

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS NA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR
(*Saccharum* spp.)**

Lucas Augusto da Silva Gírio

Engenheiro Agrônomo

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS NA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR
(*Saccharum* spp.)**

Lucas Augusto da Silva Gírio

Orientador: Prof. Dr. Miguel Angelo Mutton

Co-orientador: Dr. Fábio Luis Ferreira Dias

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciência Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre
em Agronomia (Produção Vegetal)

2014

G525e Gírio, Lucas Augusto da Silva
Eficiência agronômica de bactérias diazotróficas na cultura da
cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) / Lucas Augusto da Silva Gírio. --
Jaboticabal, 2014
xi, 60 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientador: Miguel Angelo Mutton
Co-orientador: Fábio Luis Ferreira Dias
Banca examinadora: Jairo Osvaldo Cazetta, Mauro Alexandre
Xavier
Bibliografia

1. Cana-de-açúcar. 2. Bactérias diazotróficas. 3. Mudanças pré-
brotadas. 4. Nitrogênio. 5. Isótopo. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.34:631.54

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*)

AUTOR: LUCAS AUGUSTO DA SILVA GIRIO

ORIENTADOR: Prof. Dr. MIGUEL ANGELO MUTTON

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. FÁBIO LUIS FERREIRA DIAS


Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MIGUEL ANGELO MUTTON

Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. JAIRO OSVALDO CAZETTA

Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. MAURO ALEXANDRE XAVIER

Instituto Agronômico de Campinas / Ribeirão Preto/SP

Data da realização: 03 de julho de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCAS AUGUSTO DA SILVA GÍRIO – Nascido em 08 de janeiro de 1987, na cidade de Jaboticabal – SP, formado Engenheiro Agrônomo em 2011 pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), câmpus Araras – SP. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica por dois anos, parte financiado pelo Programa Recém-Doutor/UFSCar e parte pelo PIBIC/CNPq, atuando na área de restauração de áreas degradadas. Também realizou estágio com uso eficiente de recursos hídricos em ambiente protegido pela UFSCar e na APTA Polo Centro Sul realizou estágio com uso da palhada para geração de etanol de segunda geração, sendo bolsista de iniciação tecnológica industrial/ITI pela Petrobrás/Embrapa. Em 2011 foi bolsista de aperfeiçoamento da Fundação de Apoio à Pesquisa Agrícola (FUNDAG) pela APTA Polo Centro Sul, atuando em Fitotecnia, nutrição e adubação de cana-de-açúcar até o ano de 2012 quando iniciou o mestrado em Agronomia (Produção Vegetal), na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP.

DEDICO

À minha família e à minha namorada Luma.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que eu cumprisse mais esta etapa em minha vida.

Aos meus pais, Porphírio e Maria, e aos meus irmãos, Diego e Mariana, por todo apoio e incentivo.

À Luma por todo amor, carinho, apoio, compreensão, ajuda, motivação e força nos momentos mais difíceis que foram fundamentais para conclusão deste trabalho.

Ao prof. Dr. Miguel Angelo Mutton pela oportunidade, confiança, apoio e ensinamentos.

Ao Dr. Fábio Luis Ferreira Dias, pela confiança, apoio, amizade e pelo apoio material e financeiro do projeto.

À Dra. Veronica Massena Reis, Dr. Segundo Urquiaga e Dr. Nivaldo Schultz da Embrapa Agrobiologia pelo apoio material, análises e suporte intelectual;

Ao Dr. André Cesar Vitti, pela amizade e por ser tão prestativo e disponível sempre que precisei.

Ao Dr. Denizart Bolonhezi da APTA Polo Centro Leste por ter cedido o scanner e informações para análise das raízes.

À Dra. Raffaella Rossetto por, gentilmente, ter emprestado diversos equipamentos e materiais e por ter me dado a primeira oportunidade com a cultura da cana-de-açúcar.

Ao Dr. Edmilson Ambrosano por ter cedido a casa de vegetação para realização de parte do estudo, além do empréstimo de equipamentos, materiais e ensinamentos.

Aos pesquisadores da APTA Polo Centro Sul, Dr. Nivaldo Guirado, Dra. Mônica de Camargo, Dra. Cláudia Attanasio, Dra. Edna Bertoncini, Dra. Luciana Garcia e Dra. Maria Zucchi, que contribuíram de diversas formas para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta e a Profa. Dra. Sandra Helena Uneda-Trevisoli pelas críticas e sugestões apresentadas no exame de qualificação.

Ao prof. Dr. José Carlos Barbosa pelo apoio com as análises estatísticas.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia (Produção Vegetal) e ao coordenador do programa prof. Dr. Rouverson Pereira da Silva pelo apoio e suporte dado sempre que necessário.

À Neusa Mota por todo apoio, amizade, carinho e prestatividade que foram essenciais para tornar até os dias mais difíceis de trabalho agradáveis.

