4^+) depende das quantidades relativas de cada uma das formas no solo, da acessibilidade das raízes a essas diferentes formas e das preferências da planta. Além disso, é variável em relação ao ciclo da planta. De forma geral, ocorre um aumento progressivo durante o crescimento vegetativo atingindo o máximo na fase reprodutiva e redução na fase de maturação, isso relacionado ao balanço entre os processos de absorção, assimilação e remobilização (BREDEMEIER & MUNDSTOCK, 2000; O'BRIEN et al., 2016)

Em cana-de-açúcar também já foi observado que os maiores valores de atividade do nitrato redutase (NR) ocorrem em plantas jovens e os menores valores são obtidos na fase de maturação, podendo reduzir em até 80% nesse período. Isso porque está relacionado à menor disponibilidade de NO_3^- pela redução na absorção nessa fase de desenvolvimento da cultura (SANTOS et al., 2014).

O processo de absorção de NO_3^- e NH_4^+ , redução de NO_3^- e incorporação do NH_4^+ em esqueleto de carbono determina a quantidade de N assimilado pelas plantas e depende dentre muitos fatores da disponibilidade de energia, poder redutor, esqueleto de carbono e da atividade das enzimas envolvidas no ciclo do N (TISCHNER, 2000; BREDEMEIER E MUNDSTOCK, 2000; SOUZA e FERNADES, 2006).

A enzima nitrato redutase (NR) é a primeira enzima envolvida no processo de assimilação de N, responsável pela redução do NO_3^- em NO_2^- no citoplasma de folhas e raízes, para muitos autores a NR é enzima chave na regulação da assimilação de NO_3^- pelas plantas, pois tanto nas folhas como nas raízes o NO_3^- só pode ser assimilado após a redução a NH_4^+ (TISCHNER, 2000). A enzima glutamina sintetase (GS) apresenta duas isoformas a GS1 presente no citossol e a GS2 no cloroplasto e outros plastídios. Essa enzima é responsável pela incorporação do NH_4^+ (que foi diretamente absorvido, oriundo da fotorrespiração ou da redução do NO_3^-) no esqueleto de carbono (glutamato) utilizando ATP como fonte de energia e Mg_2^+ , Mn_2^+ ou Co_2^+ como cofator (SOUZA & FERNANDES, 2006).

Essas enzimas são reguladas por diversos fatores, tais como, concentração de NO_3^- e NH_4^+ (substratos), açúcares/energia (metabolismo de C e fotossíntese), teores de glutamina (metabolismo de N), luz, espécie e genótipo vegetal, fase de crescimento da planta, disponibilidade de nutrientes e condições de estresse ambiental (SAHULKA & LISÁ, 1978; OASK et al., 1990; LYUTOVA & KAMENTSEVA, 2001, MILLER & CRAMER, 2004; SOUZA & FERNANDES, 2006) e ainda pelo transporte de aminoácidos das folhas para as raízes (SAHULKA, 1972). Há evidências que o metabolismo de N ainda pode ser afetado pela inoculação de bactérias fixadoras de N, uma vez que contribui diretamente e indiretamente com o conteúdo de N nas plantas (CARVALHO et al., 2014). A forma direta ocorre através da FBN. Um modelo de FBN para bactérias diazotróficas em gramíneas do tipo C4 foi demonstrado por Pankiewicz et al. (2015), evidenciando a transferência de N a gramínea *Setaria viridis* após a inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio através do uso de marcador ^{13}N . A forma indireta pode se relacionar a diversos fatores que afete o desenvolvimento e absorção de nutrientes pelas plantas, como a produção de auxinas que pode aumentar e/ou modificar o sistema radicular (CASSÁN et al., 2014).

A fixação biológica de nitrogênio é considerada, após a fotossíntese, o mais importante processo biológico do planeta e tem grande relevância para o desenvolvimento sustentável da agricultura (HERRIDGE et al., 2008). A FBN é realizada por microrganismos procariotos, os quais são capazes de romper a ligação tripla que unem as moléculas de N_2 atmosférico possibilitando a redução a amônio (NH_4^+) e assim utilização desta fonte de N pelos organismos (BULGARELLI et al., 2013). Este processo é de suma importância no ciclo

deste elemento e na sustentabilidade produtiva de muitas espécies vegetais. De acordo com Jez et al. (2016), bactérias fixadoras de nitrogênio pode contribuir para o fornecimento de alimento, fibra, combustível e matéria-prima a menor custo e menor impacto ambiental, uma vez que nitrogênio é o principal elemento limitante ao desenvolvimento vegetal, e bactérias diazotróficas pode fornece-lo aos vegetais através da FBN (PANKIEVICZ et al., 2015), além de promover o crescimento vegetal por outros mecanismos, como solubilização de fosfatos, e produção de auxinas (SPAEPEN et al., 2009), e assim contribuir para uma agricultura sustentável.

Estudos voltados para formulações de bioinoculantes e sua aplicação em plantas de interesse agrícola, como a cana-de-açúcar pode reduzir custos e o impacto ambiental da produção e transporte de N-fertilizantes empregado na cultura. Entretanto, para que haja maiores efeitos desses inoculantes, em especial para FBN, faz se necessário o emprego de pesquisas relacionadas a especificidade dos microrganismos com o genótipo alvo (JAMES & BALDANI, 2012). Estudos realizados com cana-de-açúcar micro propagada mostraram que a inoculação de diazotróficas pode contribuir com até 30% do N total das plantas (OLIVEIRA et al., 2003) e a resposta da cultura em condições de campo é dependente de características de solo, como fertilidade, e do genótipo vegetal (OLIVEIRA et al., 2006).

Maior resposta à aplicação de bactérias em cana-de-açúcar é encontrada quando se utiliza até 50% da dose de N-fertilizante recomendada para cultura (GÍRIO et al., 2015; PEDULA et al., 2016), evidenciando controle exercido pelo N na interação planta-bactéria.

O nitrogênio pode agir como um sinal chave regulando e integrando vários processos metabólicos nas plantas durante a associação com bactérias diazotróficas. Essas bactérias podem fornecer amônio diretamente para as plantas através da FBN ou melhorar a absorção de outras formas de N, principalmente, pela ação hormonal que age modificando o desenvolvimento do sistema radicular e, conseqüentemente, a exploração do ambiente. Assim, como os sítios de absorção de nutrientes, resultando em um efeito importante na melhoria da eficiência no uso de nitrogênio (EUN) pelas plantas. Entretanto, níveis elevados de N nas plantas também podem ter um efeito negativo na colonização e FBN pelas bactérias (CARVALHO et al., 2014).

Medeiros et al. (2006) mostraram que a aplicação de N-fertilizante reduziu a população de *G diazotrophicus* em plantas de cana-de-açúcar em comparação aos que não receberam N, além disso, a redução da população foi maior quando foi fornecido nitrato de cálcio em relação a sulfato de amônio, e esse efeito da aplicação do N também reduziu a atividade da nitrogenase nas raízes. Já Suman et al. (2008) verificaram que a aplicação de 75kg ha⁻¹ de N proporcionou maior população de *G diazotrophicus* associada as plantas do que quando não foi aplicado N ou quando se aplicou a dose 150 kg ha⁻¹, resultado diferente ocorreu com a espécie *H. seropedicae* que foi aumentada na presença da dose 150 kg ha⁻¹. Em canas australianas a população de bactérias diazotróficas nas raízes não foi afetada pela dose de N aplicada no solo (YEOH et al., 2016). Esses estudos mostram que há uma complexa interação planta-bactéria e que há muitos outros fatores agindo e regulando essa associação e que o N é apenas um deles. Contudo, ainda não se conhece como o N aplicado pode afetar a funcionalidade dessas bactérias, uma vez que modificará a fisiologia vegetal da planta hospedeira.

Quando se refere como bactéria contribui para o acúmulo de N em cana-de-açúcar, os trabalhos comumente relatam sobre a FBN, embora se saiba que outros mecanismos podem estar envolvidos, uma vez que trabalhos mostram acúmulo de biomassa e N na cultura pela inoculação de diazotróficas sem ocorrência de aumento da taxa de FBN.

Estudos desenvolvidos por Schultz et al. (2012), em condições de campo, utilizando as variedades RB867515 e RB72454 de cana-de-açúcar inoculadas com inoculante misto de bactérias diazotróficas desenvolvido pela Embrapa Agrobiologia e cultivada em solo do tipo

Cambissolo Flúvico eutrófico, verificaram que não houve contribuição da FBN advinda da inoculação para a cultura, no entanto, observaram mais de 50% de incremento na produtividade de colmo e em aproximadamente 76% no conteúdo de N na variedade RB867515. Em experimentos posteriores realizados em solos do tipo Planossolo Háplico distrófico e Argissolo Vermelho eutrófico, não foi verificado efeitos da inoculação na mesma variedade, entretanto os autores observaram superioridade dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ no tratamento inoculado em comparação com o controle não inoculado e associaram ao aproveitamento do N disponível no solo através da inoculação (SCHULTZ et al. 2016).

Os resultados encontrados por Schultz et al. (2012; 2016) podem se relacionar com o aumento e/ou modificação do sistema radicular da cultura proporcionado pela inoculação dessas bactérias (CHAVES et al., 2015; GÍRIO et al., 2015), que por sua vez pode alterar a absorção e/ou assimilação desse nutriente. Estudo realizado por Suman et al. (2005) com cana-de-açúcar inoculadas com *G. diazotrophicus* na presença de três doses de N (N0, N75 e N150 kg ha⁻¹) mostraram que a inoculação aumentou a absorção de N em média 27,38 a 96,78% em comparação com o controle, entretanto, a resposta variou em função das taxas de aplicação de N, sendo os maiores valores observados quando não foi aplicado N (N0) e os menores na presença da dose 150 kg ha⁻¹.

Em uma revisão de literatura Kraiser et al. (2011) relataram que a maior aquisição de nutrientes observada em resposta à inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal não pode ser explicada apenas pela ramificação e ampliação da área de superfície radicular, mas também pelo aumento da atividade dos sistemas de absorção de nutrientes. Essa maior absorção que resulta em aumento no conteúdo de N pode afetar a assimilação desse nutriente, porém trabalhos que demonstre esse efeito não estão disponíveis na literatura, em especial para cana-de-açúcar, e são importantes para melhor compreensão de como os mecanismos da interação planta-bactéria pode influenciar o metabolismo de N, e como o estado nutricional da planta (N endógeno) pode atuar regulando essa interação.

Trabalhos pioneiros realizados por Nogueira et al (2001; 2005) através da análise do perfil de expressão gênica de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas mostraram que genes envolvidos no metabolismo e assimilação de N são regulados durante a associação com essas bactérias. Cinco genes membros da família glutamina sintetase (GS) foram identificados em cana-de-açúcar, sendo três citossólico (GS1). Após as análises de expressão, observou-se que esses genes podem ser importantes para a assimilação de N na cultura, tanto para N fornecido pela FBN, como o fornecido pelo solo e remobilização. Além disso, genótipos de cana-de-açúcar podem apresentar diferenças na atividade das enzimas envolvidas no metabolismo de N (NR e GS), o que pode indicar e auxiliar na seleção de genótipos mais eficiente a aplicação de bactérias diazotróficas (DONATO et al 2004; MARCOS et al., 2016).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Quatro ensaios experimentais foram desenvolvidos em casa de vegetação automatizada com controle de temperatura e umidade da Embrapa Agrobiologia, localizada no km 7 da rodovia BR 465, no município de Seropédica-RJ (22°44'38'' S e 43°42'28'' W e 26 m de altitude) a partir de fragmentos de colmos (minis toletes) de quatro genótipos de cana-de-açúcar, previamente tratados através de termoterapia e solução fungicida, combinados com a inoculação de cinco estirpes de bactérias diazotróficas, aplicadas de forma isolada e em mistura. Cada ensaio foi conduzido em três fases sequenciais de cultivo: brotação em caixas com areia e vermiculita estéril, tubetes com substrato Multiplant® não estéril e sistema hidropônico com solução nutritiva com duas doses de N, alta (3,0 mM, equivalente a 84,4 kg de N ha⁻¹) e baixa (0,3mM, equivalente a 8,4 kg de N ha⁻¹). Um esquema geral da composição dos ensaios experimentais é demonstrado na figura 1 e descrito de forma detalhada na sequência.

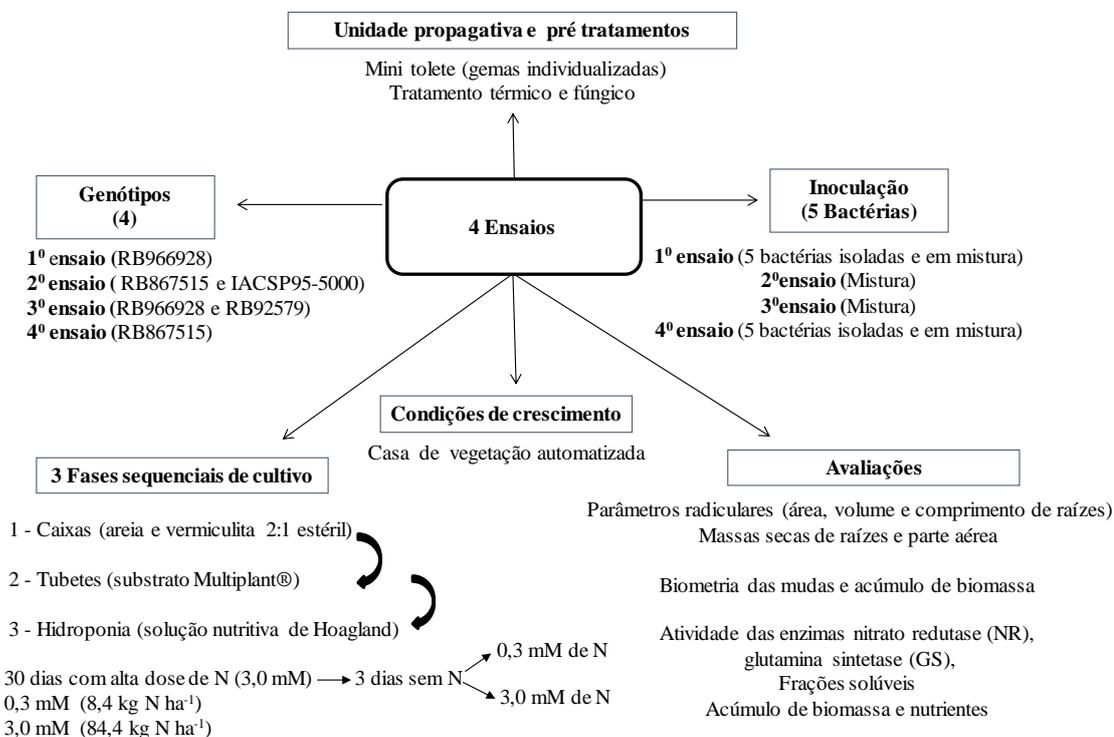


Figura 1. Esquema demonstrativo da composição e sequência dos ensaios experimentais.

No primeiro experimento, avaliou-se a inoculação de cinco estirpes de bactérias diazotróficas que compõem o inoculante misto destinado a cultura da cana-de-açúcar, aplicadas de forma isolada e uma mistura contendo as cinco estirpes na variedade RB966928, o experimento foi conduzido no período de março a maio do ano de 2014.

No segundo e terceiro experimento, foi avaliado a aplicação do inoculante misto (mistura das cinco estirpes), sendo que no primeiro foram utilizadas as variedades RB867515 e IACSP95-5000 e no terceiro as variedades RB966928 e RB92579.

O segundo experimento foi conduzido no período de setembro a dezembro do ano de 2014 e o terceiro, de fevereiro a maio de 2015. No quarto experimento, foi usada a variedade

RB867515 inoculada com as cinco estirpes que compõem o inoculante de forma isolada e um tratamento contendo a mistura das cinco e o ensaio conduzido durante o período de setembro a dezembro de 2015.

3.1. Tratamentos e Delineamentos Experimentais

Em cada fase, adotou-se o delineamento adequado de acordo com a homogeneidade das condições ambientais.

Fase de brotação: Nessa fase, foi usado o delineamento em blocos casualizados com 4 repetições, cada repetição representada por uma caixa composta por 15 gemas, sendo as 5 melhores plântulas de cada caixa destinada às avaliações e as demais selecionadas e transferidas para tubetes. As mudas do primeiro e quarto experimento não foram avaliadas nessa fase, sendo as plântulas apenas destinadas para as fases posteriores.

No primeiro e quarto experimento, adotou-se 7 tratamentos, sendo 5 estirpes bacterianas aplicadas de forma isolada, um tratamento com a mistura das cinco estirpes e um tratamento controle. No primeiro utilizou-se a variedade RB966928 e no quarto a variedade RB867515.

No segundo e terceiro experimento, adotou-se esquema fatorial (2 variedades x 2 inoculações), sendo as variedades RB867515 e IACSP95-5000 utilizadas no segundo experimento e RB966928 e RB92579 no terceiro. Os tratamentos de inoculação consistiram na mistura das cinco estirpes bacterianas e um tratamento controle.

Fase de tubetes: Nessa etapa, foi usado o delineamento inteiramente ao acaso com 10 repetições por tratamento no primeiro ensaio e 20 repetições nos demais, sendo as 4 melhores repetições destinadas às análises de promoção de crescimento no primeiro experimento, 6 repetições no segundo, e 5 repetições no terceiro e no quarto ensaio, as mudas restantes foram transferidas para o sistema hidropônico.

Fase de sistema hidropônico: Nessa fase, todos os experimentos foram dispostos em blocos casualizados. No primeiro experimento em que se avaliou a variedade RB966928 foi usado 5 tratamentos de inoculação, sendo as quatro estirpes que apresentaram melhores resultados em tubetes aplicadas isoladamente, a mistura das cinco estirpes e um tratamento controle com 4 repetições. No quarto experimento, foi usado as 5 estirpes, a mistura e controle e duas doses de nitrogênio de acordo com esquema fatorial (7x2) também com 4 repetições. No segundo e terceiro experimento, duas variedades foram combinadas com a inoculação da mistura e o tratamento controle e duas doses de nitrogênio de acordo com fatorial (2x2x2): Duas variedades, duas doses de nitrogênio, inoculadas ou não. No segundo experimento adotou-se 6 repetições e no terceiro 5.

3.2. Material Vegetal

Foram avaliadas as variedades de cana-de-açúcar RB867515, IACSP95-5000, RB92579 e RB966928 oriundas do campo experimental da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e da Embrapa Agrobiologia, ambos localizados na BR 465, Km 07, Seropédica, Brasil e ainda da região produtora do estado de São Paulo. Estas variedades possuem características distintas conforme descrito a seguir:

RB867515: Possui ótima adaptabilidade e estabilidade de produção em solos de baixa fertilidade natural, teor de sacarose e velocidade de crescimento alto, maturação média, porte

alto, alta densidade de colmo, alta produtividade agrícola e baixo perfilhamento na cana-planta e médio na cana soca (HOFFMANN et al., 2008).

IACSP95-5000: Produção agrícola muito alta, indicada para solos de melhor fertilidade, porte muito ereto, ótima brotação de soqueira, apresenta bom perfilhamento e fechamento de entrelinhas, não apresenta tombamento e ainda apresenta resistência as principais doenças (ferrugens, escaldadura, carvão e mosaico) (IAC, 2012).

RB92579: Apresenta maturação média a tardia; alto teor de sacarose; boa brotação; alto perfilhamento em cana-planta e soca; bom fechamento de entrelinhas; alta produtividade agrícola e não apresenta restrição a ambiente de produção (BARBOSA et al., 2003).

RB966928: Recomendada para ambiente de média a alta produtividade, médio teor de sacarose aliada com a alta produtividade agrícola, excelente brotação e alto perfilhamento em soqueiras e cana-planta, ótimo fechamento de entrelinhas. Maturação precoce a média (DAROS et al., 2010).

3.3. Tratamento Térmico e Fúngico

Colmos de cada variedade foram cortados em minitoletes, contendo gema individualizada (1 gema) e depois tratados termicamente em banho maria imerso em água a 52 °C por 30 minutos, denominado de tratamento térmico curto por Sanguino et al. (2006). Esse tratamento visa à redução de microrganismos fitopatogênicos e também é eficaz para a diminuição da microbiota geral associada aos toletes (REIS et al., 1994).

Após o tratamento térmico os minitoletes foram dispostos em bancadas durante aproximadamente 15 minutos e posteriormente imersos em solução fungicida a base de Methyl N-(2-([1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl] oxymethyl) phenyl)N-methoxy carbamate (Piraclostrobina - 250 g L⁻¹ - Comet®) a 0,1% durante 3 min.

3.4. Inoculação

O inoculante misto utilizado neste estudo é composto pela mistura de cinco bactérias diazotróficas isoladas de cana-de-açúcar (Tabela 2). Para a obtenção do inoculante, as bactérias foram cultivadas em meio de cultura Dyg's (BALDANI et al., 2014) de forma individualizada, sendo 75 mL de meio de cultura Dyg's com população de 10⁹ células mL⁻¹ de cada estirpe misturado em 175 mL de meio de cultivo, totalizando 250 mL de inoculante, ficando a população por volta de 10⁷ células bacterianas mL⁻¹ conforme descrito por REIS et al. (2009). As estirpes crescidas individualmente em meio de cultura foram veiculadas em turfa estéril de forma individualizada, sendo 250 gramas por embalagens, totalizando 1250 gramas do inoculante e no momento da inoculação foram diluídas em água destilada (1:100 ou 1:50 v/v).

Os tratamentos de inoculação consistiram na imersão dos minis toletes no inoculante turfoso diluído contendo as bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) estirpe BR11281T (PAL-5T), *Herbaspirillum seropedicae* (Hs - BR11335 = HRC54), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Hr - BR11504 = HCC103), *Paraburkholderia tropica* (Bt - BR11366T = PPe 8T) e *Nitrospirillum amazonense* (Na - BR11145 = CBAMc) de forma isoladas ou em mistura (Tabela 2) durante 30 minutos. Em todos os tratamentos, foi usada a mesma quantidade de inoculante, para isso, o tratamento mistura consistiu na pesagem de quantidades proporcionais de cada uma das cinco estirpes isoladas e misturadas no momento da inoculação.

Tabela 2. Identificação, local e meio de isolamento das bactérias diazotróficas utilizadas no inoculante misto produzido na Embrapa Agrobiologia para cana-de-açúcar. Adaptado de Oliveira et al. (2003).

Espécie	Estirpe	Origem do isolamento	*Meios de isolamento
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	BR11281 ^T (Gd)	Raiz - <i>Saccharum</i> sp	LGI-P
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	BR11335 (Hs)	Raiz – SP 701143	JNFB
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	BR11504 (Hr)	Colmo – SP 701284	JNFB
<i>Paraburkholderia tropica</i>	BR11366 ^T (Pt)	Gema – SP 711406	JMV
<i>Nitrospirillum amazonense</i>	BR11145 (Na)	Raiz – SP 775181	LGI

* Os meios de isolamento estão descritos em Baldani et al. (2014) e as bactérias estão depositadas na coleção de cultura da Embrapa Agrobiologia.

3.5. Substratos

Na etapa de brotação, foi utilizado substrato composto por areia e vermiculita estéril na proporção de 2:1 v/v respectivamente. O desenvolvimento das mudas em tubetes foi realizado em substrato comercial Multiplant® (Tabela 3). No sistema hidropônico, foi usada solução nutritiva modificada de Hoagland (HOAGLAND, 1954) com os macronutrientes a 50% da força iônica (FI) e micro a 100% FI. Desta maneira, adotou-se as soluções nutritivas 1, baixo suprimento de N (0,25 mM de NO₃⁻ e 0,05 mM NH₄⁺) e solução 2, alto suprimento de N (2,5 mM NO₃⁻ e 0,5 mM de NH₄⁺) conforme a Tabela 4. As plantas receberam durante 30 dias a solução com alto N e depois foram restringidas do nutriente por 72 h, e logo após os tratamentos foram divididos, metade dos vasos foram abastecidos com a solução com alto N (3,0 mM) e a outra metade com a solução contendo 10 vezes menos N (0,3mM).

A cada dois dias, foram realizadas medição e correção do pH da solução nutritiva pelo uso de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,05N e/ou ácido clorídrico (HCl) 0,03 N para manutenção de valores de pH próximo a 6,0.

Tabela 3. Análise química do substrato comercial Multiplant® utilizado no desenvolvimento das mudas de cana-de-açúcar em tubetes.

Ca+	K+	Mg+	P	N
-----g kg ⁻¹ -----				
20,2	2,12	12,2	2,0	6,7

Tabela 4. Solução nutritiva modificada de Hoagland utilizada no crescimento das mudas de cana-de-açúcar com 5 mM NO₃⁻ e 0,5 mM de NH₄⁺ (solução 1) e com 0,25 mM de NO₃⁻ e 0,05 mM NH₄⁺ (solução 2).

Sal, ácido ou base	Nutriente	1	2
		----- mg L ⁻¹ -----	
Nitrato de magnésio	N-NO ₃ ⁻	35,00	3,50
Nitrato de cálcio			

Continua...

Continuação da **Tabela 4.**

Sal, ácido ou base	Nutriente	1	2
		----- mg L ⁻¹ -----	
Sulfato de amônio	N-NH ₄ ⁺	7,00	0,70
Fosfato de potássio dibásico	P	15,50	15,50
Sulfato de potássio	K	117,00	117,00
Fosfato de potássio dibásico			
Sulfato de magnésio	S-SO ₄ ⁻	95,54	124,36
Sulfato de cálcio			
Nitrato de cálcio	Ca	80,00	80,00
Sulfato de cálcio			
Nitrato de magnésio	Mg	24,00	24,00
Sulfato de magnésio			
Ferro EDTA	Fe	2,00	2,00
Ácido bórico	B	0,50	0,50
Sulfato de cobre	Cu	0,02	0,02
Sulfato de manganês	Mn	0,50	0,50
Sulfato de zinco	Zn	0,05	0,05
Molibdato de sódio anidro	Mo	0,01	0,01

3.6. Condução dos Experimentos

Cada experimento foi dividido em três etapas: brotação e desenvolvimento inicial de mudas em caixas, desenvolvimento das mudas em tubetes e desenvolvimento das mudas em sistema hidropônico. A etapa de brotação consistiu no acompanhamento da germinação dos minis toletes (Figura 2 a) que foram dispostos em caixas plásticas contendo 15 kg de substrato estéril areia e vermiculita (2:1 v.v), conforme as Figuras 2a e 2b, e teve duração de 10 a 20 dias. Na segunda etapa foi acompanhado o desenvolvimento das mudas que foram transplantadas para tubetes de 180 cm³ (Figura 2c) preenchidos com substrato comercial Multiplant®.