A toda equipe de funcionários da APTA Polo Centro Sul, Dito, Dalva, Berto, Fátima, Fabiana, Mara, Favero, Pesado, Silvio, Miza, Robson, Paulinho, Osvaldir, Fernando, Gilberto, Lurdinha e Sr. Amizade (*in memoriam*), por todo carinho, convivência e amizade.

A todos os amigos e estagiários da APTA Polo Centro Sul Emerson, Jasse, Vinícius, Marco Antonio, Edson e Gilmar, pela execução do projeto,

Aos amigos e irmãos Otávio Lopes, Augustus Watanabe e Caroline Orikasa, com quem tive o prazer de conviver nos últimos anos, por toda ajuda, amizade, motivação e pelos incontáveis dias trabalhados com as raízes.

A Camila pela longa amizade e contribuição com a dissertação.

Aos amigos da República Só-k Bota por toda amizade e convivência.

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

MUITO OBRIGADO

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Cultivo da Cana-de-açúcar no Brasil e Novos Sistemas de Plantio.....	2
2.2. Importância do N em Cana-de-açúcar e as Contradições	4
2.3. Fixação Biológica de Nitrogênio em Cana-de-açúcar.....	6
2.4. Efeito Promotor de Crescimento em Plantas	7
2.5. Interferentes na Relação Planta-Bactéria	8
2.6. Análise de Crescimento em Cana-de-açúcar	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Experimento 1: formação de mudas pré-brotadas submetidas à inoculação..	11
3.1.1. Produção de mudas e inoculação	11
3.1.2. Delineamento experimental.....	14
3.1.3. Avaliações	15
3.2. Experimento 2: mudas pré-brotadas em vasos a campo submetidas à inoculação e adubação nitrogenada	16
3.2.1. Coleta e características químicas e físicas do solo	16
3.2.2. Calagem e fosfatagem	17
3.2.3. Área experimental e montagem dos vasos	17
3.2.4. Adubação do solo e transplântio de mudas	18
3.2.6. Controle de pragas e doenças	18
3.2.7. Dados meteorológicos e irrigação	19
3.2.8. Delineamento experimental.....	19
3.2.9. Avaliações	20

3.3. Análise dos dados	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1. Experimento 1: brotação, altura e matéria seca de mudas pré-brotadas	25
4.2. Experimento 2: acúmulo de material vegetal, nutrientes e estimativa da recuperação do N-sulfato de amônio (¹⁵ N) na cana-de-açúcar até os 180 DAT....	28
5. CONCLUSÕES	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
APÊNDICES.....	58

EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*)

RESUMO - A crescente demanda mundial por combustíveis menos poluentes tem dado destaque ao Brasil. O governo brasileiro lançou programas que estimulam uma agricultura sustentável, os quais contemplam a fixação biológica de nitrogênio, que pode substituir total ou parcialmente a adubação nitrogenada. Além disso, visando maior eficiência, têm surgido pesquisas sugerindo novos sistemas de plantio, como o de mudas pré-brotadas (MPB). Nesse sentido, o estudo teve como objetivo avaliar: (i) os efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas sobre a formação de MPB de cana-de-açúcar, oriundas de gemas individualizadas; e (ii) o crescimento inicial destas mudas, associadas à aplicação de nitrogênio, cultivadas em solo de baixa fertilidade. Foram conduzidos dois experimentos, um em casa de vegetação, com duração de 50 dias e outro em vasos a campo, com duração de 180 dias. Em ambos os experimentos, o delineamento foi em blocos casualizados, sendo o primeiro com tratamentos arranjos em esquema fatorial 2 x 3 (com e sem inoculante e três quantidades de reserva das gemas) e o segundo em fatorial 2 x 2 x 4 (com e sem inoculante, com e sem nitrogênio, avaliados em quatro épocas: aos 45, 90, 135 e 180 dias). O inoculante teve efeito sobre a fase inicial e pode reduzir o tempo de viveiro para produção de mudas pré-brotadas. Em solo de baixa fertilidade, o inoculante promoveu ganhos na parte aérea quando associado a doses de N. No sistema radicular não trouxe ganhos na produção de matéria seca, mas promoveu alterações na arquitetura radicular, proporcionando maior comprimento das raízes. A inoculação favoreceu incrementos na eficiência da utilização do fertilizante nitrogenado na parte aérea da planta, possivelmente pelas alterações na arquitetura radicular. O inoculante apresentou efeito promotor de crescimento em plantas.

Palavras-chave: adubação nitrogenada, bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP), fixação biológica de nitrogênio (FBN), mudas pré-brotadas (MPB)

AGRONOMIC EFFICIENCY OF DIAZOTROPHIC BACTERIA ON SUGARCANE
(*Saccharum* spp.)