Nos tubetes as mudas permaneceram de 20 a 30 dias, tempo necessário para o desenvolvimento do sistema radicular secundário, que é dependente de condições ambientais e genóticas dentre outros fatores. Após esse período foram transferidas para o sistema hidropônico.

O sistema hidropônico consistiu na última etapa de crescimento das plantas e foi confeccionado a partir de vaso plásticos de 7,5 dm³ sendo preenchido com 5,5 dm³ de solução nutritiva (Figura 2d) e aerado constantemente. A solução nutritiva foi trocada semanalmente. As plantas permaneceram entre 40 a 59 dias nessas condições.

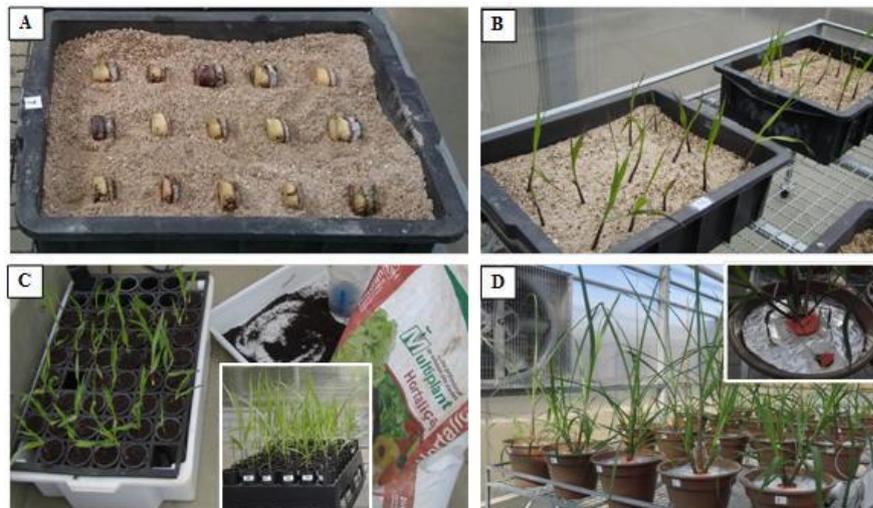


Figura 2. Etapas do cultivo de cana-de-açúcar. Brotação em caixas contendo areia e vermiculita (A e B). Desenvolvimento em tubetes contendo substrato comercial multiplant (C) e em sistema hidropônico com solução nutritiva (D).

3.7. Avaliação do Desenvolvimento Inicial das Mudanças em Caixa com Areia e Vermiculita Estéril e Em Substrato Multiplant® Não Estéril

Depois da brotação dos minitubetes de cana-de-açúcar em caixas contendo o substrato areia + vermiculita (2:1 v.v, estéril) que ocorreu entre 10 a 20 dias após a inoculação de bactérias diazotróficas e plantio, repetições de cada caixa, conforme o item 3.1, foram separadas em raiz e parte aérea e determinado os parâmetros radiculares, comprimento, área, volume e comprimento de raízes finas por classe de espessura, com uso do software *WinRHIZO Arabidopsis* e obtido posteriormente a massa seca de raízes e brotos.

Após transplante das plântulas para tubetes, aproximadamente 30 dias após o transplantio e de 40 a 50 dias após a inoculação obteve-se as variáveis biométricas, altura das plantas (HP), comprimento (CF) e largura (LF) da folha +1, número de folhas (NFLs), diâmetro da base do caule (DC) e biomassa seca da parte aérea e das raízes das plantas.

A cada coleta das plantas, duas repetições foram destruídas para a avaliação microbiológica de acompanhamento do estabelecimento das bactérias do inoculante através do método do número mais provável (NMP), que consistiu na inoculação em triplicata em meios de cultivo semissólido sem adição de N, sendo, LGI semi-específico para *Nitrospirillum amazonense*; JMV para *Paraburkholderia tropica*; LGI-Pcaldo para *Gluconacetobacter diazotrophicus*; e JNFb para *Herbaspirillum spp* (DÖBEREINER et al., 1995; BALDANI et al., 2014).

3.8. Avaliações Durante e Após o Desenvolvimento das Mudanças em Sistema Hidropônico

Durante a fase de hidroponia, foram realizadas três coletas para avaliação da atividade enzimática e frações solúveis relacionadas ao metabolismo de nitrogênio. A primeira ocorreu 30 dias após transferência das plantas dos tubetes para o sistema hidropônico, nessa ocasião as plantas estavam recebendo a solução nutritiva com 3,0 mM de N, solução 1 (Tabela 3). Após 72h sem suprimento de N e de 16 a 26 dias após o ressurgimento com alta e baixa dose de N, foram feitas coletas de 1,5 grama de raízes e de folha (folha+1). A primeira coleta foi feita aos 70 dias após a inoculação (DAI) e plantio (DAP) dos minitubetes e aos 30 dias após o transplantio (DAT) para o sistema hidropônico. A segunda coleta foi realizada aos 33 DAT

em que as plantas se encontravam com 72h sem fornecimento de nitrogênio, e a terceira, foi feita em média aos 50 DAT (aproximadamente 90 DAI), nessa ocasião as plantas estavam supridas a duas semanas com alto e baixo N, onde metade dos tratamentos receberam a solução 1 e a outra metade a solução 2 (Tabela 3). Os tecidos foliares e radiculares coletados para análises das frações solúveis foram dispostos em álcool 80%, sendo que 0,5 g foi destinado para a avaliação imediata da atividade da enzima nitrato redutase (NR) e 0,5 g congelado em nitrogênio líquido e conservados a -70°C para avaliação da enzima glutamina sintetase (GS).

Nas duas primeiras coletas, foram coletados apenas 2,0 g da folha +1 e 2,0 g de raízes para análises de atividade das enzimas RN e GS e para análise das frações solúveis, enquanto que na terceira coleta (coleta final) foram obtidos os parâmetros: altura das plantas, comprimento e largura da folha +1, número de folhas, diâmetro basal do colmo e número de perfilhos. Posteriormente, as plantas foram separadas em folha, colmo e raízes e secas em estufas a 60°C até obtenção da massa constante referente ao parâmetro massa seca e moído para avaliação do acúmulo de nutrientes, especialmente N. A análise da enzima NR foi feita imediatamente após a coleta. As amostras para avaliação da GS foram congeladas em nitrogênio líquido durante a coleta e armazenadas em ultra freezer a -70°C para posterior análise, e as amostras para frações solúveis acondicionadas em álcool etílico diluído em água deionizada a 80% (v/v).

No primeiro experimento, só foram realizadas duas coletas e avaliado apenas a atividade da enzima NR como variável relacionada ao metabolismo de N. Nesse experimento a coleta para NR foi feita às 24 h e aos 7 dias após o abastecimento com a solução nutritiva contendo 3,0 mM de N (Tabela 3) que corresponde aos 31^o e 37^o dia após o transplântio das mudas dos tubetes para o sistema hidropônico e aos 71 e 77 dias após a inoculação dos minitoletes, respectivamente.

a) Atividade da enzima nitrato redutase (NR)

Foi realizada pelo método *in vivo* de acordo com Jaworski (1971) e adaptado para cana-de-açúcar por Santos et al., (2014). As coletas consistiram em amostras de 0,5 g dos fragmentos de tecido de raízes e da folha +1 (folha índice - sem a nervura central) cortadas a aproximadamente 1cm da inserção no colmo. Os fragmentos foram acondicionados no escuro e adicionado 10 mL de solução extratora obtida a partir de 2,5 mL de tampão fosfato preparado com KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich) na concentração de 285 mmol dm^{-3} com pH 7,3; 2,5 mL de KNO_3 (Sigma-Aldrich) com concentração de 300 mmol dm^{-3} ; 1,0 mL de Tween 20 a 0,6% (v/v) e 4,0 mL de água deionizada. Logo após as amostras foram submetidas a vácuo (600 mm Hg) por 3 minutos e mantidas em banho-maria a 32°C , por 90 min.

Após o período de incubação, foram retiradas alíquotas de 0,5 mL da solução de incubação de cada amostra e recolhidas em tubos de ensaio onde foram adicionados 0,5 mL de sulfanilamida (Sigma-Aldrich) a 1%, 0,5 mL de n-naftil-etileno-diamino (Sigma-Aldrich) a 0,02%. As alíquotas permaneceram em repouso por 20 min e, então, acrescentou-se 4 mL de água deionizada.

A absorbância foi medida em espectrofotômetro, modelo 2000 UV (Bel Photonics) a 540 nm e a determinação da concentração de NO_2^- , obtida a partir de uma curva padrão usando NaNO_2 (Sigma-Aldrich). Desta forma, a atividade da enzima foi estimada pela quantidade de NO_2^- liberada pelos tecidos vegetais na solução de incubação e foi expressa em $\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de matéria fresca.

b) Atividade da enzima glutamina sintetase (GS)

Amostras de tecido fresco de folha e raízes (0,5 g) foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino e em seguida foi adicionado 1,5 mL do tampão de extração, constituído da mistura de 5 mL de Tris-HCl (Sigma) 1M, pH 8,0, 0,2 mL de EDTA (Aldrich), 0,5M pH 8,0, 1,5 g de Polyvinylpolypirrolidone (PVPP, Sigma-Aldrich), 0,154 g Dithiothreitol (DTT, Sigma), 30 mL de glicerol puro, 0,5 mL de Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Sigma) 200 mM e avolumado para 100 mL com água deionizada. O homogeneizado foi centrifugado a 14.000 rpm em centrífuga refrigerada, modelo 5415 R (Eppendorf) a - 4 °C durante 30 min. O conteúdo de proteína total foi determinado pela absorvância num espectrofotômetro a 540 nm utilizando albumina de soro bovina (BSA, Sigma-Aldrich) como padrão.

O extrato proteico, contendo 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteínas foi utilizado para quantificar a atividade de GS. Para isso foi preparado a solução de extração através da adição de 2,5 mL de Imidazol-HCl (Sigma) 1M pH 7,5; 2,5 mL de Hidroxilamina-Tris (Sigma-Aldrich) 0,1M pH 7,5; 0,203 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich); 0,184 g de L-glutamato (Sigma); 0,138 g de ATP (Sigma) e 17,5 μL de β -mercaptoetanol (Aldrich); sendo o extrato final avolumado para 100 mL. Foi utilizado 0,45 mL deste tampão em 0,5 mL do extrato proteico. Esta mistura foi então incubada a 30 °C por 30 min e após esse período a reação foi finalizada pela adição de 0,35 mL do reagente cloreto férrico (Sigma-Aldrich) adicionado a ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich) e dissolvidos em ácido clorídrico (HCl, Sigma-Aldrich) 0,5N. As absorvâncias das amostras foram mensuradas em leitor de microplaca modelo Anthos Zenyth 200 ST (Biochrom) a 540 nm, utilizando como padrão o γ -glutamil monohidroxamato (Sigma). A atividade da GS foi expressa em $\mu\text{moles de } \gamma\text{-glutamil monohidroxamato produzido por minuto por } \mu\text{g proteína}^{-1}$.

c) Frações solúveis

Amostras de 1 g de tecidos foliares e raízes foram adicionadas em 20 mL de álcool etílico (Vetec) diluído em água deionizada a 80% (v/v), triturados por 3 min com auxílio do triturador Turratec, modelo TE-102 (Tecnal, hélice de 12 mm), homogeneizados e filtrados em 4 camadas de gaze. O filtrado foi então recolhido e transferido para funil de separação com uso de clorofórmio (Vetec) para separação das fases polar e apolar. A fase apolar foi descartada e a polar utilizada para as análises. Foi determinado simultaneamente os teores de nitrato e nitrito de acordo com Miranda et al. (2001), teores de N-amino livre pelo método da ninidrina segundo Yemm & Cocking, (1995), teores de amônio pelo método colorimétrico descrito por Mitchel (1972) e os teores de açúcares solúveis de acordo com Yemm & Willis (1954).

d) Acúmulo de macronutrientes na massa seca das mudas

Folhas, colmos e raízes foram submetidas a secagem em estufa com ventilação forçada a 65 °C até o peso se tornar constante, logo após foram moídas em moinho de facas do tipo Wiley e destinadas as análises de nitrogênio (N) fósforo (P), potássio (K).

Realizou-se a determinação de N, por digestão sulfúrica e destilação, P, K por digestão nitroperclórica, determinando-se P por colorimetria, K por fotometria de chama (MALAVOLTA et al., 1997). De posse dos dados dos teores dos nutrientes (g do nutriente kg^{-1} de massa seca), esses foram multiplicados pela massa seca da planta correspondente e o acúmulo expresso em $\text{mg do nutriente}^{-1}$ planta.

3.9. Análise Estatística

Os dados foram analisados quanto à normalidade (Lilliefors, 1967) e à homogeneidade (Cockran, 1941) com o auxílio do software SAEG 9.0. A análise de variância foi obtida a partir do software SISVAR 5.3, sendo aplicado o teste F ou Skott-Knott ($p \leq 0,05$) ou apenas o erro padrão para comparação das médias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inoculação de bactérias diazotróficas promoveu melhor desenvolvimento das mudas de cana-de-açúcar nos quatro ensaios conduzidos e nas três fases de cultivos avaliadas (brotação, tubete e hidroponia), modificando o metabolismo de nitrogênio.

4.1. Acúmulo de Biomassa e outros Parâmetros Envolvidos no Desenvolvimento Inicial de Mudanças de Cana-de-açúcar Inoculadas ou Não com Bactérias Diazotróficas

Foi possível observar efeito da inoculação das bactérias diazotróficas logo após a brotação das gemas aos 12 (experimento 2) e 20 dias após o plantio (experimento 3), quando as plantas permaneceram em substrato estéril contendo uma mistura de areia e vermiculita.

Aumento advindo da inoculação das cinco estirpes de bactérias diazotróficas aplicadas em mistura foi na massa seca das raízes (MSR) em aproximadamente 100%, nas variedades RB867515 (Figura 3) e IACSP95-5000 (IAC) e de 50% nas variedades RB92579 e RB966928 em relação ao tratamento controle (Tabela 5). Esse efeito da inoculação no sistema radicular das plantas também foi verificado através dos parâmetros radiculares avaliados com auxílio do software *WinRHIZO Arabidopsis*. O comprimento, volume e área radicular das variedades RB867515 e IACSP95-5000 foram maiores nas plantas inoculadas, assim como a MSR. Foi observada interação significativa entre variedade e inoculação ($V * I$) no comprimento de raízes finas (espessura entre 0,5 a 1,5 mm), sendo que apenas a variedade RB867515 apresentou incremento significativo dessa classe de raiz em aproximadamente 70% através da inoculação, como demonstrado na Tabela 5 e Figura 4.

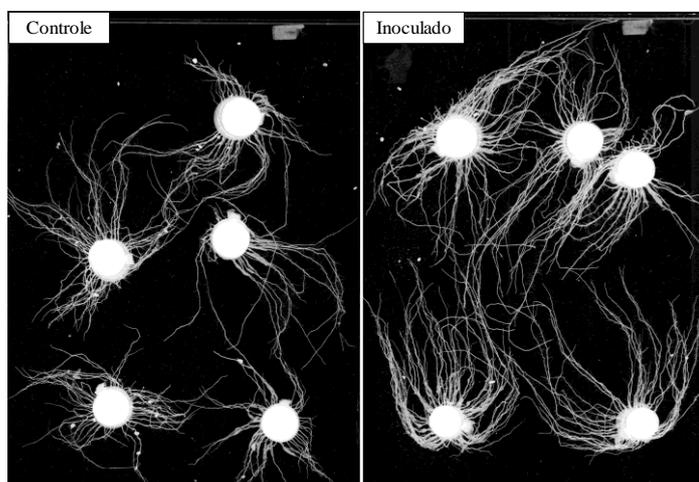


Figura 3. Sistema radicular de plântulas de cana-de-açúcar aos 16 dias após o plantio, inoculadas ou não com o inoculante misto de bactérias diazotróficas (vide Tabela 2).

As raízes, nesse estudo, foram separadas em três classes de acordo com a espessura, raízes finas foram consideradas aquelas que apresentaram espessura maior que 0,5 e menor ou igual a 1,5 mm, raízes médias a que possuem espessura menor que 1,5 e maior ou igual a 3,5 mm e raízes grossas com espessura maior que 3,5 mm.

Nas variedades RB92579 e RB966928 foram observados incrementos em torno de 28% pela inoculação de bactérias diazotróficas somente no volume radicular, dentre os parâmetros avaliados pelo software *WinRHIZO Arabidopsis* (Tabela 5). Nessa fase, a

inoculação das bactérias não modificou a biomassa da parte aérea (MSPA) nas quatro variedades testadas.

Tabela 5. Acúmulo de biomassa e parâmetros radiculares de variedades de cana-de-açúcar aos 15 dias após inoculação da mistura bacteriana (vide Tabela 2) e plantio em areia e vermiculita estéril. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F a 5% de significância. Valores médios de 8 repetições. CV= Coeficiente de variação.

	MSPA	MSR	L	Área	Volume	L, Raízes finas	L, Raízes médias	L, Raízes grossas
	g planta ⁻¹		mm	mm ²	mm ³	-----mm -----		
Experimento 2								
RB867515	0,96 b	0,45 a	4284,60 a	9751,6 a	2089,22 a	1023,25 a	743,83a	2262,19 a
IACSP95-5000	1,82 a	0,47 a	3697,43 a	10271,8 a	2157,90 a	1198,17 a	689,37 a	1952,19 a
Controle	1,36 a	0,31 b	3235,77 b	8051,5 b	1560,94 b	962,88 b	683,39a	1973,09 a
Mistura	1,42 a	0,61 a	4746,27 a	11972,0 a	2686,21 a	1258,53a	749,82 a	2241,28 a
CV %	20,67	25,45	16,04	13,78	20,23	22,56	33,52	26,89
Experimento 3								
RB92579	0,08 a	0,13 a	1841,50 a	2110,31 a	173,27 a	709,15 a	704,71 a	340,27 a
RB966928	0,09 a	0,13 a	1785,03 a	1829,72 b	193,10 a	635,86 a	678,72 a	292,85 a
Controle	0,08 a	0,12 b	1904,76 a	1901,12 a	160,16 b	664,28 a	679,50 a	325,94 a
Mistura	0,09 a	0,15 a	1721,74 a	2038,91 a	206,22 a	680,70 a	703,93 a	307,19 a
CV %	27,92	18,09	16,15	12,86	17,68	17,27	24,37	15,32

Massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), comprimento (L), Comprimento de raízes por classe de espessura: Raízes finas = $0,5 < L \leq 1,5$; Raízes médias = $1,5 < L \leq 3,5$; Raízes grossas = $L > 3,5$.

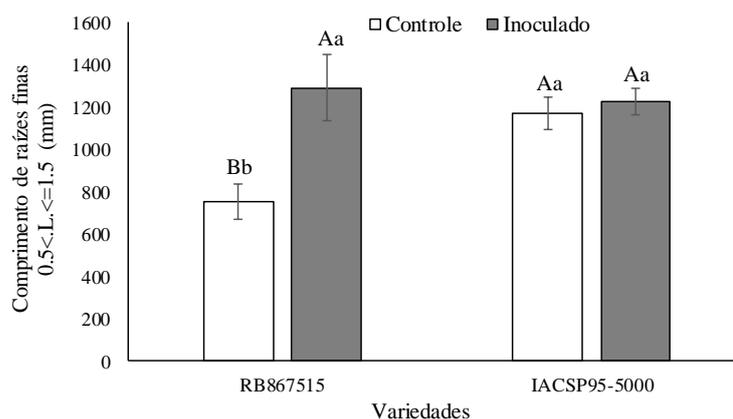


Figura 4. Desdobramento da interação entre inoculação (mistura bacteriana, vide Tabela 2) e variedades no comprimento de raízes finas aos 16 dias após o plantio e inoculação dos minitoletes. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para inoculação e minúsculas para variedade, não diferem pelo teste F a 5% de significância. Espessura de raízes finas = $(0.5 < L \leq 1.5)$, L= Comprimento. Valores médios de 4 repetições. A barra significa o erro padrão.

No experimento de inoculação das bactérias de forma isolada na variedade RB867515 (Experimento 4), verificou-se que quatro estirpes reduziram significativamente a MSPA nessa fase inicial, contudo apenas uma não foi capaz de promover aumento na MSR (Figura 5a).

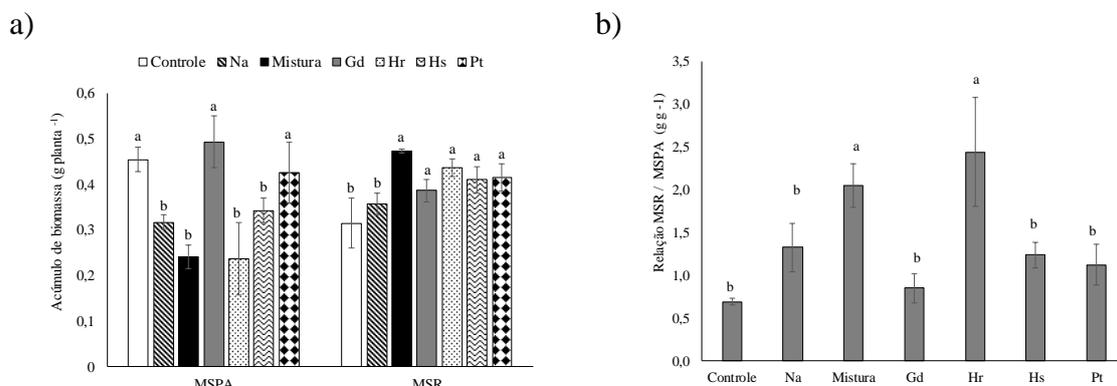


Figura 5. Acúmulo de biomassa seca de parte aérea-MSPA, massa seca de raiz - MSR (a) e relação entre a massa seca MSR e MSPA (b) em mudas de cana-de-açúcar, variedade RB867515 aos 20 dias após o plantio e inoculação de cinco bactérias diazotróficas de forma isolada e uma mistura contendo as cinco estirpes (vide Tabela 2). Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância. Valores médios de 4 repetições. A barra significa o erro padrão.

A inoculação dos tratamentos mistura e da estirpe Hr de forma isolada foram os que apresentaram maior redução na MSPA, entretanto apresentaram maiores incrementos na MSR em relação ao controle, em aproximadamente 50% e 38%, respectivamente, seguidos pela aplicação das estirpes Hs e Pt (31%) e Gd (22%) (Figura 5a). A inoculação da estirpe Hr e da mistura aumentaram ainda em até 300% a relação MSR/MSPA (Figura 5b).

Na fase de mudas em tubetes foi possível observar efeito positivo da inoculação da mistura nas quatro variedades testadas, nos experimentos 2 (RB867515 e IACSP95-5000) e 3 (RB92579 e RB966928) (Tabela 6). A MSPA foi maior nas variedades RB867515 e IACSP95-5000, em 30% quando inoculada, diferentemente do que ocorreu logo após a brotação em que não foi observado efeito na MSPA pela inoculação em nenhuma variedade (Tabela 5).

Nas variedades RB966928 e RB92579, o efeito permaneceu apenas na MSR, com incrementos de aproximadamente 21%. Já nas variedades RB867515 e IACSP95-5000, esse incremento na MSR foi de 40% (Tabela 6). Nos dois ensaios, a inoculação promoveu aumento na população bacteriana associada as plantas, sendo o maior incremento percebido no segundo ensaio (Tabela 7).

Tabela 6. Promoção de crescimento de mudas de cana-de-açúcar pelo inoculante múltiplo de bactérias diazotróficas (vide Tabela 2) após cultivo em tubetes. Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem pelo teste F a 5% de significância. Valores médios de 12 (experimento 2) e 10 (experimento 3) repetições. CV= coeficiente de variação.

	MSPA	MSR	D	Altura	CF+1	LF+1	NF
	-----g planta ⁻¹ -----		-----cm-----				unid
Experimento 2							
RB867515	1,27 a	0,52 a	6,44 b	9,10 a	36,02 a	0,98 b	4,90 a
IACSP95-5000	1,38 a	0,31 b	7,38 a	6,71 b	30,97 b	1,24 a	5,10 a
Controle	1,15 b	0,35 b	6,59 b	7,71 a	31,64 a	1,04 b	5,00 a
Mistura	1,50 a	0,49 a	7,23 a	8,10 a	35,35 a	1,18 a	5,00 a
CV %	17,06	17,45	8,77	14,43	12,70	10,56	10,00
Experimento 3							
RB92579	0,83 a	0,13 b	4,33 b	5,61 b	24,65 b	0,83 a	3,95 b
RB966928	0,89 a	0,17 a	4,82 a	8,08 a	29,88 a	0,74 b	4,72 a
Controle	0,84 a	0,14 b	4,66 a	7,98 a	27,06 a	0,78 a	4,22 a
Mistura	0,88 a	0,17 a	4,52 a	6,91 a	27,46 a	0,78 a	4,45 a
CV %	13,28	23,31	13,43	20,73	19,92	19,43	17,59

Massa seca de parte aérea (MSPA); massa seca de raiz (MSR), diâmetro (D); Comprimento (C+1) e largura (L+1) da folha +1 e número de folhas (NF). Mudas avaliadas aos 46 dias após a inoculação (DAI) e 30 dias após o transplântio para tubetes (DAT) no experimento 2, e aos 32 DAI e 20 DAT no experimento 3. CV= Coeficiente de variação

Tabela 7. Número mais provável de células bacterianas (NMP) em massa fresca (MF) de raízes de duas variedades de cana-de-açúcar após 30 dias a inoculação da mistura bacteriana (vide Tabela 2) em comparação ao tratamento controle (não inoculado).

Meios	1° ensaio				2° ensaio			
	RB867515		IACSP95-5000		RB966928		RB92579	
	Controle	Inoculado	Controle	Inoculado	Controle	Inoculado	Controle	Inoculado
	-----Log ₍₁₀₎ do no de células grama de MF ⁻¹ -----							
LGI-P	4,60	5,17	4,95	6,65	5,34	6,77	3,10	6,71
LGI	4,95	5,65	4,60	7,04	0,98	6,07	4,81	5,80
JNFB	4,95	6,00	5,87	7,04	3,30	7,03	3,89	7,36
JMV	4,60	4,84	4,95	6,17	4,57	6,53	4,40	6,55

Valores médios de uma amostra composta de duas repetições biológicas. Mass fresca (MF).