ABSTRACT - The growing global demand for cleaner fuels has given prominence to Brazil. The Brazilian government has launched programs that encourage sustainable agriculture, which include biological nitrogen fixation, which may totally or partially replace nitrogen fertilization. Moreover, aiming at greater efficiency, have emerged suggesting new research tillage systems, such as pre-sprouted seedlings (MPB). This study is aimed at evaluating: i) the effects of diazotrophic bacteria inoculation on the formation of sugarcane pre-sprouted seedlings (MPB), originating from individual buds; and (ii) the association of nitrogen application with the initial growth of these seedlings in low fertility soils. The first experiment was conducted in a greenhouse for a duration of 50 days. The second included pots in the field for a duration of 180 days. In both experiments, the design utilized randomized blocks; the first with treatments arranged in a 2 x 3 factorial design (with and without inoculation and three quantities of bud reserve) and the second in 2 x 2 x 4 factorial (with and without inoculation, with and without nitrogen evaluated in four seasons: at 45, 90, 135 and 180 days). The inoculant had an effect on the initial phase and reduced the time to produce pre-sprouted seedlings in the greenhouse. In low fertility soil, the inoculant promoted gains in shoot when associated with N doses. There were no gains in root dry matter production in inoculated soils, however, changes were noted in root architecture, with greater growth in root length. The inoculant revealed a positive effect on plant growth.

Keywords: nitrogen fertilizer, plant growth promoting bacteria (PGPB), biological nitrogen fixation (BNF), pré-sprouted seedlings (MPB)

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (FAO, 2014) com uma área cultivada estimada em 9,1 milhões de hectares para safra 2014/2015, sendo o estado de São Paulo o maior produtor, com área correspondente a 51,7% desse total (CONAB, 2014).

A crescente demanda global por combustíveis menos poluentes tem proporcionado ao etanol brasileiro destaque mundial nos últimos anos. Planos que incentivam uma agricultura de baixo impacto foram lançados no Brasil, como o da Agricultura de Baixo Carbono (ABC), que inclui a fixação biológica de nitrogênio (FBN) nesse plano estratégico (BRASIL, 2012).

Há evidências de que uso de biofertilizante à base de bactérias diazotróficas possa substituir, total ou parcialmente, o uso de fertilizante nitrogenado. Estudos indicam que a inoculação de bactérias diazotróficas não substitui a adubação nitrogenada, mas favorece a absorção e utilização do N disponível no solo na cultura do trigo (SAUBIDET et al., 2002). Aumentar a eficiência do uso de N ainda é um desafio, e o inoculante à base de bactérias diazotróficas pode ser uma alternativa eficaz (SCHULTZ et al., 2012)

Assim, como na adubação nitrogenada, as respostas à inoculação dependem da variedade adotada (SCHULTZ et al. 2012; URQUIAGA et al., 2012; PEREIRA et al., 2013) e costumam ser mais frequentes em solos de média e baixa fertilidade (GOSAL et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2006).

Segundo Pedraza (2008), além da contribuição da FBN em cana-de-açúcar, a associação com bactérias diazotróficas possivelmente reduza o uso de fertilizantes por beneficiar as plantas de diversas formas, tais como: solubilização de fosfatos e zinco (SARAVANAN et al., 2007; ESTRADA et al., 2013), produção de sideróforos e de reguladores de crescimento como auxinas, giberilinas e citocininas (LIN et al., 2012; SANTI et al., 2013).

Recentemente foi desenvolvida uma tecnologia promissora que sugere um novo e mais eficiente conceito em plantio de cana-de-açúcar no Brasil, substituindo o plantio de colmos pela planta já formada, chamado de mudas pré-brotadas (LANDELI et al., 2012). Por ter ser criado há pouco tempo, ainda é escasso qualquer tipo de trabalho com esta nova tecnologia e pouco se sabe sobre o comportamento destas mudas quando submetidas à inoculação com bactérias diazotróficas.

Para quantificar modificações no crescimento de plantas, um método pertinente, muito utilizado em cana-de-açúcar para verificar o efeito de adubações e tratos culturais, é o da análise de crescimento (GAVA et al., 2001). Este método descreve as condições morfofisiológicas da planta em intervalos de tempo entre duas amostragens consecutivas (MAGALHÃES, 1979), permitindo o acompanhamento da dinâmica do acúmulo de fitomassa e do crescimento através de medidas lineares (altura, diâmetro, comprimento de raiz), de superfície (área foliar) e índices fisiológicos.

Este estudo teve como objetivo avaliar: (i) os efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas sobre a formação de mudas pré-brotadas (MPB) de cana-de-açúcar, oriundas de gemas individualizadas; e (ii) o crescimento, acúmulo total de nutrientes e utilização do nitrogênio por estas mudas, adubadas com fertilizante marcado com ^{15}N , cultivadas em solo de baixa fertilidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultivo da Cana-de-açúcar no Brasil e Novos Sistemas de Plantio

As primeiras mudas de cana-de-açúcar chegaram ao Brasil por volta de 1502. Porém somente em 1532 é que o cultivo comercial teve início de fato com a introdução de variedades trazidas da Ilha da Madeira por Martim Afonso de Souza (FIGUEIREDO, 2008). Desde então a cultura foi difundida pelo Brasil e tem aumentado sua produção consideravelmente até os dias atuais, por razões que vão

desde o aumento das áreas plantadas até a introdução de tecnologias como: adoção de variedades melhoradas; alocação das variedades em solos adequados; uso de fertilizantes e defensivos; uso de agricultura de precisão, entre outros. Porém, tem-se visto pouca evolução quando se diz respeito ao plantio.