Os incrementos na MSR de todas as variedades foram reduzidos (Tabela 6) em relação aos observados na fase inicial, 12 a 16 dias após a brotação (Tabela 5), sendo que nas variedades RB867515 e IACSP95-5000 a redução foi de 60%. Todavia, como demonstrado na tabela 6, os valores de incrementos significativos de biomassa aérea foram observados após o desenvolvimento das mudas em substrato comercial Multiplant nessas variedades. As mudas inoculadas das variedades RB867515 e IACSP95-5000 apresentaram ainda maior diâmetro do caule (D) e largura da folha +1 (LF+1) em relação ao tratamento controle (Tabela 6) e interação significativa em relação ao número de folhas (NF) em que a variedade IACSP95-5000 apresentou maior NF que a RB867515 quando não inoculada, sem diferença estatística significativa na presença do inoculante (Figura 6).

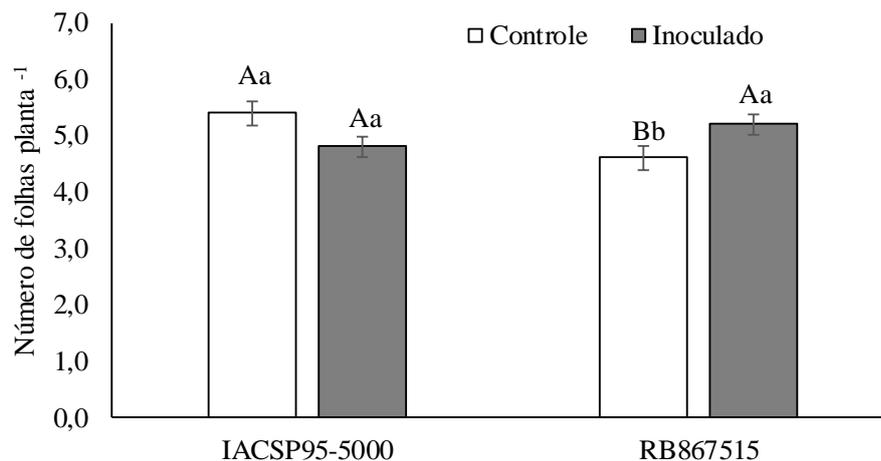


Figura 6. Desdobramento da interação significativa entre variedade e inoculação (mistura bacteriana, vide Tabela 2) no número de folhas de mudas de cana-de-açúcar 30 dias após o transplante para tubetes. Letras iguais maiúsculas para inoculação e minúsculas para variedade não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade. Valores médios de 6 repetições. A barra significa o erro padrão.

Em um próximo estudo (experimento 4), no qual se utilizou a inoculação das bactérias isoladas e da mistura das cinco estirpes na mesma variedade (RB867515) não foi verificado aumento significativo da inoculação da mistura na MSR e MSPA em mudas aos 56 dias após o plantio, contudo observou-se aumento na altura das plantas, comprimento (CF+1) e largura (LF+1) da folha de referência +1 (Tabela 8).

A inoculação isolada das estirpes Pt, Hs, Na e Gd na variedade RB867517 aumentaram a MSPA entre, aproximadamente, 10 e 26%, sendo o menor valor observado pela inoculação de Gd e maiores por Pt. A inoculação de bactérias diazotróficas não mostrou efeito positivo na MSPA logo após a brotação (Figura 5), porém foi observado incremento significativo após a fase de tubetes (Tabela 8), demonstrando que o efeito dessas bactérias vai sendo modificado de acordo com a fase de desenvolvimento da planta. Apenas a aplicação das estirpes Na e Pt aumentaram a MSR na variedade RB867515 após a fase de tubetes com 42 e 67% de incrementos, respectivamente. Além disso, essas mesmas estirpes mais a estirpe Hr aumentaram a produção de raiz em relação à parte aérea (Figura 7b). E assim como a mistura, as estirpes Gd e Pt aumentaram a altura das plantas e todos os tratamentos de inoculação promoveram maior largura e comprimento da folha +1, como demonstrado na Tabela 8.

Resultados significativos da inoculação de bactérias diazotróficas através da inoculação das estirpes isoladas e da mistura também foram observados em mudas da variedade RB966928 aos 32 dias após o plantio (experimento 1). Verificou-se aumento na MSR e MSPA pela inoculação da mistura e das estirpes Pt e Hs com incrementos de aproximadamente 50% na MSPA e 40% na MSR (Tabela 8). A estirpe Pt e Hr aumentaram a massa seca das raízes do tolete (raízes primárias), enquanto que as raízes dos perfilhos (secundárias) foram maiores pela inoculação das estirpes Pt e Hs (Figura 8). Apenas a inoculação da estirpe Hr foi capaz de aumentar a relação MSR/MSPA (Figura 7a).

A Tabela 8 mostra ainda o efeito significativo da inoculação no CF+1 das mudas da variedade RB966928 inoculadas pela mistura e pela estirpe Pt, de forma similar como ocorreu na variedade RB867515, no entanto, a inoculação das estirpes isoladas (Pt, Hs e Hr) ainda aumentou o número de folhas na variedade RB966928.

Tabela 8. Acúmulo de biomassa e parâmetros de crescimento de mudas de cana-de-açúcar, variedade RB966928 (experimento 1) e RB867515 (experimento 4) aos 30 dias após cultivo em tubetes e aos 40 (RB966928) e 56 (RB867515) dias após plantio e inoculação das bactérias diazotróficas. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância. Valores médios de 4 (RB966928) e 5 (RB867515) repetições. CV = coeficiente de variação.

Tratamentos	MSPA ----- g planta ⁻¹ -----	MSR	Altura ----- cm -----	D	C+1	L+1	NF unid
Variedade RB966928							
Controle	0,44 b	0,18 b	8,50 a	5,82 a	31,38 b	0,63 a	4,50 b
Mistura	0,68 a	0,22 a	8,38 a	6,26 a	44,16 a	0,68 a	4,33 b
Gd	0,54 b	0,19 b	7,40 a	5,61 a	34,78 b	0,70 a	4,00 b
Na	0,64 b	0,18 b	6,95 a	5,56 a	32,33 b	0,68 a	4,16 b
Hr	0,37 b	0,20 b	7,46 a	5,61 a	28,83 b	0,64 a	5,00 a
Hs	0,67 a	0,26 a	7,15 a	5,56 a	34,41 b	0,66 a	5,16 a
Pt	0,67 a	0,26 a	9,91 a	6,10 a	44,16 a	0,76 a	5,50 a
CV%	13,54	18,61	27,82	15,79	22,31	12,36	13,55
Variedade RB867515							
Controle	2,46 b	0,56 b	18,41 b	7,73 a	55,33 c	1,10 c	5,16 a
Mistura	2,53 b	0,51 b	21,33 a	8,05 a	70,41 a	1,38 b	5,00 a
Gd	2,95 a	0,61 b	19,50 a	7,69 a	68,58 a	1,50 a	5,33 a
Na	2,70 a	0,80 a	18,00 b	8,05 a	60,50 b	1,33 b	5,00 a
Variedade RB867515							
Hr	2,08 b	0,58 b	16,66 b	7,12 a	60,00 b	1,30 b	5,00 a
Hs	2,76 a	0,55 b	19,58 a	8,28 a	71,08 a	1,35 b	5,33 a
Pt	3,10 a	0,94 a	20,33 a	8,49 a	71,08 a	1,45 a	5,00 a
CV%	13,54	28,52	8,45	8,45	5,43	8,54	6,27

Massa seca de parte aérea (MSPA); massa seca de raiz (MSR), diâmetro (D); Comprimento (C+1) e largura (L+1) da folha +1 e número de folhas (NF) CV= Coeficiente de variação. Tratamentos: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd), *Herbaspirillum seropedicae* - (Hs) *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Hr), *Paraburkholderia tropica* (Pt) e *Nitrospirillum amazonense* (Na) de forma isolada e um tratamento contendo o inoculante misto (mistura) com as cinco estirpes bacterianas.

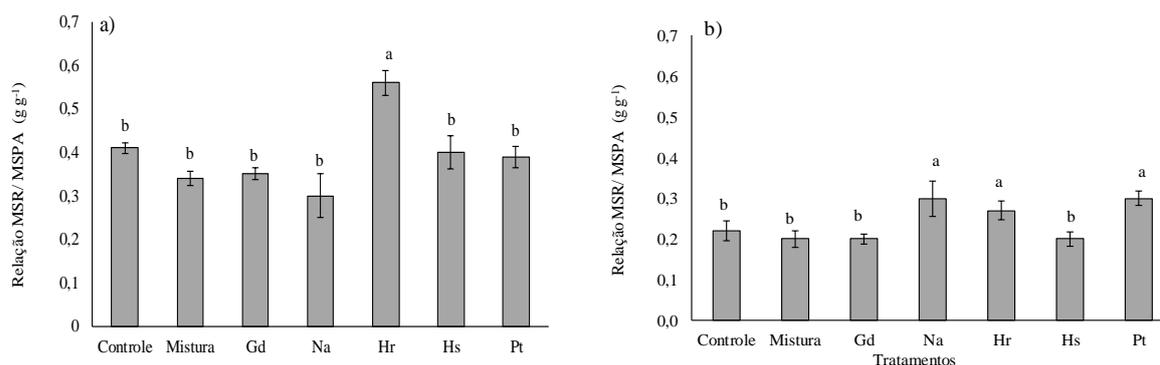


Figura 7. Relação entre massa seca de raiz e parte aérea (MSR/MSPA) de mudas de cana-de-açúcar, variedade RB966928 (a) e RB867515 (b) após cultivo em tubetes e inoculadas com bactérias diazotróficas descritas na Tabela 2 de forma isolada e um tratamento contendo o inoculante misto (mistura) com as cinco estirpes bacterianas. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância. Valores médios de 4 (a) e 5 (b) repetições. A barra significa o erro padrão.

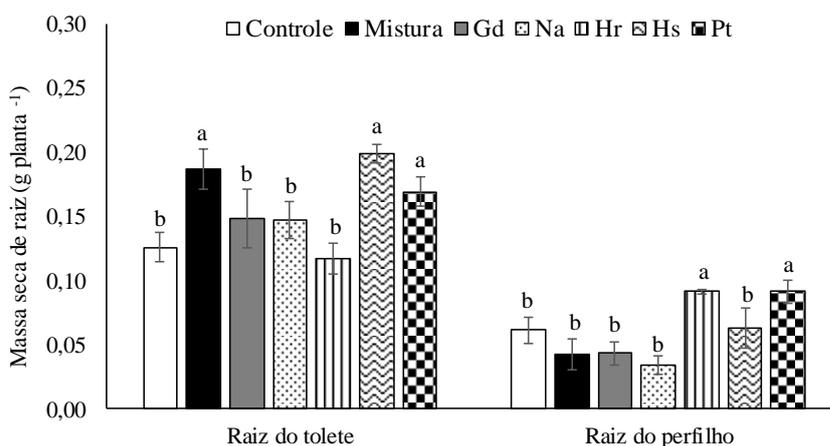


Figura 8. Massa seca de raízes do tolete (primária) e do perfilho (secundária) de mudas de cana-de-açúcar, variedade RB966928 (experimento 1) aos 30 dias após cultivo em tubetes e aos 40 dias após plantio e inoculação das bactérias diazotróficas descritas na Tabela 2 de forma isolada e um tratamento contendo o inoculante misto (mistura) com as cinco estirpes bacterianas. Valores médios de 4 repetições. A barra significa o erro padrão.



Figura 9. Sistema radicular de mudas de cana-de-açúcar variedade RB966928 cultivadas em tubetes contendo substrato comercial Multiplant® aos 30 dias após a brotação e aos 40 dias após a inoculação da mistura das cinco bactérias utilizadas como inoculante (vide Tabela 2) em comparação ao tratamento controle (não inoculado).

A inoculação da mistura promoveu ainda aumento de diâmetro do colmo (experimento 2) nas variedades RB867515 e IACSP95-5000 em 11% como mostrado na tabela 6 e de 15% na altura do colmo (Tabela 8) na variedade RB867515.

Assim como observado nas fases de brotação e tubetes a inoculação da mistura proporcionou aumento na MSR das mudas com interação significativa entre variedade e inoculação (V*I) no experimento 2 em que foi avaliado as variedades RB857515 e IAC, e interação tripla entre variedade, inoculação e dose de nitrogênio (V*I*N) no experimento 3 em que foi utilizado as variedades RB92579 e RB966928 (Tabela 9). A aplicação da mistura promoveu incremento significativo de aproximadamente 53% na MSR da RB867515 (Figura 10) e não apresentou efeito na variedade IAC (Figura 11a).

A dose de N afetou o número de folhas (NF) e de perfilhos (NP) nas variedades RB867515 e IACSP95-5000, sendo o maior NF verificado nas mudas crescidas sobre alta dose de N (3,0mM), e no NP ocorreu uma interação significativa com a inoculação. A inoculação aumentou em 34% o número dos perfilhos nas mudas cultivadas sobre 0,3mM de N em relação às mudas controles, porém na presença da dose alta de N (3,0mM) houve redução de aproximadamente 24% no NP através da inoculação. Plantas controles aumentaram o perfilhamento em função do aumento de N na solução, enquanto que as inoculadas reduziram (Figura 11b).

A inoculação aumentou significativamente a MSPA nas variedades RB92579 e RB966928 em aproximadamente 25% sem efeito nas variedades RB867515 e IACSP95-5000, nos outros parâmetros de crescimento não foi verificado efeito da inoculação, somente da variedade e da dose de N (Tabela 9). A variedade RB867515 apresentou maior desenvolvimento inicial que a variedade IACSP95-5000 observados pelos maiores valores de altura, comprimento (CF+1) e largura (LF+1) da folha +1, número de folhas (NF) e perfilhos. No experimento 3, a variedade RB966928 apresentou maior MSPA, diâmetro (D), CF+1 e NF que a variedade RB92579, evidenciando as características que caracteriza a RB966928 uma variedade precoce e a RB92579 uma variedade tardia.

Tabela 9. Mudanças de cana-de-açúcar após cultivo em sistema hidropônico com solução de Hoagland modificada para duas concentrações de nitrogênio (0,3 e 3 mM) e inoculadas com o inoculante misto de bactérias diazotróficas (vide Tabela 2).

	MSPA	MSR	Altura	D	CF+1	LF+1	NF	NP
	-----g planta ⁻¹ ----		----- cm -----				-----unid-----	
Experimento 2								
RB867515	20,49 a	8,52 a	35,51 a	18,81a	97,63 a	2,49 a	8,16 a	4,95 a
IACSP95-5000	18,66 a	7,90 a	25,50 b	20,18 a	83,30 b	2,32 b	7,70 b	3,45 b
Controle	18,22 a	7,46 b	30,28 a	17,61 a	90,31 a	2,39 a	7,83 a	4,16 a
Inoculado	20,93 a	8,96 a	31,63 a	21,37 a	90,62 a	2,42 a	8,04 a	4,25 a
0,3 mM N	18,04 a	8,31 a	30,66 a	17,52 a	88,65 a	2,36 a	7,62 b	4,29 a
3,0 mM N	21,11 a	8,11 a	31,24 a	21,56 a	92,28 a	2,45 a	8,26 a	4,12 a
CV %	27,45	22,77	16,85	17,85	13,38	9,76	28,81	32,39
Experimento 3								
RB92579	9,77 b	2,53 a	20,56 b	9,44 b	75,47 b	2,00 a	2,70b	4,80 a
RB966928	13,83 a	2,55 a	24,60 a	10,95 a	85,10 a	1,93 a	3,55a	3,65 a
Controle	10,50 b	2,45 a	22,00 a	9,63 a	78,27 a	1,93 a	3,05 a	4,55 a
Inoculado	13,10 a	2,65 a	23,16 a	10,76 a	82,31 a	2,00 a	3,20 a	3,90 a
0,3 mM N	11,23 a	2,40 a	22,05 a	9,64 a	79,22 a	1,96 a	3,05 a	3,80 a
3,0 mM N	12,37 a	2,70 a	23,11 a	10,65 a	81,35 a	1,97 a	3,20 a	4,65 a
CV %	36,38	48,11	13,70	18,06	10,23	9,96	39,03	45,11

*Massa seca de parte aérea (MSTPA), massa seca da raiz (MSR), diâmetro (D), comprimento (CF+1) e largura (LF+1) da folha +1, número de folhas (NF) e número de perfilhos (NP). Mudanças do experimento 2 foram avaliadas aos 105 dias após o plantio (DAP) e 59 dias após o transplante para a solução nutritiva, enquanto que as mudanças do experimento 3 foram avaliadas aos 78 DAP e 46 dias após transplante para o sistema hidropônico. CV = coeficiente de variação. Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem pelo teste F a 5% de probabilidade. Valores médios de 24 (experimento 2) e 20 (experimento 3) repetições.

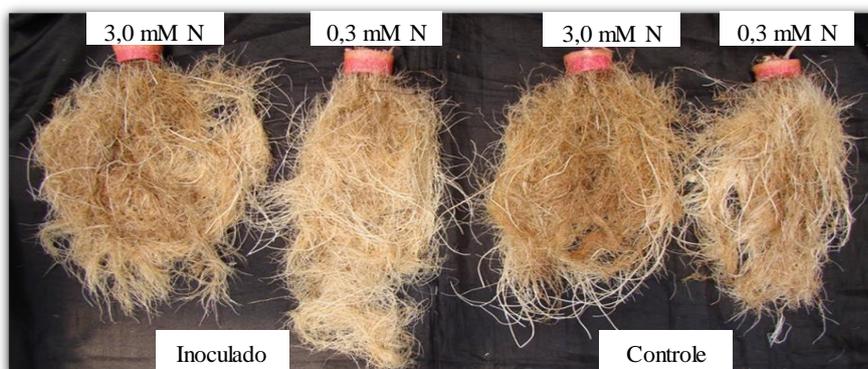


Figura 10. Sistema radicular da variedade RB867515 de cana-de-açúcar cultivada aos 48 dias em solução de Hoagland modificada para 3 mM e 0,3 mM de nitrogênio e inoculada ou não (controle) com o inoculante misto de bactérias diazotróficas (vide Tabela 2).

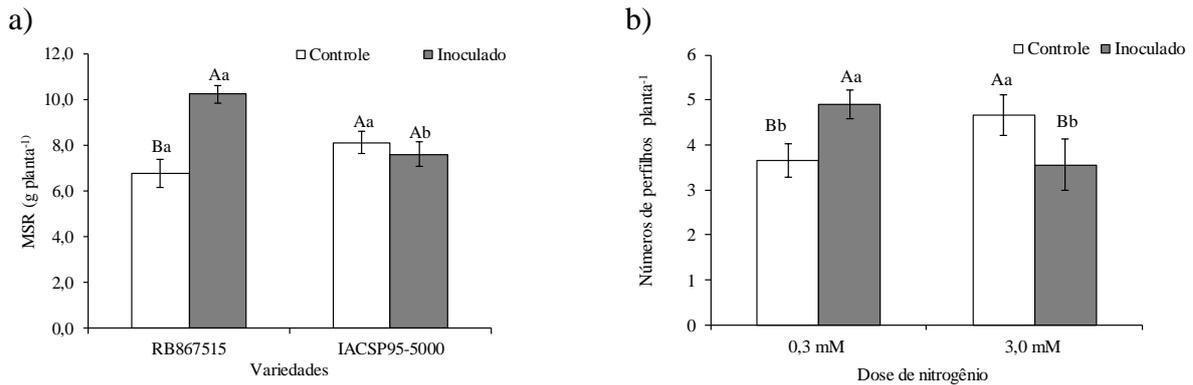


Figura 11. Desdobramento da interação entre variedades de cana-de-açúcar e inoculação (mistura bacteriana, vide Tabela 2) para massa seca de raiz – MSR (a) e entre dose de nitrogênio e inoculação para número de perfilhos (b). Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para inoculação e minúsculas para variedade e dose de nitrogênio não diferem pelo teste F a 5% de probabilidade. Valores médios de 12 repetições. A barra significa o erro padrão.

A inoculação da mistura bacteriana não proporcionou aumento significativo na MSR das mudas da variedade RB92579, mas as plantas inoculadas reduziram em mais de 30% a MSR na presença da dose alta de N (3,0mM) em relação a dose baixa (0,3mM), enquanto que a biomassa das mudas controles dessa variedade não foram modificadas pela dose de N (Figura 12a). De forma diferente, ocorreu nas mudas da variedade RB966928 em que a inoculação aumentou em 103% a MSR na presença da dose baixa de N sem efeito na dose alta. As plantas controle dessa variedade apresentaram maior MSR quando crescida na presença da dose alta de N, enquanto que as plantas inoculadas cultivadas na presença da dose 3mM de N reduziram significativamente a MSR em 43% em relação as mudas crescidas sobre 0,3mM (baixo N) (Figura 12b).

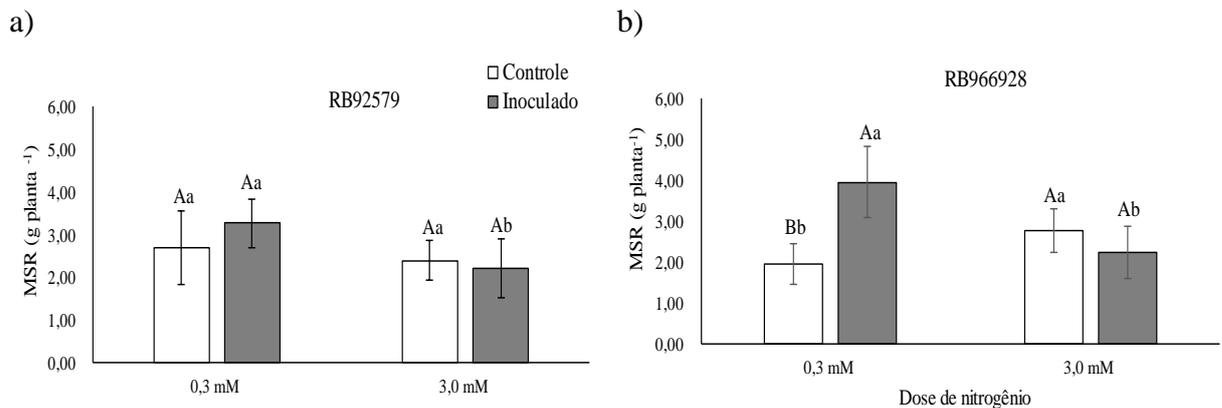


Figura 12. Desdobramento da interação entre variedade, inoculação (mistura bacteriana, vide Tabela 2) e dose de nitrogênio para massa seca de raízes (MSR) de cana-de-açúcar (experimento 3). Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas para inoculação e minúsculas para dose de N, não diferem pelo teste F a 5% de probabilidade. Valores médios de 5 repetições. A barra significa o erro padrão.

O efeito das bactérias na MSR foi influenciado pelas características do genótipo e da dose de N. Pode-se visualizar claramente o efeito da dose de N na modificação radicular (Figura 10), no entanto não afetou o acúmulo de biomassa nas variedades IACSP95-5000 e RB867515 (Tabela 9). Plantas supridas com alta dose de N (3,0mM) apresentaram

desenvolvimento horizontal, com maior formação de raízes laterais, já sobre baixa dose de N (0,3mM) as raízes apresentaram maior crescimento longitudinal (Figura 10). Nas duas condições de disponibilidade de N estudada a RB867515, apresentou efeito positivo da inoculação da mistura bacteriana, já IACSP95-5000 e a RB92579 não foi afetada pela inoculação, e a variedade RB966928, só apresentou resultados positivos na presença da dose baixa de N (Figura 12), mostrando que o N pode ser um fator regulatório do efeito das bactérias no crescimento das plantas, em especial do sistema radicular, no entanto, depende da sensibilidade do genótipo.

Nos experimentos em que foram avaliadas a inoculação individualizada das estirpes juntamente com a inoculação mista, foi possível observar que as plantas da variedade RB966928 (experimento 1) quando inoculadas com a mistura das cinco estirpes bacterianas apresentaram maior área foliar (AF) e massa seca de colmo (MSC) com 31% e 40% de aumento em relação ao controle respectivamente, sem efeito na MSPA, e o controle não diferiu da inoculação das estirpes Pt, Hs e Hr de forma isolada (Tabela 10).

A massa MSR foi incrementada tanto pela estirpe Hr de forma isolada como pela mistura em valores próximos de 30%. Além disso, as mudas em que foram aplicados os tratamentos de inoculação apresentaram redução no número de perfilhos (Tabela 10), semelhante às mudas da variedade RB867515 inoculadas com a mistura na presença da dose alta de N (3,0 mM) (Figura 13), já que as mudas da variedade RB966928 foram crescidas apenas na presença da dose alta de N. A MSPA não foi modificada pela inoculação (Tabela 10). Possivelmente, os efeitos no acúmulo na MSPA observados na fase de tubetes podem ter sido direcionados ao acúmulo específico de colmo pela inoculação da mistura.

Tabela 10. Promoção de crescimento de mudas de cana-de-açúcar por bactérias diazotróficas isoladas e a mistura das cinco estirpes do inoculante (vide Tabela 2) aos 80 dias após inoculação e aos 40 dias após cultivo em sistema hidropônico com solução nutritiva de Hoagland modificada para 3mM de nitrogênio.

	Área foliar cm ²	MSPA -----	MSC g planta ⁻¹	MSR -----	NP unid
Controle	928,04 b	8,78 a	9,98 b	9,84 b	6,25 a
Pt	1052,58 b	8,02 a	9,62 b	9,00 b	4,00 b
Hs	1042,82 b	8,47 a	8,99 b	10,09 b	4,25 b
Hr	1076,81 b	8,32 a	10,88 b	12,40 a	4,00 b
Mistura	1224,60 a	8,58 a	14,00 a	12,76 a	3,75 b
CV %	8,76	11,83	14,07	11,77	28,57

MSPA = Massa seca da parte aérea; MSC = Massa seca de colmo; MSR = Massa seca de raiz; NP = Número de perfilho; ICF = Índice de Clorofila Falker. CV= Coeficiente de variação. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância. Valores médios de 4 repetições.

Na variedade RB867515 (experimento 4) a inoculação da mistura também aumentou a MSC em 75% em relação ao tratamento controle, entretanto a inoculação mista não diferiu da inoculação das estirpes Pt, Na e Gd de forma isolada (Tabela 11). Esses mesmo tratamentos, com exceção da estirpe Pt aumentaram entre 33 a 46% a MSR (Tabela 11 e Figura 14), sendo o maior incremento verificado pela inoculação da mistura.