Desde a chegada das primeiras mudas ao Brasil, a forma como a cana-de-açúcar é plantada quase não mudou. Chamado de sistema convencional, o sulco é aberto e os colmos são plantados (GOMES, 2014). Apenas nos últimos anos houve o surgimento de estudos específicos a fim de desenvolver novas formas de plantio, etapa primordial para estabelecimento da cultura.

Em busca de maior rendimento, algumas usinas sucroalcooleiras têm adotado o plantio mecanizado como operação padrão, porém, como desvantagem, ocorre um maior consumo de mudas por hectare devido, principalmente, aos danos mecânicos causados nas gemas (RIPOLI et al., 2006). No plantio convencional (semimecanizado), para se implantar um hectare são utilizados em torno de 12 t de mudas, enquanto no sistema mecanizado, em torno de 16-20 t (PROENÇA et al. 2009; LANDELL et al., 2012). Nesse sentido, empresas e instituições de pesquisa têm sugerido novas tecnologias para o plantio, de forma que sejam mais sustentáveis como: minirrebolos, visando um maior rendimento e distribuição uniforme das unidades propagativas; a Inovação Sustentável de Produção de Mudanças de Cana-de-açúcar (ISPM), visando a retirada apenas das gemas em forma de lascas, através de um alicate extrator, permitindo que a cana continue no campo vegetando (GALAZZINI, 2013); e o sistema de multiplicação de mudas pré-brotadas (MPB), visando levar a muda pronta para o campo (LANDELL et al., 2012).

A ISPM é baseada na “*Sustainable Sugarcane Initiative (SSI)*”, técnica indiana a qual retira apenas as gemas ou “*bud chips*” com um equipamento extrator para produção de mudas (LOGANANDHAN et al., 2013) e tem se mostrado uma técnica viável e econômica para material vegetativo, podendo reduzir custos de produção (JAIN et al., 2010).

O MPB foi desenvolvido pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) recentemente e este sistema pode reduzir para 2 t a massa de mudas necessárias

para implantação de um hectare. Este sistema também permite maior taxa de multiplicação, sanidade de mudas, uniformidade no plantio e a possibilidade de levar para o campo um menor volume de material permitindo que máquinas de menor porte façam o plantio (LANDELL et al., 2012).

2.2. Importância do N em Cana-de-açúcar e as Contradições

O nitrogênio é um dos elementos minerais mais exigido pelas plantas e que mais limita seu crescimento. Além disso, o N constitui, em média, 1% da matéria seca da cana-de-açúcar (CARNEIRO; TRIVELIN; VICTORIA, 1995) e tem papel importante na sua nutrição e fisiologia, pois é constituinte dos aminoácidos, proteínas, clorofila, enzimas, ácidos nucléicos, membranas, fitormônios e metabólitos secundários (HAWKESFORD et al., 2012; SOUZA; FERNANDES, 2006; MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

Segundo Korndörfer e Martins (1992), o fertilizante nitrogenado costuma trazer ganhos na produção de colmos, porém com maior teor de umidade e menor acúmulo de sacarose. Isto ocorre porque a assimilação de nitrogênio é estritamente relacionada ao metabolismo de carboidratos, provocando acentuada diminuição nos teores de açúcares do colmo (SILVEIRA, 1985). O N também pode favorecer a brotação e perfilhamento (CASAGRANDE, 1991), maior acúmulo de biomassa tanto na parte aérea, quanto no sistema radicular (OTTO et al., 2009) e costuma ser o maior responsável pelo crescimento radicular (LYNCH; MARSCHNER; RANGEL, 2012).

A cana-planta pode acumular, na parte aérea, de 180 a 250 kg ha⁻¹ de N e, em alguns casos, como de cana irrigada, pode variar de 90 a 260 kg ha⁻¹ de N (ORLANDO FILHO ZAMBELLO JUNIOR, 1980; OLIVEIRA et al., 2011). Para produção de 100 t colmos ha⁻¹ são exportados de 70 a 110 kg ha⁻¹ de N variando de acordo com o tipo de solo, variedade, condições edafoclimáticas, entre outros. Isso mostra que as necessidades de N pela cultura são altas, superadas apenas pelas

exigências de K entre os elementos minerais (CANTARELLA; TRIVELIN; VITTI, 2007).

Cada variedade pode apresentar respostas diferentes quanto à eficiência do nitrogênio proveniente do fertilizante (N-fertilizante). A participação do N-fertilizante raramente supera 40% (TRIVELIN; RODRIGUES; VICTORIA, 1996), mas, em alguns casos, em condições muito favoráveis (distribuição homogênea do fertilizante e chuva na quantidade ideal logo após aplicação) pode chegar 60% (OLIVEIRA et al., 2000). O restante do N extraído pode ser proveniente de matéria orgânica, absorção de amônia da atmosfera, fixação biológica de N atmosférico, entre outros (TRIVELIN, 2000; AMBROSANO et al., 2005).

O uso de fertilizantes para a produção de cana-de-açúcar com a finalidade de produção de etanol (energia) é uma questão polêmica e contraditória. Isto porque os fertilizantes são insumos caros, considerados valiosos e devem ter seu uso priorizado para produção de alimentos (ROSSETTO et al., 2010). Além disso, o uso de fertilizantes nitrogenados tem alto consumo energético para sua produção, geram emissões de gases de efeito estufa (ROSSETTO et al. 2010) e costumam ter baixa contribuição em relação ao nitrogênio total absorvido na planta (VITTI et al., 2008), o que diminui as vantagens ambientais dos biocombustíveis.

A falta de resposta da cana-planta à adubação nitrogenada pode ser atribuída à possível fixação biológica do nitrogênio atmosférico; ao vigor do sistema radicular da cana-planta comparada ao da cana-soca; ao estoque de nitrogênio no colmo-semente; às condições climáticas; à melhoria da fertilidade do solo, após a reforma dos canaviais, associada à calagem, ao preparo mecânico e à incorporação de restos da cultura antecessora (CAMPBELL, 2007; SARTORI, 2010). A ausência de resposta também pode ser atribuída ao fato de que nem todo nitrogênio aplicado como fertilizante é utilizado pelas culturas, podendo permanecer no solo, ser perdido por lixiviação para águas subterrâneas ou por volatilização para a atmosfera (FRANCO et. al., 2008, MUCHOVEJ; NEWMAN, 2004).

2.3. Fixação Biológica de Nitrogênio em Cana-de-açúcar

Apesar de 78% da atmosfera da Terra ser composta por nitrogênio, muitas vezes este elemento pode ser o fator limitante no crescimento das plantas (LEE; BRESSAN, 2005). Isto ocorre porque o nitrogênio ocorre na forma de N_2 , inacessível para as plantas, mas acessível aos organismos procariotos especialmente adaptados (DALTON; KRAMER, 2006). Para o nitrogênio ser incorporado por organismos vivos, deve primeiro ser convertido em nitrato ou amônia, processos que não podem ser realizados pelas plantas na ausência de bactérias endossimbióticas (DALTON; KRAMER, 2006; BHATTACHARJEE; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2008). A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é o processo pela qual o N_2 é reduzido por um grupo especializado de organismos procariotos chamados diazotróficos (CHANWAY; ANAND; YANG, 2014).

As primeiras pesquisas realizadas com bactérias fixadoras de nitrogênio em gramíneas aconteceram na década de 50, pelos pesquisadores Johanna Döbereiner e Alaíde Ruschel, com o isolamento da bactéria *Beijerinckia fluminensis* da rizosfera de cana-de-açúcar (DÖBEREINER; RUSCHEL, 1958). Desde então, foram realizadas importantes descobertas com fixação biológica em não leguminosas, o que tornou o Brasil referência mundial neste assunto (BODDEY, URQUIAGA; DOBEREINER, 1991). Em consequência dos anos de pesquisas e conhecimento acumulado, a Embrapa Agrobiologia desenvolveu um inoculante que possibilita promover o crescimento de plantas de cana-de-açúcar. Este é composto por um coquetel de cinco bacterianas diazotróficas: *Herbaspirillum seropedicae* (BR11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR11504), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR11281T), *Burkholderia tropica* (BR11366T) e *Azospirillum amazonense* (BR11145) (REIS; PEREIRA; HIPÓLITO, 2009; REIS; BALDANI; URQUIAGA, 2009)

Apesar de ainda ser um assunto controverso, acredita-se que a FBN em cana-de-açúcar ocorra no Brasil pela produção de colmos ser elevada e a adubação nitrogenada ser relativamente baixa (BODDEY, URQUIAGA; DOBEREINER, 1991; VITTI et al., 2008; ROSSETTO et al.; 2010). A cana acumula entre 100 e 200 kg ha⁻¹ de N por ano, enquanto pela fertilização nitrogenada geralmente há um acúmulo de

60 e 120 kg ha⁻¹ de N para cana-planta e cana-soca, respectivamente (OHYAMA et al, 2014; BODDEY, URQUIAGA; DOBEREINER, 1991). De acordo com Azeredo et al. (1986), que analisou 135 estudos realizados nas principais áreas canavieiras do Brasil, apenas 19% dos experimentos apresentaram respostas à adubação com N.

Outra evidência de que ocorra a FBN no Brasil se deve à possibilidade de áreas com longo período de cultivo, com pouca ou nenhuma aplicação de fertilizante nitrogenado, sem que haja diminuição tanto da produtividade, quanto das reservas de N do solo (BODDEY, URQUIAGA; DOBEREINER, 1991; BODDEY et al., 2003).