Figura 13. Sistema radicular de mudas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, aos 104 dias após a inoculação de cinco bactérias diazotróficas isoladas e em mistura (vide Tabela 2 e aos 58 dias após o transplantio para o sistema hidropônico, mudas aos 20 dias sobre baixa dose de N (0,3 mM).

A MSPA foi incrementada pela mistura e pelas estirpes Gd, Na, Hs e Pt com incrementos de 42 a 69%, sendo os menores valores através da inoculação da estirpe Hs e os maiores pela inoculação da estirpe Pt (Tabela 11), todos os tratamentos de inoculação aumentaram o número de folhas (NF) nas plantas, ocorrendo ainda uma interação significativa entre inoculação e dose de N (I*N) como apresentado na Tabela 11 e Figura 15. A inoculação da mistura e das estirpes Hs, Hr e Gd aumentaram o NF das plantas independente da dose de N, já a estirpe Na só promoveu aumento na presença da dose alta de N (3,0mM) e a estirpe Pt em mudas sobre baixa dose de N (0,3mM) (Figura 15). O NF das plantas inoculadas pela mistura e a estirpe Gd não foram afetados pela dose de N de forma semelhante ao tratamento controle, enquanto que as mudas inoculadas com as estirpes Na, Hr e Hs reduziram o NF e as inoculadas com a estirpe Pt aumentaram em função da redução da dose de N de 3 para 0,3mM (10X).

As mudas das variedades RB966928 (experimento 1) aos 80 dias após o plantio (DAP) e 40 dias após o transplantio (DAT) para hidroponia (Figura 15a) e da variedade RB867515 aos 104 DAP e 59 DAT (Figura 15 b) não apresentaram mais diferença na relação MSR/MSPA através da inoculação de bactérias diazotróficas, diferente do que ocorreu nas fases iniciais de desenvolvimento (logo após a brotação e tubetes).

Tabela 11. Parâmetros de crescimento da variedade RB867515 de cana-de-açúcar aos 58 dias após transplântio para solução nutritiva de Hoagland modificada para 2 doses de N (0,3 e 3,0 mM) e aos 104 dias após a inoculação de bactérias diazotróficas (mistura bacteriana, vide Tabela 2) e plantio dos minitoletes.

	MSC	MSR	MSPA	L+1	C+1	Altura	D	Nf
	-----g planta ⁻¹ -----			-----cm -----				unid
Inoculação								
Controle	10,84 b	6,60 b	23,70 b	3,12 a	125,62 a	53,20 a	16,91 a	4,50 b
Mistura	19,04 a	9,67 a	37,82 a	2,98 a	133,56 a	66,50 a	16,87 a	5,12 a
Gd	16,76 a	9,22 a	35,83 a	3,10 a	136,93 a	64,62 a	17,41 a	5,00 a
Na	19,00 a	8,97 a	39,45 a	3,35 a	137,18 a	64,81 a	17,81 a	5,00 a
Hr	13,98 b	6,04 b	29,29 b	3,01 a	129,00 a	60,37 a	16,60 a	4,87 a
Hs	15,60 b	8,02 b	33,66 a	3,00 a	134,50 a	64,44 a	17,52 a	5,37 a
Pt	19,60 a	7,70 b	40,18 a	3,20 a	141,50 a	68,38 a	17,86 a	4,87 a
Dose de N								
0,3mM	14,52 b	7,69 a	30,61 b	3,09 a	130,50 b	59,58 b	17,22 a	4,71 b
3,0mM	17,69 a	8,37 a	37,95 a	3,12 a	137,58 a	66,79 a	17,27 a	5,21 a
CV %	34,45	27,98	30,03	11,06	8,96	15,4	11,02	8,98

CV = Coeficiente de variação. D – Diâmetro, C+1 - Comprimento da folha diagnóstico (+1), L+1 - Largura da folha diagnóstico (+1), Nf- Número de folhas, MSPA-Massa seca da parte aérea, MSR- Massa seca da raiz. CV = coeficiente de variação. Valores médios de 8 repetições. Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Skott Knott ($p \leq 0.05$). Valores médios de 8 repetições.

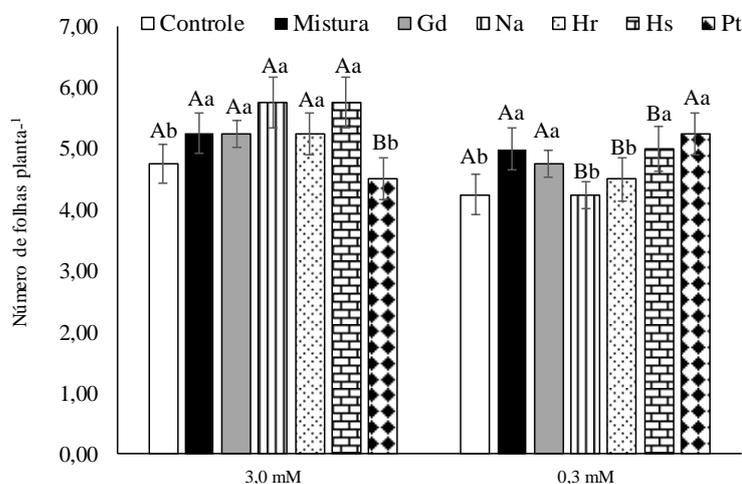


Figura 14. Desdobramento da interação significativa entre dose de nitrogênio e inoculação no número de folhas das mudas de cana-de-açúcar, variedade RB867515 (experimento 4) aos 58 dias após transplântio para solução nutritiva de Hoagland modificada para 2 doses de N (0,3 e 3,0 mM) e aos 104 dias após a inoculação de bactérias diazotróficas e plantio dos mini-toletes. Letras iguais maiúsculas entre dose e minúsculas dentro de cada dose não diferem estatisticamente pelo teste Skott-Knott ($p \leq 0.05$). Valores médios de 4 repetições.

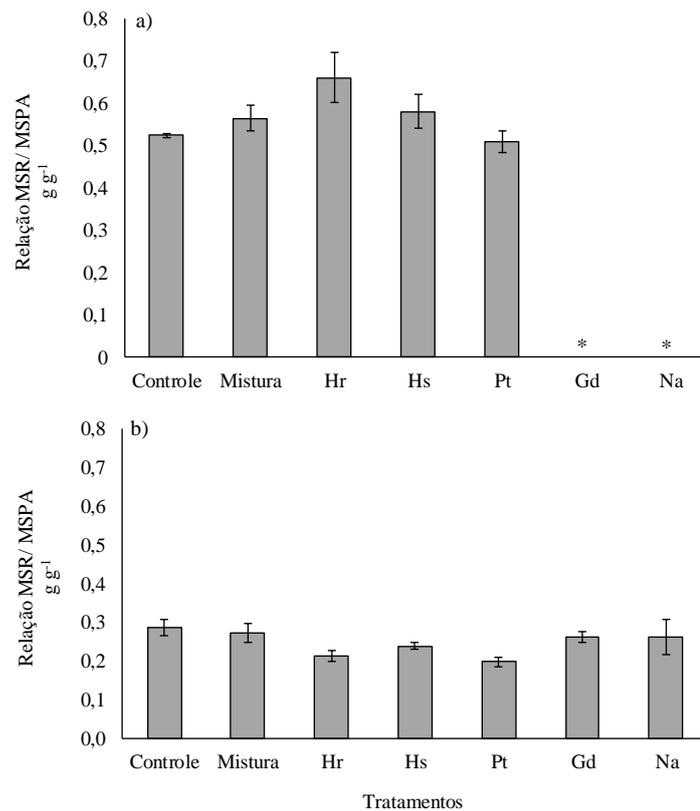


Figura 15. Relação entre massa seca de raiz e parte aérea (MSR/MSPA) de mudas de cana-de-açúcar, variedade RB966928 (a) e RB867515 (b) após cultivo em sistema hidropônico e inoculadas com bactérias diazotróficas descritas na Tabela 2 de forma isolada e um tratamento contendo o inoculante misto (mistura) com as cinco estirpes bacterianas. (*) A falta dos tratamentos Na e Gd na figura (a) indica que eles não fizeram parte no experimento de hidroponia na variedade RB966928. Valores médios de 4 repetições.

Quando o acúmulo de biomassa foi analisado de forma conjunta, foi possível observar que o efeito da inoculação da mistura das cinco estirpes bacterianas provocou um comportamento diferente nas variedades durante as fases de cultivo (Figura 16). A variedade RB867515 apresentou incremento da inoculação na MSR e MSPA em todas as fases de cultivo, sendo os maiores valores observados na biomassa radicular e logo após a brotação, 16 dias após o plantio (DAP).

Na variedade IACSP95-5000, a inoculação promoveu incrementos positivos nas fases de brotação e tubetes, com maiores valores também na biomassa da raiz e durante a fase inicial (brotação). No entanto, na fase de hidroponia (mudas aos 105 DAP), a inoculação não promoveu efeito na MSPA e reduziu a MSR. As variedades RB92579 e RB966928 apresentaram a MSR incrementada pela inoculação em todas as fases de cultivo, sendo os maiores valores na RB92579 nas fases iniciais (brotação e tubetes) e na RB966928 após cultivo em hidroponia, 78 DAP e inoculação, já a MSPA foi reduzida em ambas as variedades logo após a brotação, com maiores incrementos apenas após a fase de hidroponia (Figura 16).

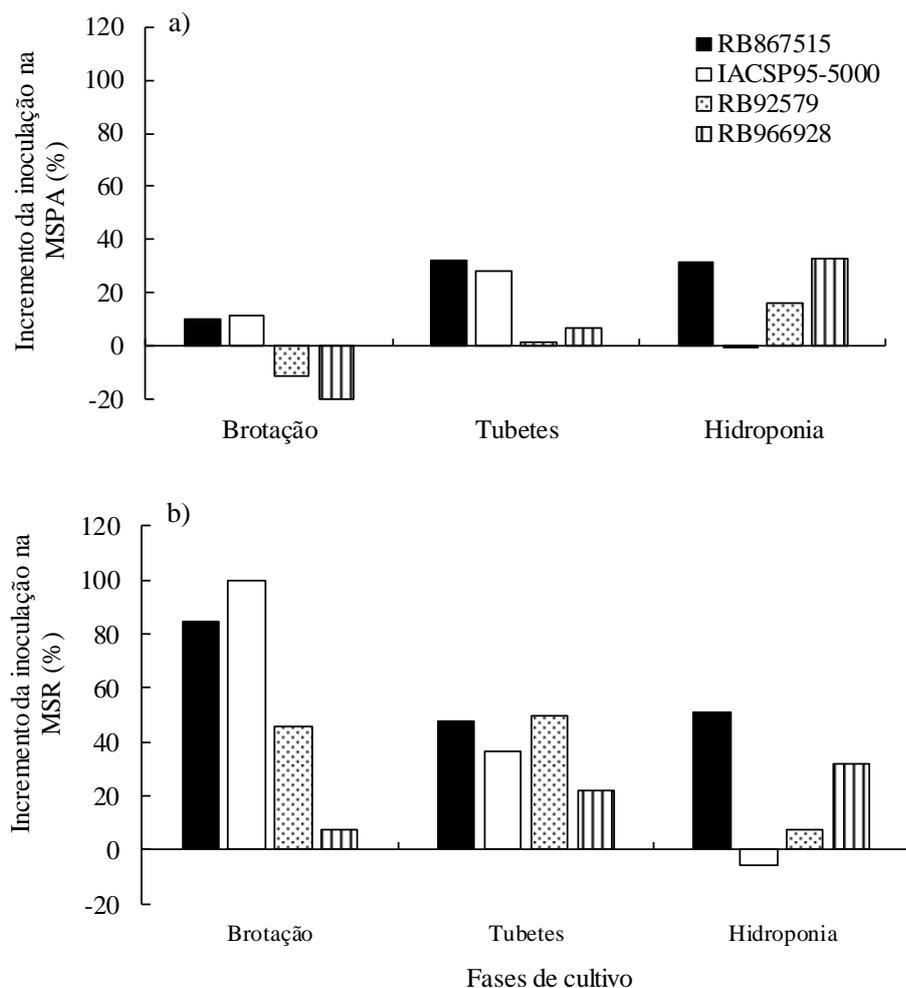


Figura 16. Percentual de incremento na massa seca da parte aérea-MSPA (a) e na massa seca de raiz-MSR (b) de variedades de canas-de-açúcar inoculadas com a mistura das cinco estirpes bacterianas (vide Tabela 2) em relação ao tratamento controle após as três fases de cultivo das mudas. Valores médios de 4 repetições na fase de brotação, 5 na fase de tubetes e de 10 na fase de hidroponia.

A resposta das variedades à inoculação da mistura bacteriana no acúmulo de biomassa seca na fase de hidroponia apresentou efeito em relação à dose de N (Figura 17). A variedade RB867515 apresentou o dobro do incremento de massa seca de raiz na presença da dose alta de N (3,0mM) em relação à dose baixa (Figura 17 b) e pouca diferença na MSPA foi observada em relação às doses de N (Figura 17 a). As mudas inoculadas da variedade IACSP95-5000 apresentaram redução na MSR e aumento na MSPA na presença da dose baixa de N (0,3mM) e o inverso ocorreu quando as mudas foram cultivadas em solução nutritiva contendo 10 vezes mais de N (3,0mM). A variedade RB92579 apresentou maiores incrementos da inoculação na biomassa radicular e aérea sobre baixa dose de N, sendo que houve redução na MSR na presença da dose alta de N. Já a variedade RB966928 apresentou um incremento de mais de 100% na MSR na presença de baixo N e de apenas 10% na presença da dose alta de N, reduzindo em 10 vezes o efeito da inoculação, entretanto na MSPA o maior incremento foi na presença da maior dose de N (Figura 17).

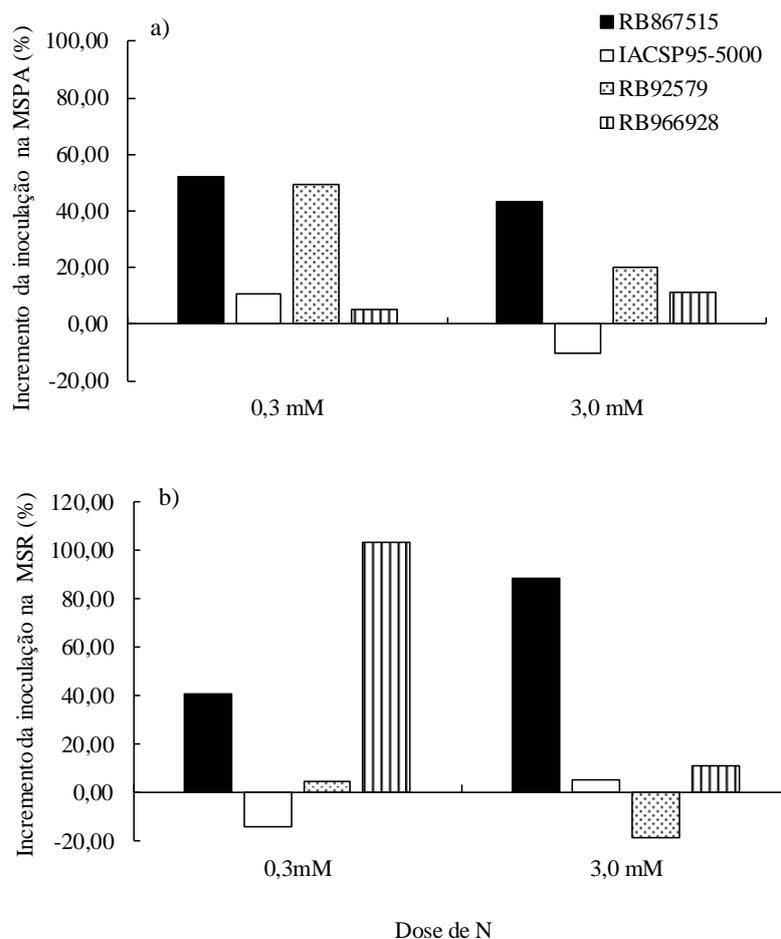


Figura 17. Percentual de incremento na massa seca da parte aérea-MSPA (a) e na massa seca de raiz-MSR (b) de variedades de canas-de-açúcar inoculadas com a mistura das cinco estirpes bacterianas (vide Tabela 2) em relação ao tratamento controle após as três fases de cultivo das mudas. Valores médios de 5 repetições.

O efeito da inoculação de bactérias diazotróficas no desenvolvimento das plantas, em especial, do sistema radicular é comparado a aplicação de substâncias promotoras de crescimento vegetal pela capacidade que essas bactérias em produzir e excretar diversos hormônios vegetais (SPAEPEN et al., 2009).

Um estudo que avaliou o efeito da inoculação mista e isolada de ácidos húmicos (AH) e da bactéria *H. seropedicae*, estirpe HRC54, no sistema radicular da variedade BR72-454 de cana-de-açúcar realizado por Junior et al. (2008) mostrou uma modificação significativa no crescimento e na arquitetura do tecido radicular dos micros toletes da cultura pela aplicação de AH, de *H. seropedicae* e pelo uso conjunto de substâncias húmicas e da bactéria. Observaram-se incrementos que variaram de 60 a 118 % no comprimento das raízes e de 33 até 233 % na área radicular dos tratamentos em relação às plantas-controle, com efeitos mais pronunciados em plantas tratadas termicamente. Os resultados verificados no sistema radicular foram atribuídos ao efeito estimulante do AH, que pode agir de forma similar à aplicação de hormônios vegetais no crescimento das plantas e que não diferiu da aplicação da estirpe bacteriana, já que a mesma é capaz de produzir e excretar auxinas e outros hormônios vegetais ao meio. Os autores relacionaram a maior área e comprimento radiculares das plantas tratadas e inoculadas à presença de maior número de raízes finas, fisiologicamente mais ativas e capazes de explorar melhor o substrato ou o solo e que o tratamento térmico é importante na

redução da população nativa de bactérias do tolete e que pode afetar o estabelecimento e efeito da bactéria de interesse.

Os resultados verificados de até 100% na biomassa das raízes, 48% na área radicular e de 70% no comprimento de raízes finas das plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com a mistura bacteriana no presente estudo podem ser atribuídos também à produção de hormônios vegetais pelas bactérias, pois as cinco estirpes bacterianas que compõe o inoculante misto usado nesse estudo produzem compostos indólicos *in vitro* (CHAVES et al., 2015). Nos quatro ensaios desse estudo foi realizado a termoterapia dos toletes de cana-de-açúcar antes da inoculação, haja vista a sua importância no controle da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, que causa raquitismo da soqueira, uma importante doença que afeta significativamente a cultura, além do efeito na redução da população nativa de bactérias associadas a cana-de-açúcar que pode favorecer a associação das bactérias inoculadas pela redução da competição (JUNIOR et al., 2008).

A raiz é o tecido que tem apresentado maior sensibilidade à aplicação de bactérias diazotróficas (MEDEIROS et al., 2012; PATTEN et al., 2013; SPAEPEN et al., 2014), assim como observado no presente estudo. Alguns autores referem esse efeito à capacidade dessas bactérias de produzir hormônios vegetais, especialmente auxinas (CASSAN et al., 2014), e sua ação no crescimento e na arquitetura radicular das plantas (SPAEPEN et al., 2014). Overvoorde et al. (2010) cita que, dentre os vários hormônios responsáveis pelo desenvolvimento dos vegetais, a auxina possui efeito dominante na emissão de raízes laterais, regulando, ou pelo menos influenciando, todas as etapas de formação das raízes.

De acordo com Woodward & Bartel, (2005) o ácido-indol-3-acético (AIA), principal auxina relacionada ao crescimento vegetal e produzida também por bactérias, possui uma grande influência na morfologia radicular das plantas, sendo os efeitos no alongamento celular observados em concentrações nanomolares e o aumento gradativo reflete na emissão de raízes laterais.

Nesse sentido, Spaepen et al. (2014), utilizando a estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasiliense* e um mutante (FAJ0009) com baixa capacidade de síntese de auxina em plântulas de *Arabidopsis thaliana*, observaram maior conteúdo de auxinas no interior das raízes, redução no comprimento da raiz principal e o maior número de raízes laterais e pelos radiculares nas plantas inoculadas com a estirpe selvagem. Além disso, a arquitetura do sistema radicular semelhante entre o controle e o mutante defectivo para produção de auxinas confirmaram a hipótese dos autores de que a produção de auxinas é um dos principais mecanismos envolvidos na promoção de crescimento de plantas por bactérias. Mesmo mecanismo pode ser atribuído a modificação nos parâmetros radiculares observados pela inoculação da mistura bacteriana nas variedades de cana-de-açúcar estudadas.

Além disso, de acordo com Vasconcelos e Garcia. (2005), os fatores genéticos e ambientais regulam o desenvolvimento do sistema radicular da cana-de-açúcar, podendo alterar entre variedades e dentro da própria variedade devido a interação genótipo-ambiente, e também com a idade da planta. Quando se refere às raízes primárias, ou do tolete, como são conhecidas, essa variação pode ocorrer ainda devido às características do tolete. O tolete é a unidade propagativa da cana-de-açúcar que contém a gema e os primórdios radiculares em seu estado latente, que para passar para seu estado ativo de crescimento depende da disponibilidade de água e da ação das enzimas e hormônios vegetais que controlam a divisão e crescimento celular, e ainda a quantidade de reserva nutricional do tolete (JADOSKI et al., 2012). Sendo assim, a inoculação de bactérias, que produzem hormônios reguladores de crescimento vegetal, como as apresentadas na Tabela 5, podem aumentar e/ou modificar o desenvolvimento inicial de cana-de-açúcar e assim alterar alocação de biomassa dependendo das características genéticas de cada variedade e das condições ambientais.

Os efeitos proporcionados pela inoculação de bactérias diazotróficas no sistema radicular das plantas de cana-de-açúcar é promissor, em especial, quando associado ao sistema MPB (LANDELL et al., 2012), que preconiza a formação de mudas com sistema radicular vigoroso que favoreça rápida adaptação em campo e que suportem as condições adversas do meio. Além disso, plantas com melhor arquitetura radicular, especialmente com raízes mais finas, como o efeito observado na variedade RB867515 pela inoculação da mistura bacteriana, podem explorar melhor o solo e assim serem mais eficientes na aquisição e absorção de água e nutrientes, e conseqüentemente apresentar melhor desenvolvimento e acúmulo de nutrientes pela cultura.

De acordo com Van Noordwijk (1993), as raízes finas são as mais importantes no sistema radicular para a absorção de água e nutrientes pelas plantas, denominadas como raízes funcionais. Em plantas lenhosas perenes existe uma distinção mais clara de raízes funcionais, que são as raízes menos espessas e de curta duração, que apresentam geralmente entre 1 a 3 mm de espessura, enquanto que em plantas herbáceas de curta duração ou perene, como a cana-de-açúcar, não existe tal distinção clara, portanto, considera as raízes finas aquelas que apresentam menores que 2 mm de espessura. Desta maneira, a variedade RB867515 apresentou maior comprimento de raízes funcionais quando inoculada.

Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas na absorção de N e desenvolvimento de cana-de-açúcar foram apresentados por Suman et al. (2005) após experimentos em vasos com solo e variedades de cana indiana até aos 90 dias após o plantio. Os autores observaram que a inoculação de isolados de *G. diazotrophicus* aumentou a absorção de nitrogênio (N) em até 164,97%, dependendo da dose de N aplicado no plantio e que se relacionou com o aumento da matéria seca das plantas, apresentando incrementos em até 48,86%, em relação às plantas não inoculadas. Além disso, a inoculação dos isolados aumentou o número de brotos na cultura. Os resultados foram atribuídos à produção de hormônios vegetais pelas bactérias, dentre outros fatores, e à sua ação no processo de germinação e no desenvolvimento radicular das plantas.

Chaves et al. (2015) avaliaram a germinação e desenvolvimento de genótipos brasileiros de cana-de-açúcar em caixas com areia e vermiculita estéril até aos 14 dias após o plantio e observaram que a inoculação de *G. diazotrophicus*, estirpe BR11281^T (Gd) aumentou a velocidade de brotação nas variedades RB867515 e IACSP95-5000 e biomassa apenas na variedade IACSP95-5000, mas não aumentou o número de brotos e nenhuma das variedades. No entanto, neste estudo, essa mesma estirpe aumentou em 22% a biomassa de raiz na variedade RB867515, sem efeito na parte aérea em mudas 16 dias após o plantio, porém foi a que apresentou menor incremento em relação a inoculação das estirpes Hr, Hs e Pt e aplicação da mistura. Oliveira et al. (2002) já tinha observado em plântulas micro propagadas da variedade SP 70-1143 de cana-de-açúcar que a inoculação de *G. diazotrophicus* promoveu a diminuição no acúmulo de partes aérea aos 200 dias após o plantio, mas estimulou o aumento na produção de matéria seca de raízes em comparação com plantas não inoculadas (dados não mostrados).

O efeito inicial no desenvolvimento do sistema radicular, juntamente com outros efeitos promovidos por BPCV (SPAEPEN et al., 2007; GLICK, 2012) modificaram o desenvolvimento da parte aérea das mudas das variedades RB867515 e IACSP95-5000 após cultivo em tubetes. O aumento na largura da folha +1 e no diâmetro das mudas inoculadas dessas variedades podem se relacionar a melhoria na nutrição das plantas, uma vez que o aumento radicular pode promover maior absorção de nutrientes, como N (SUMAN et al., 2005), aliada à FBN (OLIVEIRA et al., 2002) e a outros mecanismos pelos quais essas bactérias podem melhorar a fisiologia das plantas (MEDEIROS et al., 2012). Além disso, segundo Sinclair et al. (2004), o desenvolvimento da área foliar é fundamental na produção agrícola para maximizar a interceptação de radiação solar e o acúmulo de biomassa na plantas e

genótipos, que apresentam maior área foliar na fase inicial de desenvolvimento pode influenciar na cobertura do dossel e na quantidade de radiação solar que pode ser interceptada pela cultura, sendo portanto, a área foliar uma característica incluída na seleção de genótipos para o alto rendimento da cana-de-açúcar. Ferreira et al. (2007) relata também que a altura e o diâmetro do colmo são variáveis que podem se correlacionar positivamente com aumento de produtividade da cana-de-açúcar.