Fora do Brasil, evidências da ocorrência de FBN em cana também foram observadas por pesquisadores no México e na Índia. No México, em condições de casa de vegetação (MUÑOZ-ROJAS; CABALLERO-MELLADO, 2003) e na Índia, em condições tanto de casa de vegetação, quanto de campo (MUTHUKUMARASAMY et al., 2005; GOSAL et al. 2012).

Em países como África do Sul e Austrália, diversos estudos têm demonstrado que a fixação biológica de nitrogênio parece não ocorrer ou ser pouco evidente (BIGGS et al.,2000; HOEFSLOOT et., 2005; BIGGS et al., 2002), mais uma vez levantando a questão de que há muito a ser esclarecido no que diz respeito à FBN em cana-de-açúcar.

2.4. Efeito Promotor de Crescimento em Plantas

As bactérias diazotróficas podem promover o crescimento em plantas de cana-de-açúcar por sintetizar fitormônios e sideróforos; solubilizar fosfatos e Zn e até por inibir o progresso de doenças (PEDRAZA et al., 2008 BEVIVINO et al., 1998)

As auxinas estão envolvidas na iniciação radicular e alongação celular e são comumente produzidos por bactérias promotoras de crescimento (VESSEY, 2003; MIRZA et al., 2001). Com menor frequência, também foram identificadas algumas espécies capazes de produzir citocininas e giberilinas, responsáveis pela divisão e

extensão celular, respectivamente (VESSEY, 2003; GUITIERREZ-MANERO et al., 2001; LIN et al., 2012) .

A solubilização de fosfatos é uma interessante contribuição, pois o fósforo é, depois do N, um dos nutrientes que mais limitam o crescimento das plantas. Apesar de possuir grandes reservas no solo, ele está na forma indisponível às plantas, sendo que a solubilização pode melhorar esta condição. O mesmo pode acontecer com o Zn (SARAVANAN et al., 2007; ESTRADA; 2013).

O Fe é um nutriente essencial às plantas e costuma ser encontrado no solo em forma na Fe^{3+} , porém as raízes das plantas preferem absorver a forma reduzida (Fe^{2+}). Algumas bactérias rizosféricas têm a capacidade de sintetizar sideróforos, que transformam o Fe^{3+} para a forma assimilável pela planta (VESSEY, 2003; SANTI, 2013).

Além do mencionado, outra forma que as bactérias podem promover ganhos no crescimento das plantas é, de maneira indireta, através da supressão de doenças (BEVIVINO et al.; 1998) podendo ser através da produção de enzimas ou indução de resistência sistêmica (GLICK; PENROSE; MA, 2001).

2.5. Interferentes na Relação Planta-Bactéria

O sucesso da inoculação, que permite às bactérias diazotróficas promover a fixação de nitrogênio e/ou crescimento de plantas, depende de diversos fatores, desde características inerentes à planta até o ambiente em si. A água é, certamente, o fator mais importante, pois é fundamental para ocorrência de todos os processos biológicos (BODEY et al., 2003).

Diversos autores relataram que a resposta à inoculação está intimamente relacionada à variedade utilizada ((SCHULTZ et al. 2012; URQUIAGA et al., 2012; PEREIRA et al., 2013; MUÑOZ-ROJAS; CABALLERO-MELLADO, 2003; OLIVEIRA et al., 2003). Pereira et al. (2013). Estudando diversas variedades de cana-de-açúcar a campo e estirpes bacterianas, observaram que as respostas promovidas

são variáveis para as estirpes e variedades, sugerindo que há uma interação entre eles. Já Muñoz-Rojas e Caballero-Mellado (2003) estudaram o efeito de estirpes bacterianas em diversas variedades em vasos e também observaram que a resposta à inoculação depende da interação entre a variedade e a estirpe.

Assim como a adubação nitrogenada, respostas à inoculação parecem ser mais frequentes em solos de média e baixa fertilidade (OLIVEIRA et al., 2005; GOSAL et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2006). Oliveira et al. (2003) estudaram o comportamento de duas variedades sob inoculação de um coquetel de bactérias em três tipos de solo. Os autores verificaram que a variedade SP701143 apresentou ligeiro aumento de produtividade para solos de média e baixa fertilidade, enquanto a variedade SP813250 apresentou decréscimos nos três tipos de solo estudados.

Alguns estudos apontam que a fertilização nitrogenada pode interferir na FBN por reduzir a população das bactérias diazotróficas encontradas nas variedades de cana-de-açúcar (FUENTES-RAMIREZ et al., 1999; MUTHUKUMARASAMY et al., 1999; REIS JUNIOR et al., 2000). A hipótese foi levantada por Caballero-Mellado (1995) ao constatar que a diversidade genética destas bactérias é menor no México em relação ao Brasil devido às doses aplicadas naquela região serem maiores do que aqui, porém, este ainda é um assunto pouco esclarecido.