Alguns efeitos significativos apenas na variedade RB867515 e não verificados nas demais demonstram o que já é bastante comum na literatura, em que a resposta de cana-de-açúcar a inoculação de bactérias diazotróficas, assim como em outras culturas é dependente das características do genótipo e da interação específica planta-bactéria (OLIVEIRA et al. 2006; PEREIRA et al., 2013; CHAVES et al., 2015). Ademais, o tempo de desenvolvimento das mudas foi diferente nos experimentos, podendo, dessa forma, ter influenciado nos resultados. As variedades IACSP5-5000 e RB867515 (experimento 2) quando avaliadas estavam com 46 dias após o plantio (DAP), sendo 30 dias após transplantio (DAT) para tubetes, enquanto que as variedades RB92579 e RB966928 (experimento 3) estavam com 32 DAP e 20 dias após cultivadas em tubetes, diferenças que podem ser verificadas pelos menores valores de biomassa das mudas do experimento 3 em relação ao experimento 2.

A aplicação da mistura bacteriana em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 cultivadas aos 50 dias em substrato Basaplant e avaliadas por Gírio et al. (2015) aumentou em aproximadamente 100% a biomassa seca das raízes e em 140% a biomassa seca da parte aérea em relação às plantas não inoculadas. Já, no presente estudo, os incrementos pela inoculação da mistura em mudas aos 46 dias foram de 30 e 40%, sendo o maior valor verificado na MSR.

O efeito da dose de N na resposta de variedades de cana-de-açúcar a inoculação de bactérias diazotróficas, como observado no acúmulo de biomassa e número de perfilhos, é mais um indicativo que o N regula a interação das bactérias com a planta. Já foi verificado que melhores resposta de inoculação de bactéria na cana ocorre em solos de baixa fertilidade (OLIVEIRA 2003;2006) ou quando aplicado até 50% da dose de N recomendada à cultura (SUMAN et al., 2013; GÍRIO et al., 2015).

Um estudo mais específico de caracterização da via de sinalização de N em cana-de-açúcar na presença de bactérias diazotróficas realizado por Bomfim (2013), através da análise de expressão gênica relacionada à via de assimilação e metabolismo de N em dois genótipos contrastantes de cana-de-açúcar quanto a FBN, SP70-1143 (alta FBN) e Chunee (baixa FBN), no qual foram utilizados tecidos de plantas colonizadas ou não por bactérias diazotróficas, mostrou que raízes da variedade SP70-1143 apresentaram maior expressão de genes do metabolismo de N. A autora relacionou o resultado à maior eficiência da variedade SP70-1143 na associação com as bactérias. Mostrou também que o receptor LRRK, SHR5 envolvido negativamente no estabelecimento das bactérias foi induzido em plantas colonizadas na presença de altos níveis de N (5mM). Identificaram, ainda, fatores de transcrição WRKY, genes R envolvidos na defesa vegetal sendo regulados em altos níveis de NO_3^- e sugeriu, portanto, que na presença de alta dose de N (NO_3^-) ocorre a ativação de vias de defesa em plantas colonizadas por bactérias diazotróficas.

No presente estudo, a ausência de resposta ou efeito negativo da inoculação das bactérias em alguns genótipos na presença da alta dose de N (3,0mM) possivelmente está relacionado a um controle genético de estabelecimento e ação das bactérias como observado por Bomfim, (2013) e que pode variar ainda em função do genótipo, como verificado por Lery et al. (2011), em que a variedade SP70-1143 que possui alta taxa de FBN expressa principalmente proteínas relacionadas à resistência ao estresse e sinalização à colonização bacteriana, enquanto Chunee que apresenta baixa FBN expressa proteínas envolvidas em respostas a defesa.

De acordo com Kraiser et al. (2011), o N regula a interação das bactérias diazotróficas com plantas não leguminosas. O nitrogênio pode modificar a expressão de genes envolvidos na sinalização da interação planta-bactéria e altas concentrações de nitrato e/ou amônio podem reduzir a FBN, através da repressão de genes relacionados à ativação da enzima nitrogenase nas bactérias. Dessa forma, o N pode afetar a quantidade, diversidade e atividade das bactérias associadas com as plantas.

Suman et al. (2005; 2008; 2013) observaram em variedades de canas indianas que a população de *Gluconacetobacter diazotrophicus* é maior em plantas cultivadas em solo com 75 Kg N ha⁻¹ e que a inoculação dessa bactéria promoveu maiores incrementos na biomassa, FBN, absorção e acúmulo de N na presença de 75 Kg N ha⁻¹ em relação a 150 Kg N ha⁻¹ ou a não aplicação de N na cultura.

As doses de N usada no presente estudo foi 8,4 Kg N ha⁻¹ (0,3mM) e 84 Kg N ha⁻¹ (3,0mM), sendo que a dose recomendada para cultura no Brasil é de 60 a 100 Kg N ha⁻¹ (ROBINSON et al., 2011), desta forma a inoculação de bactérias diazotróficas pode apresentar efeito mesmo quando associada a aplicação de N, contudo, priorizando a redução de insumos e de impactos ambientais provenientes da produção de adubos nitrogenados o uso de bactérias diazotróficas deve ser mais interessante quando associado ao menor uso de N, no entanto em sistema em que o aumento do N expressa ganho de produtividade pode se associar maiores quantidades de N com a inoculação a fim de obter maiores rendimentos. No entanto, a característica do genótipo será fundamental, pois como demonstrado na figura 19 apenas a variedade RB867515 foi capaz de manter altos incrementos na biomassa devido a inoculação na presença da dose 3,0mM de N (84 Kg N ha⁻¹).

4.2. Metabolismo de Nitrogênio e Acúmulo de Nutrientes na Matéria Seca das Mudanças de Cana-de-açúcar

4.2.1. Atividades das enzimas nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS) em folha e raiz

A atividade das enzimas NR e GS, nas variedades RB867515 e IACSP95-5000 (experimento 2), foram afetadas pela inoculação da mistura das cinco estirpes de bactérias diazotróficas e pela dose de N (Tabela 12). Mudanças das duas variedades foram transplantadas do tubete para o sistema hidropônico 20 dias após a germinação. Durante a fase de hidroponia, que teve duração de 59 dias, foram realizadas três coletas de tecidos foliares e de raiz para avaliação da atividade enzimática.

A primeira coleta foi realizada aos 30 dias após o transplante para a solução nutritiva ocasião em que as mudas estavam supridas com 3,0mM de N. Logo nessa primeira coleta foi possível observar que as mudas da variedade IACSP95-5000 apresentaram maior atividade da enzima NR na folha do que a RB867515, mas a RB867515 apresentou maior atividade de GS. A inoculação reduziu significativamente a atividade da NR na raiz das mudas (Tabela 12) com interação significativa entre variedade e inoculação (V*I), mostrando que esse efeito ocorreu apenas na variedade IACSP95-500, com redução de 29% (Figura 18a). Entretanto, a inoculação aumentou significativamente em 28% a atividade de GS na folha das duas variedades (Tabela 12). Observou-se, ainda, que as folhas apresentaram em até 5 vezes maior atividade de NR que as raízes, já a atividade de GS foi similar em ambos os tecidos.

Tabela 12. Atividade da enzima nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS) em mudas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas (mistura bacteriana, vide Tabela 2) durante o desenvolvimento em solução nutritiva durante 25 dias sobre 3,0 mM de nitrogênio (coleta 1) e após 72 h sob restrição do nutriente (coleta 2) e após 26 dias sobre as doses 3,0 e 0,3mM de N. Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem pelo teste F a 5% de probabilidade. Valores médios de 24 repetições.

		NR		GS	
		$\mu\text{moles de NO}_2\text{- h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ massa fresca		$\mu\text{moles de y GM min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ proteína	
		Folha	Raiz	Folha	Raiz
Coleta 1	RB867515	0,85 b	0,19 a	0,09 a	0,07 a
	IACSP95-5000	1,02 a	0,20 a	0,07 b	0,07 a
	Controle	0,92 a	0,20 a	0,07 b	0,07 a
	Inoculado	0,94 a	0,18 b	0,09 a	0,07 a
	CV%	13,01	15,78	22,65	29,45
Coleta 2	RB867515	0,84 a	0,12 a	0,11 a	0,07 a
	IACSP95-5000	0,91 a	0,10 a	0,11 a	0,06 a
	Controle	0,82 b	0,11 a	0,10 b	0,06 a
	Inoculado	0,93 a	0,11 a	0,12 a	0,07 a
	CV%	21,22	32,34	28,52	38,48
Coleta 3	RB867515	0,36 b	0,14 a	0,07 a	0,10 a
	IACSP95-5000	0,44 a	0,14 a	0,06 a	0,09 a
	Controle	0,38 b	0,14 b	0,06 b	0,09 a
	Inoculado	0,43 a	0,15 a	0,08 a	0,10 a
	0,3mM	0,23 b	0,14 b	0,06 a	0,01 a
	3,0 mM	0,53 a	0,15 a	0,07 a	0,01 a
	CV%	19,89	4,35	25,58	25,11

A segunda coleta ocorreu após a retirada do N da solução nutritiva durante 72h, nessa circunstância as variedades RB867515 e IACSP95-5000 não apresentaram diferenças na atividade das duas enzimas estudada, mas a inoculação promoveu incremento de 13% na atividade da NR e 20% na GS em folhas das duas variedades (Tabela 12). Ocorreu ainda uma interação significativa entre variedade e inoculação (V*I) para atividade da enzima NR na raiz, sendo que as mudas da variedade RB867515 apresentaram 50% de incremento pela inoculação, enquanto que na variedade IACSP95-5000 a atividade dessa enzima foi reduzida em 75% (Figura 18b).

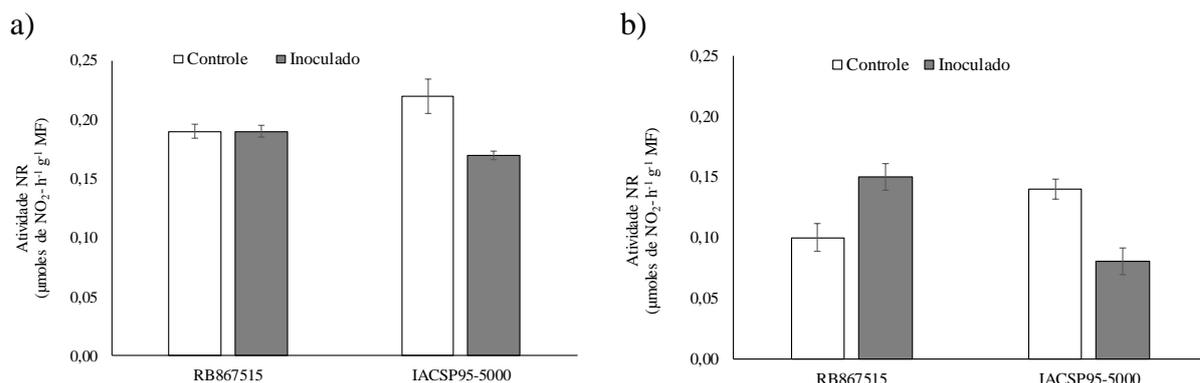


Figura 18. Desdobramento da interação entre variedade e inoculação (mistura bacteriana, vide Tabela 2) para atividade da enzima nitrato redutase (NR) em raízes de mudas de cana-de-açúcar, variedades RB867515 e IACSP95-5000 (experimento 2) após crescimento durante 30 dias sobre 3,0mM de N (a) e após 72 horas em solução sem N (b). Valores médios de 12 repetições. A barra significa o erro padrão.

Após a retirada do N da solução nutritiva durante 72h, as mudas foram novamente supridas do nutriente, através de duas doses, alta (3,0mM) e baixa (0,3mM). Nessas condições permaneceram durante 26 dias, quando foi feita a terceira coleta.

A dose de nitrogênio afetou significativamente a atividade da enzima NR, sem efeito na atividade da GS como demonstrado na Tabela 12. A atividade da NR apresentou maior sensibilidade ao N nas folhas que na raiz, evidenciado pelo incremento de 130% e 15%, respectivamente, quando as mudas foram crescidas sobre alta dose de N (3,0mM) em relação à dose baixa (0,3mM). Além disso, o N interagiu significativamente com os fatores variedades e inoculação na análise da enzima NR (Tabela 12).

A variedade RB867515 apresentou maior atividade da NR na folha do que a IACSP95-5000 (Tabela 12), no entanto a interação entre variedade e dose de N (V*N) mostrou que isso ocorreu apenas na presença da dose baixa de N, pois na dose alta a IACSP95-5000 apresentou maior atividade (Figura 19a). As folhas da variedade IACSP95-5000, quando as mudas foram cultivadas sobre a dose de 3,0mM de N, apresentaram aumento significativo de 52% na atividade da NR em relação à RB867515, já na presença da dose baixa (0,3mM) a variedade RB867515 apresentou maior atividade dessa enzima, com 36% de aumento em relação à IACSP95-5000, como demonstrado na figura 19a. Na raiz, foi observado efeito similar, contudo o incremento da IACSP95-5000 em relação à RB867515 sobre alta dose de N foi de apenas 7% e não apresentaram diferença quando ambas foram cultivadas na presença de baixa dose de N (Figura 19b).

A variedade IAC reduziu em 268% a atividade da NR nas folhas em função da redução na dose de N, 3,0 para 0,3mM, enquanto que a variedade RB reduziu em apenas 76% (Figura 19a). Na raiz apenas as plantas da variedade IAC reduziram em 15% a atividade da enzima em função do N, como apresentado na Figura 19b.

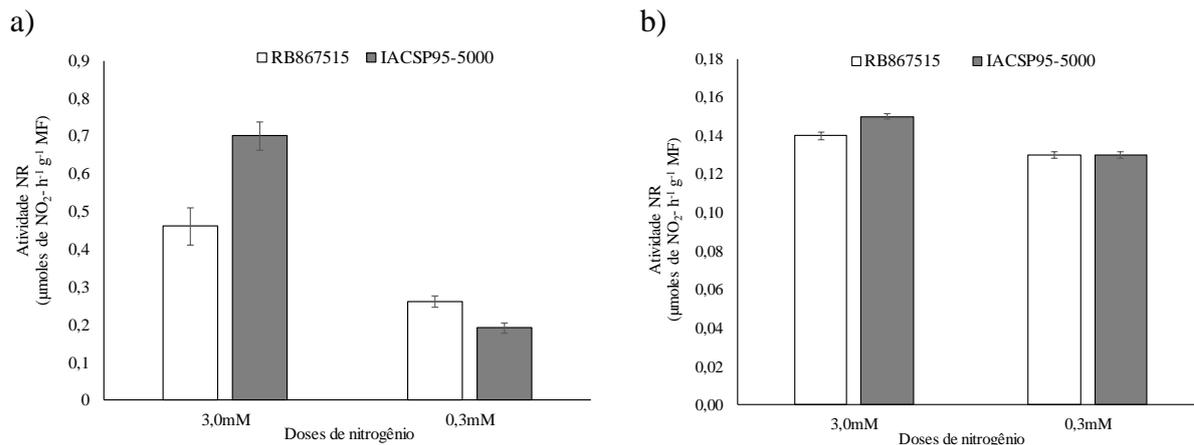


Figura 19. Desdobramento da interação entre variedade e nitrogênio para atividade da enzima nitrato redutase (NR) em folhas (a) e raízes (b) de mudas de cana-de-açúcar, variedades RB867515 e IACSP95-5000 (experimento 2) após 59 dias em solução nutritiva, sendo 30 dias com dose 3,0mM de N, depois retirado o N por 72h e suprido novamente com dose alta (3,0mM) e baixa (0,3mM). Valores médios de 12 repetições. A barra significa o erro padrão.

A aplicação do inoculante misto de bactérias diazotróficas aumentou a atividade da enzima NR em folhas e raiz das mudas, dependendo da dose de N, e promoveu incremento na atividade da enzima GS nas folhas das duas variedades em 33% em relação às plantas controle, independente da dose de N (Tabela 12).

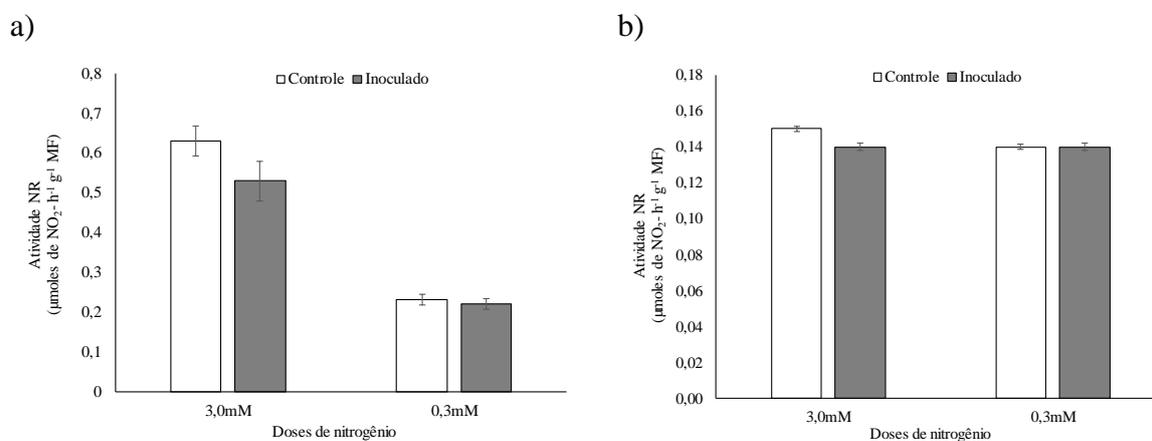


Figura 20. Desdobramento da interação entre inoculação (mistura bacteriana, vide Tabela 2) e dose de nitrogênio (I*N) para atividade da enzima nitrato redutase (NR) em folhas (a) e raízes (b) de mudas de cana-de-açúcar, variedades RB867515 e IACSP95-5000 (experimento 2) após 59 dias em solução nutritiva, sendo 30 dias com dose 3,0mM de N, depois retirado o N por 72h e suprido novamente com dose alta (3,0mM) e baixa (0,3mM) (coleta 3). Valores médios de 12 repetições. A barra significa o erro padrão.

No terceiro ensaio em que foi usado as variedades RB 92579 e RB966928 inoculadas ou não com a mistura de bactérias diazotróficas, só foi observado diferença significativa da inoculação na atividade da enzima NR e após a terceira coleta, condições em que as plantas estavam supridas com doses diferentes de nitrogênio (Tabela 13). Nesta ocasião, verificou-se interação significativa entre variedade e inoculação, variedade e nitrogênio e inoculação e N.

Não foi verificada diferença entre as variedades em relação à atividade de NR e GS, mas da dose de N na atividade da NR nas folhas. As mudas das duas variedades cultivadas sobre a dose alta de N (3,0mM) apresentaram o dobro da atividade da NR em relação às mudas sobre baixa dose de N (0,3mM) como apresentado na Tabela 13.

A interação significativa entre o tratamento de inoculação e a dose de N (I*N) mostrou que a inoculação de bactérias diazotróficas reduziu a atividade da NR nas folhas das variedades RB867515 e IACSP95-5000 na presença da dose alta de N (3,0mM) em aproximadamente 12% em relação ao controle, sem diferença na dose baixa (0,3mM) (Figura 20a). O mesmo comportamento foi observado na atividade da enzima na raiz, porém a redução foi de aproximadamente 7% (Figura 20b).

A atividade da enzima NR nas folhas das mudas das duas variedades foi significativamente reduzida em relação a disponibilidade de N na solução nutritiva, essa redução ocorreu de forma similar nas plantas controle e inoculada em aproximadamente 150% devido à redução em 10 vezes da dose de N na solução nutritiva (Figura 20a), já na raiz não ocorreu redução na atividade da NR em função da dose de N (Figura 20b). Na Figura 19, foi possível observar ainda que essa redução da atividade da NR ocorreu de forma diferente nas duas variedades, sendo a variedade IACSP95-5000 a que apresentou maior sensibilidade.

Tabela 13. Atividade da enzima nitrato redutase (NR) e glutamina sintetase (GS) em mudas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas (mistura bacteriana, vide Tabela 2) durante o desenvolvimento em solução nutritiva durante 25 dias sobre 3,0 mM de nitrogênio (1 coleta) e após 72h sob restrição do nutriente (coleta 2) e após 18 dias sobre as doses 3,0 e 0,3 mM de N. Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem pelo teste F a 5% de probabilidade. Valores médios de 20 repetições.

		NR		GS	
		μmoles de NO ₂ - h ⁻¹ g ⁻¹ massa fresca		μmoles de γ-GM min ⁻¹ μg ⁻¹ proteína	
		Folha	Raiz	Folha	Raiz
Coleta 1	RB92579	1,01 a	0,14 a	0,065 a	0,084 a
	RB966928	0,91 a	0,14 a	0,061 a	0,081 a
	Controle	0,92 a	0,14 a	0,062 a	0,080 a
	Inoculado	1,00 a	0,14 a	0,064 a	0,086 a
	CV%	32,47	10,23	25,32	32,49
Coleta 2	RB92579	0,41 a	0,13 a	0,081 a	0,046 a
	RB966928	0,49 a	0,13 a	0,084 a	0,043 a
	Controle	0,45 a	0,14 a	0,082 a	0,044 a
	Inoculado	0,46 a	0,14 a	0,084 a	0,045 a
	CV%	34,35	10,34	29,17	45,39
Coleta 3	RB92579	0,81 a	0,16 a	0,040 a	0,076 a
	RB966928	0,67 a	0,17 a	0,037 a	0,062 a
	Controle	0,74 a	0,15 b	0,036 a	0,070 a
	Inoculado	0,75 a	0,17 a	0,041 a	0,068 a

Continua...

Continuação da **Tabela 13**.

		NR		GS	
		$\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ massa fresca		$\mu\text{moles de } \gamma\text{-GM min}^{-1}$ μg^{-1} proteína	
		Folha	Raiz	Folha	Raiz
Coleta 3	0,3mM	0,49 b	016 a	0,038 a	0,061 a
	3,0 mM	0,99 a	0,17 a	0,038 a	0,078 a
	CV%	47,70	14,13	36,80	44,37

O desdobramento da interação entre variedade e inoculação (Figura 21) mostrou que apenas a variedade RB966928 apresentou incremento significativo da inoculação na atividade da NR nas raízes e esse aumento correspondeu à aproximadamente 26%. As variedades RB92579 e RB966928 apresentaram atividade da NR na raiz de forma semelhante quando na presença da dose alta de N. Porém quando se reduziu para 0,3mM, a atividade na variedade RB966928 foi maior (Figura 22a) e a inoculação só apresentou efeito nessa variedade na presença de baixa dose de N (Figura 22b), indicando que essa variedade pode apresentar uma maior eficiência no uso de N que a variedade RB92579 e a inoculação podem melhorar a assimilação de N em de baixa disponibilidade de N, o que pode promover melhor desenvolvimento vegetal nessas condições, como foi verificado maior acúmulo de biomassa radicular na variedade RB966928 quando inoculada sobre baixa dose de N, o que se relaciona com a maior atividade dessa enzima nas mesmas condições.

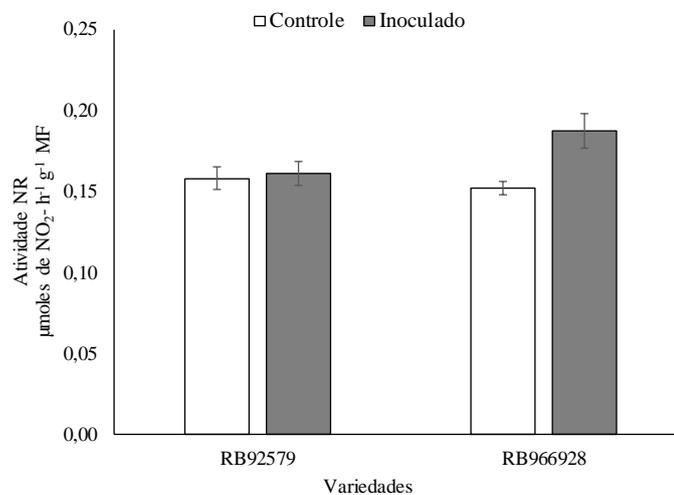


Figura 21. Desdobramento da interação entre variedade e inoculação (mistura bacteriana, vide Tabela 2) para atividade da enzima nitrato redutase (NR) em raízes de mudas de cana-de-açúcar, variedades RB92579 e RB966928 (experimento 3) após 46 dias em solução nutritiva, sendo 25 dias com dose 3,0mM de N, depois retirado o N por 72h e suprido novamente com dose alta (3,0mM) e baixa (0,3mM) (coleta 3). Valores médios de 10 repetições. A barra significa o erro padrão.

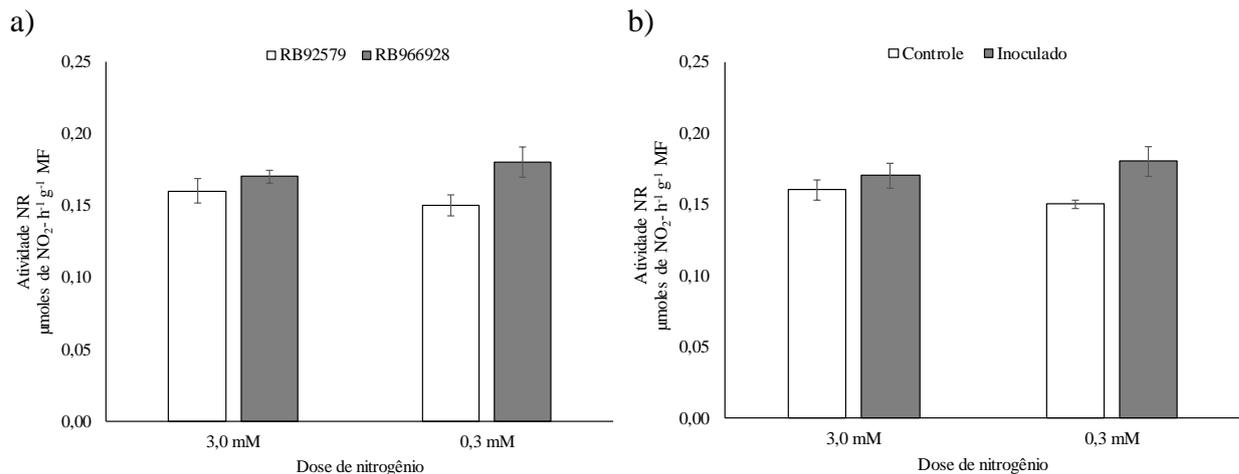


Figura 22. Desdobramento da interação entre variedade e dose de nitrogênio (a) e entre inoculação (mistura bacteriana, vide Tabela 2) e dose de N (b) para atividade da enzima nitrato redutase (NR) em raízes de mudas de cana-de-açúcar, variedades RB92579 e RB966928 (experimento 3) após 46 dias em solução nutritiva, sendo 25 dias com dose 3,0mM de N, depois retirado o N por 72 h e suprido novamente com dose alta (3,0mM) e baixa (0,3mM) (coleta 3). Valores médios de 10 repetições. A barra significa o erro padrão.

Assim como observado nos experimentos anteriores em que respostas positivas e significativas na atividade da enzima NR aconteceram sobre restrição de N, nos ensaios em que foi avaliado a atividade dessa enzima através da inoculação das estirpes de forma isolada e da mistura nas variedades RB966928 (experimento 1) e RB867515 (experimento 2) (Figura 23) foi verificado efeito semelhante.

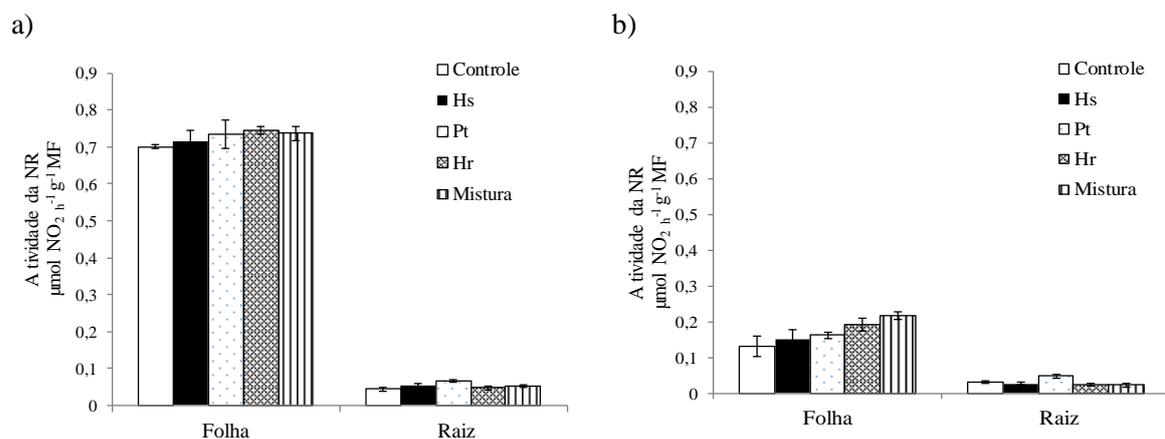


Figura 23. Atividade da enzima nitrato redutase em mudas de cana-de-açúcar, variedade RB966928 inoculadas com as bactérias diazotróficas isoladas e um tratamento contendo as cinco estirpes bacterianas (mistura, vide Tabela 2). Plantas cultivadas durante 40 dias em solução nutritiva de Hoagland modificada com 3mM de nitrogênio. Coleta realizada 24 horas (a) e 7 dias (b) após a troca de solução. Valores médios de 4 repetições. A barra significa o erro padrão.

Mudas inoculadas com a mistura bacteriana e a estirpe Hr de forma isolada na variedade RB966928 apresentaram maior atividade da enzima redutase do nitrato na folha, enquanto que na raiz a inoculação da estirpe Pt foi superior, sendo esse efeito observado apenas quando as plantas estavam sobre restrição de N, aos 7 dias após a troca da solução nutritiva e reposição dos nutrientes (Figura 23b) em relação a coleta realizada logo após as 24 h da troca da solução em que as bactérias não afetaram a atividade da enzima (Figura 28 a). Pode-se perceber pela redução nos valores da atividade da enzima NR em até 7 vezes aproximadamente, entre a coleta feita após as 24 h e a realizada após 7 dias da troca da solução nutritiva, que a quantidade de N na solução afetou o conteúdo de nitrato interno nas plantas e essa condição foi necessária para que as bactérias modificassem significativamente a atividade dessa enzima nas mudas.

As mudas da variedade RB867515 (experimento 4) sobre alta dose de N (3,0Mm) apresentaram redução significativa na atividade da NR nas folhas, mas sobre baixa dose de N não foi verificada diferença significativa. No entanto, a inoculação da estirpe Hs promoveu incremento de aproximadamente 50% em relação ao tratamento controle (Figura 24), corroborando com os resultados dos outros experimentos já apresentados que o efeito positivo das bactérias diazotróficas na atividade da enzima redutase ocorre sobre restrição de N.

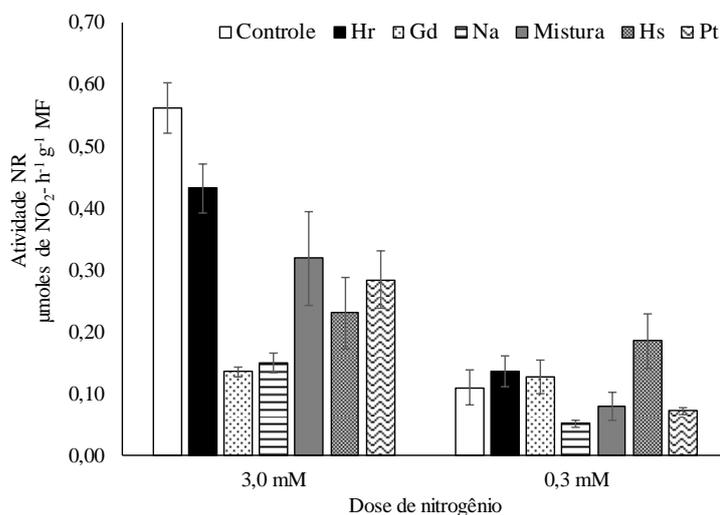


Figura 24. Atividade da enzima nitrato redutase (NR) em folhas de cana-de-açúcar variedade RB867515 aos 104 dias após o plantio e inoculação de bactérias diazotróficas isoladas e uma mistura das cinco estirpes (vide Tabela 2). Plantas aos 58 dias após cultivo em solução nutritiva, sendo 30 dias fornecido solução com 3,0 mM de nitrogênio, depois solução sem N por 72 h e permanecendo durante 25 dias com a solução alta (3mM) e baixa (0,3mM) de N. Valores médios de 4 repetições. A barra significa o erro padrão.

A atividade da enzima GS novamente foi influenciada pela inoculação das bactérias diazotróficas (Figura 25), assim como a dose de N (Figura 26), sendo os maiores valores observados em mudas cultivadas sobre alta dose de N em relação à dose baixa. A inoculação das estirpes Na, Gd, Hs e da mistura aumentaram significativamente a atividade da enzima GS na folha com incrementos entre 42 a 70%, sendo o maior valor observado pela inoculação da mistura (Figura 25), esses mesmo tratamentos foram os que apresentaram maior acúmulo de biomassa e crescimento das mudas, mostrando que a atividade da enzima GS pode ser uma variável que se relaciona com o efeito da inoculação das bactérias no desenvolvimento de cana-de-açúcar.

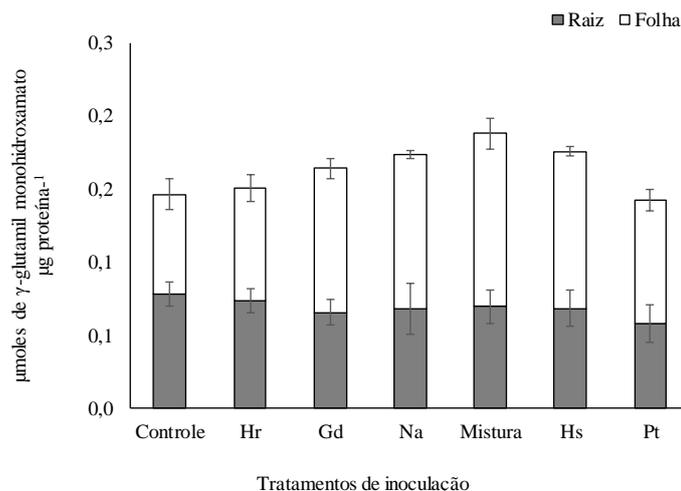


Figura 25. Atividade da glutamina sintetase (GS) em folhas e raízes de cana-de-açúcar variedade RB867515 aos 104 dias após o plantio e inoculação de bactérias diazotróficas isoladas e uma mistura das cinco estirpes (vide Tabela 2). Plantas aos 58 dias após cultivo em solução nutritiva, sendo 30 dias fornecido solução com 3,0 mM de nitrogênio, depois solução sem N por 72 h e permanecendo durante 25 dias com a solução alta (3mM) e baixa (0,3mM) de N. Valores médios de 8 repetições. A barra significa o erro padrão.

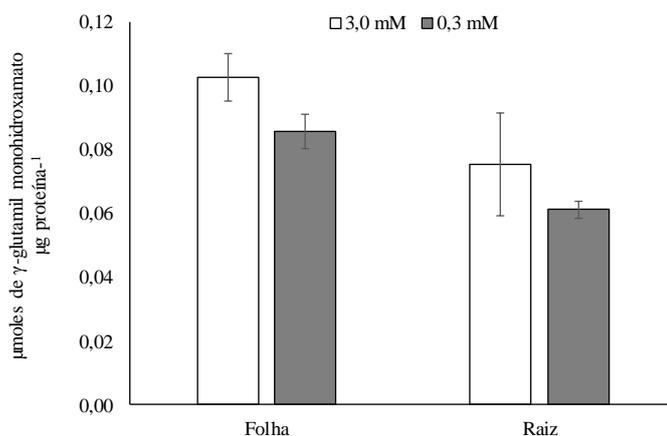


Figura 26. Efeito da dose de nitrogênio na atividade da glutamina sintetase (GS) em folhas e raízes de cana-de-açúcar variedade RB867515 aos 104 dias após o plantio e inoculação de bactérias diazotróficas (mistura bacteriana, vide Tabela 2) e aos 58 dias após cultivo em solução nutritiva, sendo 30 dias fornecido solução com 3,0 mM de nitrogênio, depois solução sem N por 72 h e permanecendo durante 25 dias com a solução alta (3mM) e baixa (0,3mM) de N. Valores médios de 8 repetições. A barra significa o erro padrão.

As enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase são enzimas chaves envolvidas no metabolismo de N. A atividade dessas enzimas é influenciada por diversos fatores relacionados a planta e as condições ambientais, especialmente pela concentração do substrato, nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+), respectivamente (TISCHNER, 2000; MIFLIN e HABASH, 2002).

A atividade da enzima bastante superior nas folhas em relação à raiz demonstra que esse é o local preferencial de assimilação de nitrogênio em cana-de-açúcar. Como observado por Ishikawa et al. (2009), a cultura acumula pouco nitrato nas folhas em consequência do

rápido metabolismo do mesmo ao chegar no tecido, o que corrobora com a alta atividade da enzima NR nas folhas observado nesse estudo. De acordo com Bredemeier e Mundstock (2000), o nitrato e/ou amônio ao ser absorvido pelas plantas podem ser assimilados na própria raiz ou ser transportados para parte aérea ou ainda armazenados no vacúolo em condições de maior disponibilidade. O local de assimilação pode variar em função da espécie, estágio de desenvolvimento e condições ambientais (MILLER e CRAMER, 2004), e linhagens que prioriza assimilação na parte aérea podem ser selecionadas visando reduzir as exigências energéticas e o aumento de produtividade, uma vez que o nitrato reduzido nas raízes consome aproximadamente o dobro de energia do que quando assimilado nas folhas.

Trabalho realizado por Urriola e Rathore (2015) com plantas modificadas de sorgo com atividade da enzima GS 2,2 vezes superior às plantas selvagens (controle) mostrou que as plantas com maior atividade de GS apresentaram maior perfilhamento e maior acúmulo de biomassa (2,1 vezes) que plantas controle, além de maior rendimento de grãos. Contudo, foram dependentes das condições ambientais (sazonalidade e disponibilidade de N), mostrando que há uma complexidade entre a atividade de GS e o maior crescimento e desenvolvimento das plantas. No presente estudo, a variedade RB867515 apresentou maior atividade de GS que a IAC na primeira coleta, condição em que as plantas foram supridas durante 30 dias com alta dose de N (3,0 mM), e as plantas inoculadas de ambas as variedades apresentaram maior atividade que a planta controle nas três coletas. Os resultados de GS se relacionaram com o crescimento das plantas em que a variedade RB 867515 apresentou maior altura, comprimento, largura e número de folhas que a IAC. A inoculação também proporcionou maior massa MSR e número de perfilhos às mudas, dependendo da dose de N aplicado, mostrando que a atividade de GS pode se relacionar ao maior crescimento das plantas, mas depende de outros fatores, assim como foi verificado por Urriola e Rathore (2015).

De acordo com Miflin e Habash (2002), a enzima glutamina sintetase (GS, E.C. 6.3.1.2) é responsável por catalisar a reação entre amônio e glutamato para formação de glutamina, dependente de energia (ATP), e posteriormente a formação de glutamato pela ação da enzima GOGAT (glutamina 2-oxoglutarato aminotransferase) e outros aminoácidos e seus metabólitos (BREDEMEIER e MUNDSTOCK, 2000). Portanto, a atividade de GS pode se relacionar com a eficiência de uso de N nas plantas, pois a atividade dessa enzima mostra a capacidade das plantas em utilizar o N disponível (NO_3^- e NH_4^+ , pois o primeiro precisa ser reduzido a amônio para ser assimilado) através da incorporação em formas orgânicas que serão usadas no metabolismo e desenvolvimento dos vegetais.

A seleção de genótipos de milho baseia-se na menor acumulação de NH_4^+ livre no tecido e maior atividade da enzima GS no tecido verde da planta, indicando que a atividade de GS pode ser um bom parâmetro para selecionar genótipos responsivos a aplicação de N (BREDEMEIER e MUNDSTOCK, 2000), nesse sentido pode ser usado também para avaliar a aplicação de bactérias diazotróficas que contribui com aumento do N nas plantas (CARVALHO et al., 2014).

Em hipótese, bactérias diazotróficas também podem se relacionar com a alteração na assimilação de nitrogênio em plantas, através do favorecimento a maior absorção de formas de N (KRAISER et al., 2011), especialmente pela produção de hormônios vegetais e seu efeito no sistema radicular (SPAEPEN et al, 2009; 2014), além da contribuição direta de NH_4^+ via FBN (PANKIEVICK, 2015). Dessa maneira, essas bactérias podem promover aumento no conteúdo de nitrato e amônio na planta hospedeira (CARVALHO et al., 2014) e induzir a expressão de genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de nitrogênio.

Marcos et al. (2015) verificaram que a aplicação de um inoculante misto contendo 5 bactérias promotoras de crescimento vegetal aumentou a atividade da enzima nitrato redutase

nas folhas de mudas da variedade IACSP95-5000 em aproximadamente 100% cultivadas em uma mistura de solo, areia e vermiculita, porém não foi verificado efeito na variedade IACSP94-2094 indicando que o efeito das bactérias no metabolismo de N é dependente da característica do genótipo, assim como já tinha sido demonstrado por Donato et al.(2004) em que dentre 5 genótipos a variedade RB 842021 apresentou a maior atividade da nitrato redutase relacionado ao aumento no conteúdo de clorofila, e a variedade RB 882980 a maior atividade da glutamina sintetase nas mesmas condições de cultivo, o que pode representar maior potencial de assimilação do nitrogênio nessas variedades e ser atribuído pelo menos em parte a melhor associação desses genótipos com bactérias fixadoras de nitrogênio.

Estudo realizado por Nogueira et al. (2001) demonstrou que há alguns genes envolvidos no metabolismo de N de cana-de-açúcar que são expressos exclusivamente ou de forma diferenciada quando a planta é inoculada com bactérias diazotróficas, incluindo os envolvidos com a biossíntese de aminoácido, absorção e redução de nitrato, transporte e sinalização.

Lery et al. (2011) verificaram também que cana-de-açúcar logo após as 24h de inoculação da bactéria *G. diazotrophicus* (PAL5) modificou a expressão de proteínas relacionadas a diversas vias metabólicas, incluindo a de glutamina sintetase, enzima envolvida na biossíntese de aminoácidos. Observaram, ainda, que a resposta à inoculação da bactéria ocorreu de forma diferenciada no genótipo comercial SP70-1143(*Saccharum* híbrido) que possui alta contribuição da FBN e Chunee (*Saccharum barberi*) que apresenta baixa FBN. As proteínas expressas por cada genótipo durante a interação com *G. diazotrophicus* mostraram essa diferença na resposta. O genótipo mais responsivo, SP70-1143, expressou principalmente proteínas relacionadas à resistência ao estresse e sinalização a colonização bacteriana, já Chunee alterou a expressão de proteínas envolvidas em respostas a defesa, sugerindo que SP70-1143 diferente de Chunee reconhece *G. diazotrophicus* como uma bactéria benéfica.

Plantas do Genótipo SP70-1143 cultivadas a campo apresentaram expressão do gene scGS1.b nas folhas aumentada em 13 vezes em relação as plantas aos 15 dias após germinadas, enquanto que em Chunee não foi observado alteração, além disso a expressão desse mesmo gene é regulada por amônio em SP70-1143 e não em Chunee o que sugere que a expressão de scGS1.b em parte pode estar relacionada a assimilação do amônio da FBN. O gene scGS1.b é um dos cinco genes descritos que codifica a isoforma citossólica (GS1) da enzima glutamina sintetase em cana-de-açúcar que tem função de assimilar o amônio diretamente absorvido do solo, da FBN e remobilização (NOGUEIRA et al., 2005).

A maior atividade de GS nas plantas inoculadas pode em parte ser explicada pela maior expressão das enzimas nas plantas que são induzidas por bactérias que são capazes de fornecer $N-NH_4^+$ através da FBN (PANKIEVICZ et al., 2015) e aumentar a absorção de outras formas de N (MANTELIN e TOURAINÉ, 2003). O aumento da atividade da NR na variedade RB867515 (Figura 20b) e redução na IAC (Figura 20 a e b) devido a inoculação pode se relacionar as diferenças genéticas que influencia desde a associação com a bactéria, como demonstrado por Lery et al. (2011) até acúmulo de biomassa e produtividade em campo (PEREIRA et al. 2013). A variedade RB que aumentou a atividade da NR nas raízes também acumulou maior MSR, e a variedade IAC que reduziu a atividade da NR, não apresentou diferença na biomassa de raiz (Figura 12).

A baixa influência da dose de N sobre a atividade da enzima GS em relação a NR pode estar relacionada com a pequena quantidade de amônio na solução nutritiva em relação a nitrato, sendo que a mesma apresenta 5 vezes mais NO_3^- do que NH_4^+ . O amônio é o substrato da enzima GS e um dos principais fatores regulatório da expressão e atividade dessa enzima (MIFLIN e HABASH, 2002), entretanto, mesmo com baixa quantidade de amônio fornecida a planta através da solução nutritiva, se propôs a estudar a atividade dessa enzima, pois outras fontes de amônio podem ser fornecidas indiretamente a planta, por exemplo, o nitrato

absorvido é reduzido a nitrito pela enzima nitrato redutase e posteriormente a amônio pela enzima nitrito redutase, além disso amônio pode ser fornecido diretamente pela FBN.

Resultados distintos observados entre os genótipos na atividade das enzimas GS e NR demonstram como as características genéticas das variedades influenciam na assimilação do N, pois a variedade IACSP95-5000 indicada para ambientes com melhores condições de fertilidade apresentou maior atividade da enzima NR sobre alta disponibilidade de N, já em condições de limitação a variedade RB867515, que é considerada rústica, foi a que apresentou melhores resultados, o que já era esperado para ambas as variedades, dessa maneira podemos inferir que a resposta a inoculação de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos pode ocorrer de forma similar, regulada por mecanismos genéticos semelhantes em que a variedade RB867515 foi mais responsiva a inoculação que a IACSP95-5000.

Donato et al. (2004) avaliou 5 genótipos de cana-de-açúcar quanto a atividade das enzimas do metabolismo de N, NR e GS e verificaram que a variedade RB 842021 apresentou maior atividade da NR dentre genótipos avaliados (RB 842021, RB 83102, RB 75126, RB 882980 e Co 997). O estudo foi conduzido *in vitro* sob doses crescente de N (0 a 9,83 mM) e a atividade da NR variou entre 44 e 206 $\mu\text{moles/gmf/h}$ e GS de 37 a 220 nmoles GGH/g/min , de acordo com a dose de N e o genótipo avaliado. Os autores atribuíram a maior atividade da NR na variedade RB 842021 a maior taxa fotossintética, através dos maiores valores de clorofila a e b e massa seca, com base nisso, podemos inferir que no presente estudo em condição de maior disponibilidade de N a variedade IACSP95-5000 apresenta maior eficiência na redução do nitrato, já que apresentou maior atividade da enzima NR, entretanto, a variedade RB867515 apresenta maior eficiência de assimilação, pois apresentou maior atividade de GS, e sobre baixa dose de N a variedade RB867515 apresenta ainda maior atividade da NR, o que indica que a variedade RB867515 pode ser mais eficiente no uso de nitrogênio e pode explicar também a maior respostas a inoculação de bactérias fixadoras de N em comparação a variedade IACSP95-5000, pois a maior atividade das enzimas NR e GS se relacionaram com o maior desenvolvimento das mudas, verificado pelos maiores valores de altura, comprimento e largura da folha +1, número de folhas e perfilhos na variedade RB867515 apenas. Marcos et al. (2015) também verificaram que o aumento na atividade da enzima NR nas folhas da variedade IACSP95-5000 não afetou o acúmulo de biomassa e desenvolvimento das mudas, podendo essa variável não apresentar uma relação direta com o desenvolvimento inicial das mudas.

Sinha et al. (2015) estudaram o desenvolvimento de dois genótipos de trigo responsivos a aplicação de N em fase de plântula (14 dias) e verificaram que o genótipo mais eficiente no uso de N apresentou alta redução na atividade das enzimas NR e GS, quando se reduziu em 100X a concentração de N na solução, no entanto, apresentou menor redução na biomassa e crescimento. Nesse estudo, com genótipos de cana mais (IACSP95-5000) e menos (RB867515) responsivos a fertilidade do solo a maior redução na atividade da enzima NR em função da redução em 10x do N da solução nutritiva foi verificado na variedade IACSP95-5000, entretanto, a redução do N não afetou o acúmulo de biomassa nos dois genótipos. Quando na presença do inoculante as mudas inoculadas apresentaram menor redução na atividade da NR em função da redução do N em comparação as mudas não inoculadas, sendo que a redução do N promoveu redução no número de perfilhos apenas nas mudas controle. Sendo o nitrogênio um dos fatores que regula o perfilhamento em cana-de-açúcar (JADOSKI et al., 2010), as mudas inoculadas com bactérias diazotróficas que aumentaram o perfilhamento sobre a baixa disponibilidade de N poderá estar mais nutrida, corroborando com as evidências que essas bactérias melhora a absorção, assimilação, e acúmulo de N nas plantas (LERY et al., 2011; BOMFIM, 2011; KRAISER et al., 2011; CARVALHO et al., 2014; MARCOS et al., 2015).

A atividade da NR nas raízes das mudas no experimento 4 foi muito baixa o que não possibilitou a estimativa pela metodologia proposta, possivelmente relacionada a idade da planta, uma vez que a atividade na raiz é normalmente em torno de 10 vezes menor que nas folhas, e se sabe que essa atividade reduz em função da idade da planta. Santos et al. (2014) verificaram que em cana-de-açúcar os maiores valores de atividade da NR nas folhas ocorrem em plantas jovens podendo reduzir em até 80% na fase de maturação. A avaliação das mudas no presente estudo ocorreu aos 104 dias após o plantio, as mudas já apresentavam desenvolvimento dos colmos e como a atividade da enzima é bem menor nas raízes, a baixa atividade encontrada nesse tecido é esperada.

A redução na atividade da NR nas folhas das plantas inoculadas, no presente estudo pode estar relacionada ao aumento nos teores de glutamina e outros aminoácidos pelo aumento na atividade de GS que exerce um efeito regulatório na atividade da NR. Em uma revisão de literatura Tischner, (2000) relata que a indução da enzima NR é inibida pela produção de compostos nitrogenados reduzidos como amônio e aminoácidos, sendo a glutamina e asparagina os principais, ocorrendo um controle na expressão de genes de NR a fim de controlar a produção excessiva de aminoácido, uma vez que alto conteúdo de aminoácido reduz a absorção de N nas plantas, possivelmente através da inibição da ação dos transportadores de NO_3^- na membrana (BREDEMEIER e MUNDSTOCK, 2000).

4.2.2. Frações solúveis

Os teores de nitrato (N-NO_3^-), amônio (N-NH_4^+), aminoácidos livres (N-amino) e açúcares solúveis totais foram estimados em folhas e raízes das plantas de cana-de-açúcar. O nitrogênio na forma de amônio não foi detectado nos tecidos de nenhuma das variedades nos três experimentos em que foram avaliados.

As mudas apresentaram baixos teores de nitrato nas folhas em relação as raízes sendo até 10 vezes inferiores, esses valores se relacionaram com a alta atividade da enzima NR na folha que foi superior na mesma grandeza em comparação a atividade nas raízes. Tecidos radiculares apresentaram maiores valores de N-amino e menores valores de açúcares solúveis em comparação aos tecidos foliares (Tabela 14 e 15).

Os teores de açúcares solúveis não foram afetados significativamente ($p < 0,05$) pela inoculação apenas pela dose de N e variedades. O uso da dose alta de N (3,0mM) aumentou em até 40% os teores de N-NO_3^- e reduziu em aproximadamente 30% os teores de açúcares solúveis nas raízes em comparação com a dose baixa, 0,3mM de N (Tabelas 14 e 15), sendo o aumento significativo para açúcares solúveis apenas para variedades RB867515 e IACSP95-5000. O aumento dos teores de N-NO_3^- nas raízes e conseqüentemente a redução nos teores de açúcares solúveis já era esperado pois o aumento de N-NO_3^- possivelmente aumentou o consumo de esqueleto de carbono usado para assimilação do nitrogênio e, portanto, reduziu a concentração de açúcares solúveis (SANTOS et al., 2006). De modo semelhante, a variedade RB92579 apresentou maiores valores de N-NO_3^- e N-amino nas raízes e menores valores de açúcares nas folhas quando comparado a RB966928 (Tabela 15), mostrando que as variedades diferem em relação ao processo de assimilação e remobilização de N, em que os processos bioquímicos do desenvolvimento que envolve assimilação e remobilização de N estariam ocorrendo de forma mais intensiva na variedade considerada tardia (RB92579).