2.6. Análise de Crescimento em Cana-de-açúcar

O crescimento vegetal refere-se ao aumento do volume de célula ou expansão celular, ou seja, mudanças quantitativas que são irreversíveis (TAIZ; ZEIGER, 2010), tais como: massa, tamanho ou volume. Já a análise de crescimento consiste na medida sequencial do acúmulo de matéria orgânica na planta, levando-se em consideração a produção de matéria seca e as condições morfológicas da planta em diferentes intervalos de tempo, permitindo avaliar o crescimento final da planta como um todo e a contribuição dos diversos órgãos no crescimento total. (MAGALHÃES, 1985). O método é fundamentado, principalmente, na constatação de que a maior parte da matéria seca acumulada pelas plantas durante seu

crescimento (cerca de 90%) é resultado da atividade fotossintética (BENINCASA, 2003).

O crescimento vegetal pode ser estimado por meio de fórmulas matemáticas (cálculo de índices fisiológicos), sendo necessário, inicialmente, quantificar a produção vegetal para que seja possível verificar a contribuição de cada órgão no crescimento final das plantas. Como principal vantagem, a análise de crescimento permite que sejam obtidas informações regulares sem a necessidade de equipamentos caros e sofisticados, já que para estas análises utiliza-se apenas a massa da matéria seca (fitomassa) da planta e a área das folhas que são quem realizam a fotossíntese (LUCCHESI, 1984; MARAFON, 2012; PEIXOTO; PEIXOTO 2011). Segundo Marafon (2012), estes dois parâmetros são utilizados por representarem, basicamente, a “fábrica” (folha) e o “produto final” (matéria seca).

O crescimento de uma planta também pode ser quantificado através de medidas lineares, de superfície, volumétricas e número de unidades estruturais (BENINCASA, 2003).

Diferentes trabalhos têm trazido a análise de crescimento como método para verificar a influência de diversas variáveis sobre o crescimento da cana-de-açúcar, como: irrigação e adubação (DANTAS NETO et al., 2006), palhada de cana-de-açúcar (GAVA et al., 2001), variedades (OLIVEIRA et al., 2007) e reguladores vegetais (LEITE; CRUSCIOL, 2008).

Sendo assim, a análise quantitativa do crescimento vegetal é uma ferramenta acessível e muito precisa para avaliar todo o crescimento de plantas e a contribuição de diferentes processos fisiológicos sobre seu desempenho nas mais diversas condições ambientais (PEIXOTO e PEIXOTO, 2011) e de tratos culturais. De forma generalista, pode ser estudada a produtividade de culturas sob diversos sistemas de produção (GAVA et al., 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi executada em área experimental pertencente à Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, APTA Pólo Centro Sul, em Piracicaba-SP (22°42'30''S e 47°38'00''W e 560 m de altitude). O clima predominante é do tipo Cwa de acordo com classificação Köppen. Foram realizados dois experimentos para o presente estudo, um em casa de vegetação, em tubetes distribuídos em bandejas, com duração de 50 dias (Experimento 1) e outro em vasos de 130 L a campo com duração de 180 dias (Experimento 2). Em ambos os experimentos a variedade selecionada foi a RB867515, por responder à inoculação com bactérias diazotróficas (SCHULTZ et al. 2012; PEREIRA et al., 2013) e por ser a mais cultivada no estado de São Paulo e no Brasil (CHAPOLA et al., 2013).

3.1. Experimento 1: formação de mudas pré-brotadas submetidas à inoculação

3.1.1. Produção de mudas e inoculação

A produção de mudas teve início no dia 22 de fevereiro de 2013 e foi baseada no Sistema de Produção de Mudanças Pré-brotadas (MPB) sugerido por Landell et al. (2012) tendo duração de 50 dias. Primeiramente, foram retirados colmos de cana-planta com cerca de sete meses de idade e destes colmos foram extraídas as gemas mais vigorosas do terço superior da planta. A composição química dos colmos está apresentada na Tabela 1. A fim de testar a influência da superfície de contato na inoculação e na quantidade de reserva do minirrebolo sobre a brotação, as gemas foram retiradas com três quantidades de reservas: lasca (L), retirada por um extrator manual; gema de extrator (GE), retirada por um extrator mecânico em forma de cilindro desenvolvido pela Coopersucar; minirrebolo (MR) com 2,5 cm de reservas abaixo e acima do nó, cortado com serra circular. As gemas extraídas

apresentavam massa de matéria seca de 1,5 ($\pm 0,51$), 3,0 ($\pm 0,45$) e 4,5 ($\pm 0,69$) g, respectivamente.

Logo após a extração, parte das gemas foi imersa em água e parte em suspensão composta por água e inoculante. O tempo de imersão foi de 60 minutos e, posteriormente, as gemas foram plantadas em tubetes.