Tabela 14. Frações solúveis em tecidos frescos de folhas e raízes durante o desenvolvimento das mudas de cana-de-açúcar inoculadas ou não com a mistura de bactérias diazotróficas (vide Tabela 2) e crescida em solução nutritiva durante 30 dias sobre 3,0mM de nitrogênio (1 coleta), após 72 h sob restrição do nutriente (coleta 2) e após 26 dias sobre resuprimento com as doses 3,0 e 0,3mM de N. Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem pelo teste F a 5% de probabilidade. Valores médios de 12 repetições. CV = coeficiente de variação.

		N-NO ₃ ⁻		N-amino		Açúcares	
		μmoles de NO ₃ ⁻ g ⁻¹ massa fresca		μmoles de N-amino g ⁻¹ massa fresca		mg de glicose g ⁻¹ massa fresca	
		Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz
Coleta 1	RB867515	0,73 a	6,64 a	9,94 a	19,57 a	20,24 a	5,32 a
	IACSP95-5000	0,70 a	7,21 a	11,10 a	16,73 b	16,79 b	6,17 a
	Controle	0,67 a	6,97 a	10,21 a	17,11 a	17,70 a	6,10 a
	Inoculado	0,75 a	6,82 a	10,82 a	19,19 a	19,73 a	5,40 a
	CV%	21,94	22,78	29,26	25,66	25,49	35,21
Coleta 2	RB867515	0,26 a	2,86 a	18,04 a	26,27 a	14,41 a	7,96 a
	IACSP95-5000	0,29 a	2,82 a	18,53 a	23,97 a	16,74 a	7,36 a
	Controle	0,20 b	3,14 a	18,25 a	22,26 b	14,76 a	7,69 a
	Inoculado	0,35 a	2,54 a	18,33 a	27,98 a	16,38 a	7,63 a
	CV%	40,2	41,29	32,67	35,98	29,41	28,65
Coleta 3	RB867515	0,93 a	2,88 a	27,71 a	26,29 a	17,13 a	9,46 a
	IACSP95-5000	0,87 a	3,05 a	27,37 a	29,41 a	19,01 a	8,29 a
	Controle	0,83 b	3,44 a	28,69 a	28,55 a	17,29 a	8,82 a
	Inoculado	0,97 a	2,50 b	26,38 a	27,15 a	18,85 a	8,94 a
	0,3mM	0,88 a	2,42 a	27,77 a	27,36 a	18,02 a	10,02 a
	3,0 mM	0,92 a	3,51 a	27,31 a	28,33 a	18,12 a	7,74 b
	CV%	23,78	40,45	32,47	35,2	26,82	24,36

Tabela 15. Frações solúveis em tecidos frescos de folhas e raízes durante o desenvolvimento das mudas de cana-de-açúcar inoculadas ou não com a mistura de bactérias diazotróficas (vide Tabela 2) e crescida em solução nutritiva durante 25 dias sobre 3,0mM de nitrogênio (coleta 1), após 72 h sob restrição do nutriente (coleta 2) e após 18 dias sobre resuprimento com as doses 3,0 e 0,3mM de N. Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem pelo teste F a 5% de significância. Valores médios de 10 repetições. CV = coeficiente de variação.

		Nitrato		N-amino		Açúcares	
		$\mu\text{moles de NO}_3^- \text{ g}^{-1}$ massa fresca		$\mu\text{moles de N-amino g}^{-1}$ massa fresca		mg de glicose g^{-1} massa fresca	
		Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz
Coleta 1	RB92579	0,35 b	2,87 b	9,58 a	19,09 a	6,13 a	2,88 a
	RB966928	0,41 a	3,49 a	11,08 a	18,42 a	7,65 a	2,78 a
	Controle	0,37 a	3,55 a	10,15 a	19,40 a	7,13 a	2,57 a
	Inoculado	0,38 a	2,81 b	10,45 a	18,11 a	6,66 a	3,08 a
	CV%	17,82	30,21	42,21	34,55	49,06	46,89
Coleta 2	RB92579	0,31 a	2,07 a	26,45 a	36,94 a	10,79 a	1,68 a
	RB966928	0,33 a	1,65 a	26,20 a	40,30 a	10,32 a	1,97 a
	Controle	0,32 a	1,57 b	27,04 a	37,15 a	10,14 a	1,72 a
	Inoculado	0,33 a	2,15 a	25,61	40,09 a	10,97 a	1,92 a
	CV%	14,87	41,60	15,08	38,97	34,84	52,16
Coleta 3	RB92579	0,34 a	3,85 a	17,28 a	17,71 a	4,42 b	3,48 a
	RB966928	0,35 a	2,98 b	18,24 a	13,49 b	10,95 a	3,09 a
	Controle	0,35 a	3,35 a	15,77 b	15,73 a	8,07 a	3,08 a
	Inoculado	0,34 a	3,48 a	20,35 a	15,47 a	7,30 a	3,48 a
	0,3mM	0,32 a	2,42 b	18,40 a	16,97 a	7,99 a	3,78 a
	3,0 mM	0,37 a	4,19 a	17,70 a	14,23 a	7,39 a	2,78 a
	CV%	39,48	36,1	38,46	36,15	35,49	59,35

Plantas supridas com 3,0 mM de nitrogênio (coleta 1) e inoculadas da variedade RB867515 apresentaram maiores valores de N-amino nas raízes do que plantas não inoculadas como demonstrado através da interação significativa entre variedade e inoculação apresentado na Figura 27a. Mudas das variedades RB966928 e RB92579 reduziram significativamente os teores de N-NO_3^- na raiz (Tabela 15).

Após retirada do N da solução por 72 horas (coleta 2) a inoculação proporcionou aumento nos teores de N-NO_3^- na folha e N-amino nas raízes das duas variedades (IACSP-95-5000 e RB867515), o que pode indicar um maior processo de remobilização de nitrogênio da raiz pra parte aérea o que proporcionou maior teores de nitrato na folha e consequentemente maior assimilação do N, como foi verificado pelo aumento significativo na atividade das enzimas NR e GS (Tabela 12), já nas variedades RB966928 e RB92579 foi observado aumento significativo apenas dos teores de nitrato nas raízes (Tabela 15).

Após a terceira coleta, foi possível observar que os genótipos RB867515 e IACSP95-5000 quando inoculados reduziram significativamente os teores N-NO_3^- na raiz e aumentaram nas folhas, apresentaram também aumento nos teores de N-amino nas folhas e redução na raiz, no entanto não significativo ($P < 0,05$) (Tabela 14), corroborando com a hipótese que as plantas inoculadas apresentam maior remobilização do N da raiz para a parte aérea. Nas

variedades RB966928 e RB92579 a inoculação promoveu aumento nos teores de N-amino mais não afetou significativamente as outras frações solúveis (Tabela 15).

A interação significativa entre a dose de nitrogênio e inoculação para teores de nitrato nas raízes (Tabela 15) mostrou ainda que plantas inoculadas só reduziram os teores de N-NO_3^- na raiz na presença de alta dose de N (3,0 mM) como demonstrado na Figura 27b.

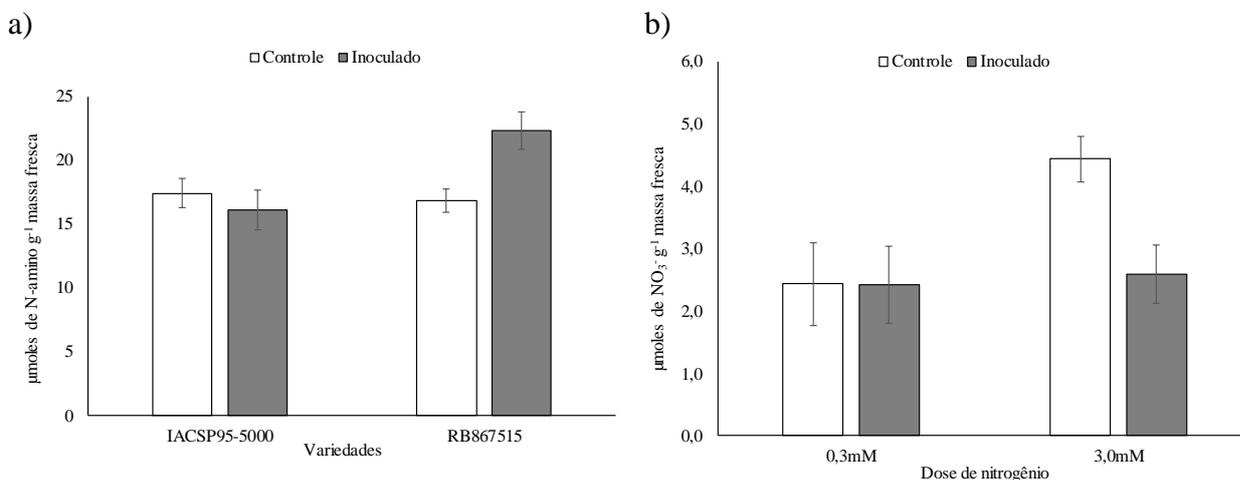


Figura 27. Desdobramento da interação entre variedade e inoculação (mistura bacteriana, vide Tabela 2) para teores de N-amino (a) e dose de nitrogênio e inoculação para teores de N-NO_3^- (b) em raízes de mudas de cana-de-açúcar (experimento 2) após 30 dias em solução nutritiva com dose 3,0mM de N (a), e após 59 dias em solução nutritiva, sendo 30 dias com dose 3,0mM de N, depois retirado o N por 72 h e suprido novamente com dose alta (3,0mM) e baixa (0,3mM) (b). Valores médios de 12 repetições. A barra significa o erro padrão.

O experimento de inoculação das estirpes individualizadas e da mistura das cinco estirpes na variedade RB867515 mostrou que as estirpes Na, Hr e Hs e a mistura promoveram redução significativa nos teores de açúcares nas folhas em relação ao controle e as estirpes Gd e Pt, essa redução foi acompanhada pelo aumento de N-NO_3^- e N-amino que não apresentaram valor significativo ($P < 0,05$), no entanto, o incremento observado foi de 13 a 26% para N-NO_3^- e 27 a 40% para N-amino, com os maiores valores obtidos pela inoculação da mistura (Tabela 16).

Tabela 16. Frações solúveis em tecidos frescos de folhas e raízes durante o desenvolvimento das mudas de cana-de-açúcar inoculadas ou não com bactérias diazotróficas (vide Tabela 2) e crescida em solução nutritiva durante 30 dias sobre 3,0mM, depois retirado o N por 72 h e resupridas durante 25 dias com as doses 3,0 e 0,3mM de nitrogênio (N). Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem pelo teste Skott-Knott a 5% de significância. Valores médios de 8 repetições. CV = coeficiente de variação.

Inoculação	Nitrato		N-amino		Açúcares	
	$\mu\text{moles de NO}_3^-$ g ⁻¹ massa fresca		$\mu\text{moles de N-amino}$ g ⁻¹ massa fresca		mg de glicose g ⁻¹ massa fresca	
	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz
Controle	0,15 a	2,15 a	7,84 a	10,83 a	3,26 a	1,17 a
Mistura	0,19 a	2,75 a	10,93 a	9,47 a	2,07 b	1,59 a
Hs	0,18 a	1,89 a	10,22 a	11,96 a	2,01 b	1,19 a
Hr	0,14 a	1,89 a	11,97 a	12,59 a	2,67 b	1,27 a
Na	0,17 a	1,65 a	10,03 a	9,12 a	2,14 b	1,23 a
Gd	0,15 a	1,01 a	9,17 a	12,21 a	2,69 a	1,52 a
Pt	0,10 a	2,76 a	8,60 a	9,35 a	3,12 a	1,29 a
Dose de N						
0,3 mM	0,13 b	0,76 b	9,73 a	9,57 b	2,64 a	1,24 a
3,0 mM	0,17 a	3,19 a	8,64 a	12,00 a	2,49 a	1,41 a
CV%	50,09	46,54	34,59	30,88	32,43	36,39

Teores de amônio não foi detectado nos tecidos vegetais, possivelmente relacionado ao fato da fração nitrogenada da solução nutritiva ser composta por apenas 17% de amônio e ainda por esse ser tóxico não é armazenado nos vegetais, sendo rapidamente assimilado, através da incorporação em esqueletos de carbono para formação de aminoácidos, como demonstrado pela atividade da glutamina sintetase, confirmando que N-NH₄⁺ estava presente mesmo em baixas concentrações, pois a atividade dessa enzima foi detectada com valores máximos de até 0,12 $\mu\text{moles de } \gamma\text{-glutamil monohidroxamato min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ proteína. Além disso, uma grande diversidade de espécies vegetais tem preferência na absorção de amônio em relação a nitrato, portanto, o amônio nesse estudo pode ter sido rapidamente assimilado em relação a nitrato. Robinson et al. (2011) observaram que logo após 30 minutos de contato com solução nutritiva contendo 1 mM de N na forma de nitrato de amônio, com nitrato (NH₄¹⁵NO₃) ou amônio marcado (¹⁵NH₄NO₃) raízes de cana-de-açúcar incorporaram mais N-amônio que N-nitrato.

Outros estudos já demonstraram que a cana-de-açúcar armazena preferencialmente o nitrato na raiz, sendo rapidamente assimilado ao chegar as folhas (ISHIKAWA et al., 2009), esse alto teor de nitrato nas raízes associado a baixa translocação para parte aérea, pode ainda está relacionado a redução na taxa de absorção devido ao controle que os níveis de nitrato têm sobre o sistema de transporte, e assim limitar a assimilação de nitrato na cultura (ROBINSON et al., 2011).

Como citado por Bredemeier e Mundstock (2000), durante o crescimento vegetativo é observado altas taxas de redução de nitrato e síntese de aminoácidos nas folhas, sendo que no mesmo local já é usada a maioria dos aminoácidos para a síntese de clorofila, rubisco e outras proteínas o que resulta em uma redução na quantidade de aminoácidos destinados as raízes.

Borges et al. (2006) verificaram que uma variedade de milho eficiente no uso de nitrogênio (Sol da Manhã) apresentou adaptação à condição de restrição do nutriente por sua

maior capacidade de acumular NO_3^- nas folhas no primeiro estágio de desenvolvimento vegetativo e remobilizá-lo no segundo estágio, apresentando um maior teor de N-amino nas folhas e bainhas do que o híbrido simples BRS 1010 descrito como de alto potencial de produção, quando sob menor dose de nitrogênio. Pensando nesse mesmo sentido, podemos inferir que a inoculação de bactérias diazotróficas pode melhorar a eficiência de uso de N em cana-de-açúcar, pois a mesma proporcionou aumento nos teores de N-NO_3^- e N-amino nas folhas na fase de mudas e que pode ser remobilizado posteriormente durante as fases mais avançada de desenvolvimento da cultura.

Esse resultado pode estar relacionado à indução de transportadores de nitrogênio da raiz para a parte aérea pela inoculação das bactérias diazotróficas que pode ser regulado pelo N, uma análise de expressão gênica de transportadores ajudaria esclarecer melhor tal efeito, entretanto, Nogueira et al. (2001) investigaram os perfis de expressão gênica de plantas de cana-de-açúcar colonizadas pelas bactérias *G. diazotrophicus* e *H. rubrisubalbicans* ambas constituintes do inoculante misto avaliado no presente estudo, através das sequências disponíveis em um banco de dados e verificaram que a cana mostrou expressão de genes relacionados a transporte de N ocorrendo de forma exclusiva ou diferenciada na presença da bactéria, assim como outros genes relacionados a enzimas de biossíntese de aminoácidos e absorção e redução de N, o que corrobora com a hipótese aqui apresentada, no entanto, trabalhos mais específicos são necessários para melhores esclarecimentos.

Um estudo realizado por Souza et al. (2015) que objetivou caracterizar o transporte de N em genótipos contrastantes de cana-de-açúcar a FBN, SP70- 1143 (alta FBN) e Chunee (baixa FBN) inoculados com *G. diazotrophicus* e com a mistura das 5 estirpes de bactérias diazotróficas, a mesma usada no presente estudo revelou que a inoculação das bactérias em experimento *in vitro* durante 30 dias favoreceu a expressão dos genes de transportadores de nitrato ScNRT1.1 e ScNRT2.1, e do transportador de amônio ScAMT1.1, o que resultou no maior influxo de N e acúmulo de ^{15}N -nitrato de amônio nas plantas do genótipo 'SP70-1143' apenas, indicando que bactérias diazotróficas induz a expressão de genes que melhora a absorção e transporte de N, mas depende da característica do genótipo, como observado no presente estudo em que a variedade RB867515, considerada responsiva a inoculação (SCHULTZ et al., 2012; PEREIRA et al, 2013; GÍRIO et al., 2015) apresentou maiores mudanças no metabolismo de N quando inoculada, com efeito dependente da dose de N aplicada.

De modo geral, as plantas inoculadas apresentaram maior biomassa radicular quando comparas as plantas controle, se o aumento radicular implica em aumento de absorção de N, nesse caso as plantas apresentariam maiores teores de N-NO_3^- , sendo que isso não foi observado, sugerindo que o N-NO_3^- pode ter sido melhor assimilado na raiz, como observado através do aumento significativo da atividade da NR, ou transportado para parte aérea de forma diferenciada, provocando aumento significativo de N-NO_3^- nas folhas. Esse efeito verificado nas variedades RB867515 e IACSP95-5000 e não observado nas variedades RB966928 e RB92579 acrescenta mais fundamento na hipótese de Oliveira et al. (2003; 2006) em que respostas de cana-de-açúcar a inoculação de bactérias diazotróficas é dependente da interação específica entre planta-bactéria a nível de genótipo e ainda pode ser atribuído também as condições climáticas em que o experimento foi desenvolvido, já que durante o inverno as baixas temperatura influenciaram bastante o desenvolvimento das plantas no experimento em que as variedades RB966928 e RB92579 foram avaliadas (experimento 3).

Nos quatro ensaios, a inoculação de bactéria diazotróficas modificaram os teores das frações solúveis nas variedades de cana-de-açúcar com maior efeito var. RB867515. Observou-se que geralmente o aumento de nitrato na folha não promoveu aumento na atividade da enzima NR indicando que o nitrato poderia ter sido armazenado no vacúolo

como um “pool” de reserva de N (RODRIGUES et al., 2004), ao contrário, observou-se redução significativa na atividade da NR através da inoculação, no entanto, o aumento de N-amino e redução de açúcares solúveis pode ser um indicativo de um maior processo de assimilação (SANTOS et al., 2006), pois a atividade da enzima GS na folha foi aumentada pela inoculação das bactérias, portanto, maior assimilação de N demanda esqueleto de carbono o que explica a redução de açúcares solúveis nas folhas das plantas inoculadas com as estirpes Na, Hr , Hs e a mistura. A redução na atividade da NR nas plantas inoculadas mesmo na presença de maiores quantidades de nitrato pode estar relacionada ao aumento nos teores de aminoácidos como, glutamina, pelo aumento na atividade de GS, que exerce um efeito regulatório na atividade da NR (TISCHNER, 2000).

O aumento da dose de N de 0,3mM para 3,0mM promoveu aumento nos teores de nitrato nas folhas e raízes e N-amino nas raízes das mudas, demonstrando que as plantas podem armazenar diferentes formas de N como estratégia para manter o equilíbrio entre os processos de absorção e assimilação, pois o N-NO_3^- funciona como indutor a atividade da enzima NR, enquanto que os aminoácidos agem como inibidores e ambos também podem regular a absorção de nitrogênio pelas plantas.

4.2.3. Acúmulo de nutrientes na massa seca das mudas

O acúmulo de nutrientes totais nas mudas de cana-de-açúcar alterou em função da variedade, da inoculação de bactérias diazotróficas e da dose de N (Tabela 16). O Potássio (K) foi o nutriente mais acumulado, seguido pelo nitrogênio (N) (Tabela 16 e 17). A variedade RB867515 apresentou maior acúmulo de nutrientes que a variedade IACSP95-5000, mesmo não apresentado diferença significativa no acúmulo de biomassa, no entanto foi possível observar incremento de 11% na MSPA e aumento significativo em outros parâmetros de crescimento como altura, número de folhas e perfilhos (Tabela 9), demonstrando que a variedade RB867515 pode ser uma variedade mais eficiente no uso de N. Do mesmo modo, a variedade RB966928 apresentou maior acúmulo de nutriente quando comparada com a variedade RB92579, associado ao maior acúmulo de biomassa e melhor desenvolvimento, o que nesse caso estar relacionado ao rápido desenvolvimento da variedade RB966928 em relação a RB92579, sendo a primeira considerada uma variedade precoce e a segunda tardia.

O aumento da dose de N promoveu incremento no acúmulo de nutriente em todas as variedades, no entanto, apenas nas variedades RB867515 e IACSP95-5000 (experimento 2) foi significativo. Já a inoculação promoveu efeito no acúmulo de nitrogênio (N) e fósforo (P) na variedade RB867515, de acordo com a interação significativa entre variedade e inoculação apresentado na Figura 28. Mudanças inoculadas apresentaram aproximadamente 23% de incremento no acúmulo de N e 16% de P.

Tabela 17. Acúmulo de nutrientes na matéria seca em variedades de cana-de-açúcar após cultivo em sistema hidropônico com solução de Hoagland modificada para duas concentrações de nitrogênio (0,3 e 3 mM) e inoculadas com o inoculante misto de bactérias diazotróficas (vide Tabela 2). Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem pelo teste F a 5% de significância. Valores médios de 24 (experimento 2) e 20 (experimento 3) repetições. CV = coeficiente de variação.

	Nitrogênio	Fósforo	Potássio
	----- mg planta ⁻¹ -----		
Experimento 2			
Variedades			
RB867515	368,06 a	97,88 a	658,55 a
IACSP95-5000	241,86 b	66,14 b	423,16 b
Inoculação			
Controle	307,29 a	81,35 a	540,00 a
Inoculado	309,17 a	82,67 a	541,71 a
Dose de Nitrogênio			
0,3 mM N	282,74 b	75,72 b	494,68 b
3,0 mM N	333,72 a	88,29 a	587,02 a
CV %	28,19	28,39	29,06
Experimento 3			
Variedades			
RB92579	227,47 b	60,98 b	312,92 b
RB9669280	308,90 a	84,57 a	438,89 a
Inoculação			
Controle	242,13 a	66,47 a	333,59 a
Inoculado	294,24 a	79,08 a	418,24 a
Dose de Nitrogênio			
0,3 mM N	254,40 a	69,62 a	362,61 a
3,0 mM N	281,97 a	75,93 a	389,20 a
CV %	38,44	40,10	39,62

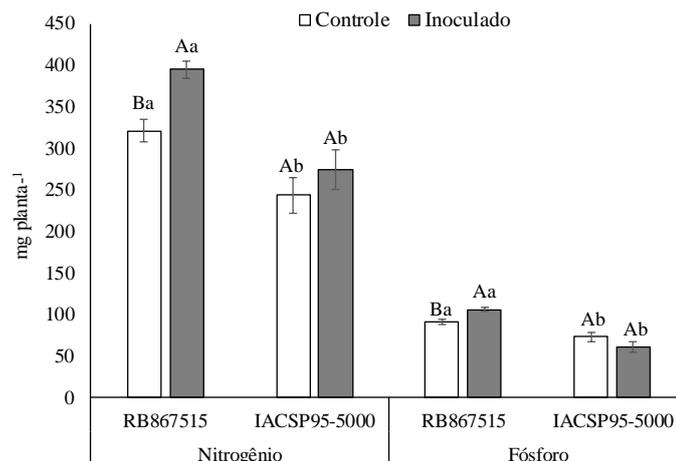


Figura 28. Desdobramento da interação entre variedade e inoculação (mistura bacteriana, vide Tabela 2) para acúmulo de nitrogênio e fósforo total em mudas de cana-de-açúcar, variedades RB867515 e IACSP95-5000 (experimento 2) após 59 dias em solução nutritiva, sendo 30 dias com dose 3,0mM de N, depois retirado o N por 72 h e suprido novamente com dose alta (3,0mM) e baixa (0,3mM) (coleta 3). Médias seguidas de letras iguais, maiúscula para inoculação e minúscula para variedade, não diferem pelo teste F a 5% de significância. Valores médios de 8 repetições. A barra significa o erro padrão.

A inoculação individualizada das bactérias e da mistura mostrou que apenas a estirpe Hr não promoveu acúmulo de nutriente na variedade RB867515, enquanto que de forma contrária a inoculação da estirpe Hr e da mistura promoveu incremento significativo no acúmulo de nutrientes na variedade RB966928, com os maiores valores observados pela inoculação da mistura (Tabela 18).

Tabela 18. Acúmulo de nutrientes na matéria seca nas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas isoladas e uma mistura das cinco estirpes (vide Tabela 2) após cultivo em sistema hidropônico com solução de Hoagland modificada para duas concentrações de nitrogênio (0,3 e 3 mM). Letras iguais maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Skott-Knott ($p \leq 0.05$). Valores médios de 8 repetições.

	Nitrogênio	Fósforo	Potássio
	----- mg planta ⁻¹ -----		
RB867515			
Inoculação			
Controle	390,70 b	87,95 b	787,31 b
Mistura	604,67 a	136,74 a	1247,33 a
Gd	579,09 a	130,67 a	1175,33 a
Na	619,57 a	140,29 a	1270,53 a
Hr	452,38 b	102,60 b	928,69 b
Hs	536,10 a	121,14 a	1088,73 a
Pt	610,90 a	138,84 a	1262,99 a
Dose de N			
0,3mM	489,64 b	110,67 b	1003,42 b
3,0mM	594,19 a	134,54 a	1213,98 a

Continua...

Continuação da Tabela 18.

	Nitrogênio	Fósforo	Potássio
	----- mg planta ⁻¹ -----		
RB867515			
CV %	28,19	28,39	29,06
RB966928			
Controle	321,62 b	90,98 b	470,56 b
Mistura	379,24 a	111,45 a	586,95 a
Hr	349,24 a	98,95 a	516,03 a
Hs	312,43 b	87,13 b	449,44 b
Pt	297,36 b	84,82 b	439,82 b
CV %	8,92	9,70	9,90

No experimento em que se usou a variedade RB966928 não se aplicou dose diferente de N. CV = coeficiente de variação.

O aumento da dose de N alterou o acúmulo de nutrientes, no entanto não afetou o acúmulo de biomassa (Tabela 9), o que pode se relacionar a problemática da resposta da cana-de-açúcar à adubação nitrogenada, em que especialmente na fase inicial da cana planta praticamente não tem efeito no desenvolvimento da cultura (ROBINSON et al., 2011).

Outros estudos mostraram que a variedade RB867515 é considerada responsiva a inoculação de bactérias diazotróficas. Dentre seis genótipos de cana-de-açúcar Pereira et al. (2013) verificou que a variedade RB867515 foi a mais responsiva a inoculação em condição de campo, no ensaio os autores utilizaram a mesma mistura bacteriana usada no presente estudo, e observaram aumento significativo no acúmulo de biomassa verde e seca nas plantas inoculadas. Outros ensaios de campo em que se usou a mesma mistura bacteriana, Schultz et al. (2012) mostraram que a variedade RB867515 foi responsiva a inoculação e RB72454 não, e o efeito observado ocorreu no crescimento e acúmulo de N total na parte aérea de forma similar a aplicação de 120 Kg de N ha⁻¹.

A variedade RB867515 apresentou acúmulo de N e P, curiosamente nessa variedade a inoculação promoveu maiores incrementos no acúmulo de biomassa e arquitetura radicular desde o início (após a fase de brotação), além de inicialmente após a fase de brotação ter verificado que essas bactérias aumentaram o comprimento de raízes finas consideradas mais efetiva na absorção de água e nutrientes, esse efeito na raiz somado a alteração no metabolismo de N pode se relacionar ao aumento no acúmulo desse nutriente nas plantas inoculadas nessa variedade.

O acúmulo de nutriente se relacionou com o efeito dessas bactérias na biomassa e crescimento das plantas, e mais uma vez mostra que é dependente da interação específica planta-bactéria, e que pode ser regulada tanto pela característica do genótipo como da estirpe bacteriana, onde a inoculação da estirpe Hr não promoveu efeito no acúmulo de nutriente na var. RB867515, mas foi tão eficiente quanto a mistura na var. RB966928, além disso vale ressaltar ainda que apenas a mistura foi capaz de promover acúmulo de nutrientes nas duas variedades avaliadas.

5. CONCLUSÕES

Bactérias diazotróficas promovem o desenvolvimento e influenciam o metabolismo de nitrogênio em mudas de cana-de-açúcar.

A variedade RB867515 é considerada a mais responsiva à inoculação de bactérias diazotróficas, seguida pela RB966928.

A inoculação da mistura das cinco estirpes e da estirpe *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR11504) isoladamente apresentam maiores efeitos no desenvolvimento e atividade da enzima nitrato redutase nas mudas da variedade RB966928, já as estirpes *Nitrospirillum amazonense* (BR11145), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR11335) e a mistura apresentam melhores resposta no desenvolvimento e metabolismo de nitrogênio na variedade RB867515.

Maiores efeitos da inoculação de diazotróficas, especialmente, no metabolismo de nitrogênio são observados sob baixa disponibilidade de nitrogênio.

Na presença de baixa dose de nitrogênio (N) (0,3mM) e da enzima GS, independente da dose de N, bactérias diazotróficas promovem aumento na atividade da NR. Elas promovem ainda aumento nos teores de nitrato nas folhas e redução nas raízes, seguido de aumento nos teores de açúcares solúveis e aminoácidos livres nas folhas, como indicativo de maior processo de assimilação de nitrogênio, com resposta dependente da dose de N e do genótipo avaliado.

Os efeitos mais expressivos da inoculação de bactérias diazotróficas ocorrem no sistema radicular desde a fase inicial de produção de mudas, o que pode se relacionar as maiores alterações no metabolismo de nitrogênio e conseqüentemente ao aumento no acúmulo desse nutriente na cana-de-açúcar.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O efeito da inoculação de bactérias diazotróficas no metabolismo de nitrogênio da cana-de-açúcar abre novos caminhos para o entendimento da ação dessas bactérias no desenvolvimento da cultura, em especial, sobre condição de restrição do nutriente.

A resposta distinta entre os genótipos de cana-de-açúcar e a inoculação de bactérias diazotróficas sobre diferentes concentrações de nitrogênio possibilita a seleção de genótipos mais responsivos e de ambiente mais favorável à aplicação do inoculante.

Bactérias diazotróficas podem ser usadas como insumo biológico associado ao sistema de produção de mudas de cana-de-açúcar, possibilitando a redução de custo e o aumento da qualidade das mudas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King Saud University-Science**, v.26, p. 1-20, 2014.

ALCANTARA, R. M. C. M.; SOUSA, S. R.; XAVIER, G. R.; MOURA ROCHA, M.; RUMJANEK, N. G. (2009). **Mecanismo bioquímicos, fisiológicos e moleculares relacionados com a eficiência de uso de nitrogênio em leguminosas e gramíneas**. Embrapa Meio-Norte, 39 p.

ALVES, G. C.; DE MATOS MACEDO, A. V.; DOS REIS JR, F. B.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Plant growth promotion by four species of the genus *Burkholderia*. **Plant and soil**, v.399, p. 373-387, 2016.

ALVES, G. C.; VIDEIRA, S. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant and soil**, v. 387, p.307-321, 2015.

ANITHA, K. G.; THANGARAJU, M. Growth promotion of rice seedlings by *Gluconacetobacter diazotrophicus* under in vitro conditions. **Journal of Cell and Plant Sciences**, v.1, p. 6-12, 2010.

ARENCIBIA, A. D.; ESTEVEZ, Y.; VINAGRE, F.; BERNAL, A.; PÉREZ, J.; CARMONA, E.; SANTANA, I. Induced-resistance in sugarcane against pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans* mediated by an endophytic interaction. **Sugar Tech**, v.8, p.272-280, 2006.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov. a root associated nitrogen fixing bacterium. **International Journal of Systematic Evolutionary Bacteriology**, v. 36, p.86-93, 1986.

BALDANI, J. I; CARUSO, L; BALDANI, V.L.D; GOI, S.R; DOÈBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology Biochemistry**, v.29, p. 911-922, 1997.

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMAN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Hesbaspirillum rubrisubalbicans* and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.46, p.802-810, 1996.

BALDANI, J. I.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane - reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, v. 29, n. 4, p. 417-423, 2002.

BARBOSA, G. V. S.; SOUSA, A. J. R.; ROCHA, A. M. C.; SANTOS, A. V. P.; BARRETO, C. G. R.; MOURA FILHO, E. J. S.; SOUZA, G. J. L.; FERREIRA, J. L. C.; SOARES, L.;

CRUZ, M. M.; FERREIRA, P. V.; SILVA, W. C. M. **Três novas variedades RB de cana-de-açúcar**. Boletim Técnico, PMGCA, v. 2, 2003, 18 p.

BASANTA, M. V.; DOURADO-NETO, D.; REICHARDT, K.; BACCHI, O. O. S.; OLIVEIRA, J. C. M.; TRIVELIN, P. C. O.; TIM, L.C, TOMINAGA, T.T.; CORRECHEL, v.; CASSARO, F.A.M.; PIRES, L. F.; DE MACEDO, J.R. Management effects on nitrogen recovery in a sugarcane crop grown in Brazil. **Geoderma**, v. 116, p. 235-248, 2003.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. Chapter two-how the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. **Advances in agronomy**, v.108, p. 77-136, 2010.

BEM DEKHIL S.; CAHILL, M.; STACKEBRANDT, E.; SLY, L. I. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology** v.20, p.72–77, 1997.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; MACHADO, B. C. Sideróforos: “Uma resposta dos microorganismos”. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p.1155-1164, 2002.

BERNABEU, P.R.; GARCÍA, S.S.; FERREYRA, G.G.; GUIDI, V.I; GALAR, M.L.; BOIARDI, J.L.; LUNA, M.F. Mineral phosphate solubilization in *Burkholderia tropica* involves PQQ-Glucose dehydrogenase. **British Microbiology Research Journal**, v.13, p. 1-8, 2016.

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

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

BOMFIM, A.C.J.S. **Caracterização da via de sinalização por nitrogênio em plantas de cana-de-açúcar durante a colonização por *Gluconacetobacter diazotrophicus***. 2011. 182 f Dissertação (Mestrado em Química biológica) - Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; THEMAAT, E.V.L. Van; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.64, p.807-838, 2013.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C.M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v.30, n.2, p.365-372, 2000.

CABALLERO-MELLADO, J.; ONOFRE-LEMUS, J.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing

Burkholderia species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, p. 5308-5319, 2007.

CARVALHO, T. L. G.; BALSEMÃO-PIRES, E.; SARAIVA, R. M.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. **Journal of experimental botany**, 2014, doi:10.1093/jxb/eru319.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-bacteria-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **J. Plant Growth Regulat**, v. 33, p. 440459, 2014.

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

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

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar**, Quarto Levantamento, Brasília, 2016-2017.

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

DA SILVA, M. F.; DE SOUZA, A.C.; DE OLIVEIRA, P.J.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK N.G.; DE BARROS SOARES, L.H.; REIS, V.M. Survival of endophytic bacteria in polymer-based inoculants and efficiency of their application to sugarcane. **Plant and Soil**, v.356, p. 231–243, 2012.

DAROS, E., 2010. **Catálogo Nacional de Variedades RB de Cana-de-açúcar**, Coletânea, Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro, Curitiba.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FRACASSO, J. (2010). Effect of insecticides applied at sugarcane planting on *Sphenophorus levis* variegatus (coleoptera; curculionidae) control and on the yield of first two harvests. In Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol, v. 27.

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

DONATO, V.M.T.S.; ANDRADE, A.G.; de SOUZA, E.S.; de FRANÇA, J.G.E.; MACIEL, G.A. Atividade enzimática em variedades de cana de açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.39, p.1087-1093, 2004.

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogenfixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.17–26, 2001.

ESTRADA, G. A.; BALDANI, V. L. D.; DE 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**, v. 369, p.115-129, 2013.

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

FARALDO-GÓMEZ JD. Protein-mediated Siderophore Uptake in Gram-negative Bacteria: A Structural Perspective. **Springer-Verlag**, 2007.

FARN DEN, K.J.S.; ROBERTSON, J.G. Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogenase. In: BERGERSEN, F.J. (Ed.). Methods for evaluating biological nitrogen fixation. **Chichester: John Wiley & Sons**, 1980. p.279-286.

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

FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**, v.49,1980, 1977.

FERREIRA, F. M.; BARROS, W. S.; SILVA, F. D.; BARBOSA, M. H. P.; CRUZ, C. D.; BASTOS, I. T. Relações fenotípicas e genotípicas entre componentes de produção em cana-de-açúcar. *Bragantia*, v.66, p.605-610, 2007.

GÍRIO, L. A.; 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**, v.50, p.33-43, 2015.

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

GONZÁLEZ, R.C.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L., RAMÍREZ-TRUJILLO, A.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J. High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. **Plant and soil**, v. 345. P.155-169.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in microbiology**, v. 16, p.463-471.

HERRIDGE DF, PEOPLES M, BODDEY RM. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant Soil** v. 311, p.1-18, 2008.

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

HUANG, H.; LONG, S.; SINGH, V. Techno- economic analysis of biodiesel and ethanol co- production from lipid- producing sugarcane. **Biofuels Bioproducts and Biorefining** v. 10, p. 299-315, 2016.

IAC – Instituto Agronômico de Campinas – Cultivares IAC (2007). Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/>. Acessado em Fevereiro de 2015.

ISHIKAWA, S.; ANDO, S.; SAKAIGAICHI, T.; TERAJIMA, Y.; MATSUOKA, M. Effects of high nitrogen application on the dry matter yield, nitrogen content and nitrate- N concentration of sugarcane. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.55, p.485- 495, 2009.

JADOSKI, C. J.; TOPPA, E. V. B.; RODRIGUES, J. D. Desenvolvimento morfofisiológico de raízes e brotos da cana-de-açúcar (*saccharum officinarum* L.), **Scientia Agraria Paranaense**, v. 11, p. 22-32, 2012.

JAMES, E.K.; BALDANI, J.I. The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels, **Plant and Soil** , v. 356, p. 1-3, 2012.

JAWORSKI, E.G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.43, p.1274-1279, 1971.

JEZ, J. M.; LEE, S. G.; SHERP, A. M. The next green movement: plant biology for the environment and sustainability. **Science**, V. 353, p. 1241-1244, 2016.

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

KAMILOVA, F.; KRAVCHENKO, L.V.; SHAPOSHNIKOV, A.I.; MAKAROVA, N.; LUGTENBERG, B.J.J. Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate. **Molecular Plant Microbe Interactions**, V. 19, p.1121–26 2006.

KHAMMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research of Microbiology**, v.140, p.679–693, 1989.

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

KHALID A, TAHIR S, ARSHAD M & ZAHIR ZA. Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere and non-rhizosphere soils. **Australian Journal Soil Research** v.42, p. 921–926, 2004.

KRAISER, T.; GRAS, D. E.; GUTIÉRREZ, A. G.; GONZÁLEZ, B.; GUTIÉRREZ, R. A. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. **Journal of experimental botany**, v. 62, p. 1455-1466, 2011.

KUMAR, V.; NARULA, N. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergent of wheat as affected by *Azotobacter chroococum* mutants. **Biology and Fertility of Soils**, v.28, p.301-305, 1999.

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.; 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 Agronomico/ Fundação IAC, 2012, 22p. (Boletim 109).

LIN, S. Y.; HAMEED, A.; ARUN, A. B. Description of *Noviherbaspirillum malthae* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-contaminated soil, and proposal to reclassify *Herbaspirillum soli*, *Herbaspirillum aurantiacum*, *Herbaspirillum canariense* and *Herbaspirillum psychrotolerans* as *Noviherbaspirillum soli* comb. nov., *Noviherbaspirillum aurantiacum* comb. nov., *Noviherbaspirillum canariense* comb. nov. and *Noviherbaspirillum psychrotolerans* comb. nov. based on polyphasic analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 4100–4107, 2013.

LIN, S. Y.; HAMEED, A.; LIU, Y. C.; HSU, Y. H.; LAI, W. A.; SHEN, F. T.; YOUNG, C. C. *Azospirillum soli* sp. nov, a nitrogen-fixing species isolated from agricultural soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 65, p. 4601-4607, 2015.

LIN, S. Y.; HAMEED, A; SHEN, F.T.; LIU, Y.C.; HSU, Y.H.; SHAHINA, M.; LAI, W.A.; YOUNG, CC. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* 1989 as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* 1983 as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.105, p.1149-1162, 2014.

LIN, S. Y.; LIU, Y. C.; HAMEED, A.; HSU, Y. H.; LAI, W. A.; SHEN, F. T.; YOUNG, C. C. *Azospirillum fermentarium* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from a fermenter. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 3762-3768, 2013.

LIN, S. Y.; YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; ARUN, A. B.; CHEN, W. M.; LAI, W. A.; SHEN, F. T.; REKHA, P. D.; YASSIN, A. F. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, p.761–765, 2009.

LIST OF PROCARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE. Disponível em: <http://www.bacterio.net/-allnamesmr.html>. Acesso em: 12 nov 2017.

LOGESHWARAN, P.; THANGARAJU, M.; RAJASUNDARI, K. Hydroxamate siderophores of endophytic bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolated from sugarcane roots. **Australian Journal Basic Applied Science**, v. 3, p. 3564-3567.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.63, p.541-556, 2009.

LYUTOVA, M. I.; KAMENTSEVA, I. E. Role of Protein Synthesis in Recovering Nitrate Reductase Activity in Wheat Leaves Exposed to Heat Stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.48 p. 615-619, 2001.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional de plantas**. Piracicaba, Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato,1997. 319 p.

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

MARCOS, F.C.C.; IÓRIO, R. D.P.F.; SILVEIRA, A.P.D.D.; RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E. C.; LAGÔA, A.M.M.D.A. Endophytic bacteria affect sugarcane physiology without changing plant growth. **Bragantia**, v. 75, p. 1-9, 2016.

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

MEDEIROS, C. D.; OLIVEIRA, M. T.; RIVAS, R.; BALDANI, J. I.; KIDO, E. A.; SANTOS, M. G. Gas exchange, growth, and antioxidant activity in sugarcane under biological nitrogen fixation. **Photosynthetica**, v. 50 n. 4, p. 519-528, 2012.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 620-624, 2007a.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, 57, 2805–2809, 2007b.

MILLER, A. J.; CRAMER, M.D. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant and Soil**, v.274, p.1- 36, 2004.

MITCHELL, L. Microdetermination of nitrogen in plant & tissues. **Journal AOAC**, v, 1 p. 1-3, 1972.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric oxide**, v 5, p. 67-71, 2001.

MOUTIA, J.F.Y.; SAUMTALLY, S.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. **Plant and soil**, v. 337, 233-242, 2010.

NOGUEIRA, E. DE M.; OLIVARES, F. L.; JAPIASSU, J. C.; VILAR, C.; VINAGRE, F.; BALDANI, J.I.; HEMERLY, A. Characterization of glutamine synthetase genes in sugarcane genotypes with different rates of biological nitrogen fixation. **Plant Science**, v. 169, p. 819-832, 2005.

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

OAKS, A.; LONG, D. M.; ZOUMADAKIS, M., LI, X. Z.; HERTIG, C. (1990). **The Role of NO₃—and NH₄⁺ Ions in the Regulation of Nitrate Reductase in Higher Plants**. In Inorganic Nitrogen in Plants and Microorganisms (pp. 165-170). Springer Berlin Heidelberg. OAKS, A. A Re-evaluation of nitrogen assimilation in roots. **BioScience** 42, p. 103– 111, 1992.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v.21, n.3, p. 197- 200, 1996.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E.K.; BALDAI, J.I. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, v. 135, p. 723-737. 1997.

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

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; REIS, V. M.; BALDANI J. I. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Brasilian Journal Microbiology**, v.34, p.59-61, 2003.

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

OVERVOORDE, P.; FUKAKI, H.; BEECKMAN T. Auxin control of root development. **Cold Spring Harbor Perspective in Biology**, v.2, p.1–16, 2010.

PANKIEVICZ, V.C.S.; DO AMARAL, F.P.; SANTOS, K.F.D.N.; AGTUCA, B.; XU, Y.; SCHUELLER, M. J.; ARISI, A.C.M.; STEFFENS, M.B.R.; DE SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; STACEY, G.; FERRIERI, R.A. Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. **Plant Journal** v. 81, p.907–919, 2015.

PATTEN, C.L.; BLAKNEY, A.J.; COULSON, T.J. Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. **Critical Review Microbiology**, v. 39, p. 395–415, 2013.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; HOU, W.; LIU, Y.; WANG, E. T.; TAN, Z. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v.56, p.1263–1271, 2006.

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

PITTOL, M.; DURSO, L.; VALIATI, V. H.; FIUZA, L. M. Agronomic and environmental aspects of diazotrophic bacteria in rice fields. **Annals of Microbiology**, p. 1-17, 2015.

RADWAN, T. EL-S. EL-D.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, v.32, p.39-54, 2002.

RAIJ, B.V.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. **Recomendação de Adubação e Calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agronomico/Fundação IAC, 1996. 285p. (Boletim 100).

RAJKUMAR, M.; AE, N.; PRASAD, M.N.V.; FREITAS, H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends in Biotechnology**, v.28, p.142-149, 2010.

RAO, H. C.; SAVALGI, V. P. Isolation and screening of nitrogen fixing endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* GdS25. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.6, p. 1364-1373, 2017.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 43–51, 1987.

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

REIS JÚNIOR, F. B.; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 103-113, 2004.

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

REIS, V. M. Taxonomia do gênero *Herbaspirillum*. Documentos da Embrapa Agrobiologia. Seropédica, RJ. Documento 304, 2016.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, K.R.S.; Nitrogen fixing bacteria in the family Acetobacteraceae and their role in agriculture. **Journal of Basic Microbiology** v. 54, p. 1-19, 2015.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, 28: 897-906, 2001.

ROBINSON, N.; BRACKIN, R.; VINALL, K.; SOPER, F.; HOLST, J.; GAMAGE, H.; SCHMIDT, S. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **PLoS One**, v.6, e19045, 2011.

RODRIGUES, E. P.; DE PAULA SOARES, C.; GALVÃO, P. G.; IMADA, E. L.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; ROUWS, L. F.; BALDANI, J. I. Identification of Genes Involved in Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 Strain Using Transposon Mutagenesis. **Frontiers in microbiology**, 2016, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01572>

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

SAHULKA, J.; LISÁ, L. The influence of sugars on nitrate reductase induction by exogenous nitrate or nitrite in excised *Pisum sativum* roots. **Biologia Plantarum**, v.20, p.359-367, 1978.
SAHULKA, J. The regulation of nitrate reductase, nitrite reductase, and glutamate dehydrogenase in excised pea roots by some exogenous amino acids. **Biologia Plantarum**, v. 14, p. 308-311, 1972.

SANGUINO, A.; MORAES, V.A.; CASAGRANDE, M.V. **Curso de formação e condução de viveiros de mudas de cana-de-açúcar**. 2006, 43 p.

SANTOS, A. M.; BUCHER, C. A.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Efeito da disponibilidade de nitrato em solução nutritiva sobre a absorção de nitrogênio e atividade enzimática de duas cultivares de arroz, **Bragantia**, v.68, p.215-220, 2009.

SANTOS, C. L. R.; CAZETTA, J. O.; SARAN, L. M.; SANCHES, A. Otimização da análise da atividade da redutase do nitrato e sua caracterização em folhas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.49, p.384-394, 2014.

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

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

SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; REIS, V.M.; URQUIAGA, S.S. Produtividade e diluição isotópica de ¹⁵N em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, p. 1594-1601, 2016.

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

SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de Pinus e Eucalyptus de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 6, p. 847 – 854, 2002.

SINCLAIR, T. R.; GILBERT, R. A.; PERDOMO, R. E.; SHINE, J. M.; POWELL, G.; MONTES, G. Sugarcane leaf area development under field conditions. In Florida, USA. *Field Crops Research*, Amsterdam, v. 88, n. 02/03, p. 171-178, 2004.

SINHA, S. K.; RANI, M.; BANSAL, N.; VENKATESH, K.; MANDAL, P. K. Nitrate Starvation Induced Changes in Root System Architecture, Carbon: Nitrogen Metabolism, and miRNA Expression in Nitrogen-Responsive Wheat Genotypes. **Applied biochemistry and biotechnology**, v.177, p.1299-1312, 2015.

SOUSA, L. B. **Caracterização fisiológica e do perfil de expressão gênica do transporte de nitrogênio em genótipos contrastantes para processo de fixação biológica de N₂ de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2015. 166 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Genética e melhoramento de plantas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo, 2015.

SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 215-252.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN J. Auxin and plant- microbe interactions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, vol. 3, 2011. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001438>.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y.; **Plant Growth-Promoting Actions of Rhizobacteria**. In: VAN LOON, L. C. (Ed.). *Advances in Botanical Research*, Burlington: Academic Press, v. 51, p.283-320, 2009.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v.31, p.425–448, 2007.

STEVENSON, F.J.; COLE, M.A. **Cycles of soil carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients**. 2ed. New York: Wiley, 1999. 427p.

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

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

SUMAN, A.; SINGH, P.; LAL, M. Effects of Diverse Habitat Biofertilizers on Yield and Nitrogen Balance in Plant–Ratoon Crop Cycle of Sugarcane in Subtropics. **Sugar Tech**, v.15, p.36-43, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, v.3 p.719, 2013.

TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, p. 967–980, 1978.

TENORIO-SALGADO, S.; TINOCO, R.; VAZQUEZ-DUHALT, R. CABALLERO-MELLADO, J.; PEREZ-RUEDA, E. Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. **Bioengineered** v. 4, p.236-243, 2014.

TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants, **Plant, Cell & Environment**, v.23, p. 1005-1024, 2000.

TRIVELIN, P.C.O.; VITTI, A.C.; OLIVEIRA, M.W.; GAVA, G.J.C.; SARRIÉS, G.A. Utilização de nitrogênio e produtividade da cana-de-açúcar (cana planta) em solo arenoso com incorporação de resíduos da cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. V.37, p. 193–201, 2002.

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**, v.56, p.105-114, 1992.

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

VAN NOORDWIJK, M. **Roots: length, biomass, production and mortality**. In: ANDERSON, J.M., INGRAM, J.S.I. (Eds.), *Tropical Soil Biology and Fertility: A Hand Book of Methods* (pp. 132–144). CAB International, U.K, 1993. p. 132-144.

VARGAS, L.; DE CARVALHO, T. L. G.; FERREIRA, P. C. G.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; HEMERLY, A. S. Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes, **Plant and soil**, v. 356, p. 127-137, 2012.

VASCONCELOS, A. C. M.; GARCIA, J. C. **Desenvolvimento radicular da cana-de-açúcar**. Potafos. Informações Agronômicas, n.110, 2005 (encarte técnico).

VITTI, G. C.; MAZZA, J. A. (2002). Planejamento, estratégias de manejo e nutrição da cultura de cana-de-açúcar. **Piracicaba: Potafos**, Encarte técnico, 169.

WOODWARD, A. W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany, London**, v. 95, p. 707-735, 2005.

XAVIER, M. A.; LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P.; MENDONÇA, J. R.; DINARDO-MIRANDA, L. L. SCARPARI, M. S; GARCIA, J. C.; ANJOS, I. A.; AZANIA, C. M; BRANCALIANO, C A; KANTHACK, R.A.D.; AFERRI, G.; SILVA, D.N.; BIDÓIA, M. A.; CAMPOS, M. F.; PERRUCCO, D.; MATSUO, R. S.; NEVES, J. T. N.; CASSANELI JUNIOR, J. R.; PERRUCCO, R.; PETRI, R. H.; SILVA, T. N.; SILVA, V. H. P.; THOMAZINHO JUNIOR, J. R.; MIGUEL, P. L. M.; LORENZATO, C. M. **Fatores de Desuniformidade e Kit de Pré-Brotação IAC para Sistema de Multiplicação de Cana-de-Açúcar – Mudanças Pré-Brotadas (MPB)**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2014. 22 p; (Documentos IAC, n.º 113).

XIE, C. H.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p.1435–1438, 2005.

YEMM, E. W; COCKING, E.C. The determination of amino acid with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, p. 209-213, 1955.

YEMM, E. W; WILLIS, A.J. the estimation of carbohydrate in plants extracts by anthrone. **Biochemistry** v.57, p. 508-514, 1954.

YEOH, Y. K.; PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; DENNIS, P.G.; ROBINSON, N. RAGAN M.A.; SCHMIDT, S.; HUGENHOLTZ, P. The core root microbiome of sugarcane cultivated under varying nitrogen fertilizer application. **Environmental Microbiology**, 2015. doi:10.1111/1462-2920.12925.

YOUNG, C.C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; HO, M. J.; ARUN, A. B.; LAI, W.A., REKHA, P. D.; SHEN, F. T.; HUNG, M.H. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.58, p.959–963, 2008.

ZHOU, S., HAN, L., WANG, Y., YANG, G., ZHUANG, L., & HU, P. *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.63, p. 2618-2624, 2013.