O inoculante desenvolvido pela Embrapa Agrobiologia era composto por cinco estirpes bacterianas: BR11335 (*Herbaspirillum seropedicae*), BR11504 (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*), BR11281T (*Gluconacetobacter diazotrophicus*), BR11366T (*Burkholderia tropica*) e BR11145 (*Azospirillum amazonense*); selecionadas pela equipe de Joahna Doberëiner. O inoculante teve suas colônias puras misturadas a um meio turfoso estéril pesando 250 g e embaladas em sacos de polietileno (REIS; PEREIRA; HIPÓLITO, 2009). Cada grama de turfa possuía em torno de 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) de cada estirpe.

A suspensão para inoculação foi feita de acordo com Reis, Pereira e Hipólito (2009) e Schultz et al. (2012). Seguindo a dose de 1250 g do inoculante em um volume de 100 L de água, foram utilizados 10 L de água e 25 g do inoculante (5 g de cada estirpe). A suspensão continha aproximadamente $6,0 \times 10^6$ células por ml. As gemas ficaram imersas por 60 minutos e, posteriormente, foram plantadas em tubetes.

Foram utilizados 240 tubetes de 180 cm^3 (cada parcela ou unidade amostral foi composta por dez tubetes), preenchidos com substrato da marca Basaplant[®], cujas características químicas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Características químicas dos colmos utilizados para produzir as mudas e do substrato.

Parâmetros	Colmos para mudas	Substrato
pH (CaCl ₂)	--	5,8*
Nitrogênio (g kg ⁻¹ N)	5,2	5,9
Fósforo (g kg ⁻¹ P ₂ O ₅)	0,5	2,6
Potássio (g kg ⁻¹ K ₂ O)	1,2	2,1
Cálcio (g kg ⁻¹ CaO)	39,1	11,6
Magnésio (g kg ⁻¹ MgO)	1,4	8,1
Enxofre (g kg ⁻¹ SO ₄)	2,8	2
Boro (mg kg ⁻¹)	39,0	22
Cobre (mg kg ⁻¹)	15,0	114
Ferro (g kg ⁻¹)	6456,0	11,3
Manganês (mg kg ⁻¹)	75,0	353
Zinco (mg kg ⁻¹)	26,0	86
Umidade (g kg ⁻¹)	270,0	31,9
Matéria Orgânica (g kg ⁻¹ C)	854,0	610,2
Carbono Orgânico (g kg ⁻¹)	495,4	353,9
Relação C/N	95:1	59:1

* Valor informado pelo fabricante.

Os tubetes com as gemas foram levados à casa de vegetação e submetidos a irrigações diárias ativadas a cada 6 horas por um sistema automatizado. Cada um dos seis turnos de rega aplicou uma lâmina de 2,5 mm, totalizando 15 mm dia⁻¹. Tal manejo de irrigação foi necessário devido às temperaturas elevadas e baixa umidade relativa do ar ocorridas no período do experimento.

Para utilização das mudas foi preciso comprovar eficiência da inoculação das gemas. Para tanto, amostras das gemas foram enviadas ao Laboratório de Gramíneas da Embrapa Agrobiologia em Seropédica-RJ, onde foram realizadas as contagens quatro dias após a inoculação (26 de fevereiro de 2013). A contagem de microrganismos ocorreu conforme descrito por Döbereiner et al. (1995), utilizando os meios de cultura semi-sólidos e semi-seletivos “JNFB”, “LGI” (DÖBEREINER et al., 1995), “LGI-P caldo” (REIS et al., 1994) e “JMV” (BALDANI, 1996), no qual a presença ou ausência da película característica de bactéria diazotrófica em meio

semi-sólido foi o método utilizado para determinar o número mais provável (NMP) de células em um grama do material macerado.

A infecção foi considerada eficiente, pois elevou o número de células das bactérias nas gemas em relação às gemas não inoculadas (Tabela 2).

Tabela 2. Número populacional de bactérias diazotróficas em meios de cultura semi-sólidos e semi-seletivos: JNFB, LGI, LGI-P caldo e JMV. Contagem realizada através da técnica do número mais provável (NMP) de células.

Amostras* ¹	Meios de Cultura			
	LGI ----- (n° células g ⁻¹ de material fresco x 10 ⁸) -----	JMV	LGI-Pcaldo	JNFB
Gema com 5,0 g sem inoculante	3,0	4,0	0,7	4,5
Gema com 5,0 g com inoculante	450	110	140	110
Gema com 9,0 g sem inoculante	2,0	4,5	6,5	15
Gema com 9,0 g com inoculante	140	140	140	140
Gema com 16,0 g sem inoculante	0,7	0,9	4,0	0,9
Gema com 16,0 g com inoculante	140	110	30	110

*¹ Gemas com 5,0, 9,0 e 16,0 g de matéria fresca correspondem a gemas com 1,5, 3,0 e 4,5 g de matéria seca, respectivamente.

3.1.2. Delineamento experimental

O delineamento foi em blocos casualizados com quatro repetições e seis tratamentos (Tabela 3), arrançados em esquema fatorial 2 x 3, em que o primeiro fator, inoculante, apresentou dois níveis (I₁ = sem inoculante e I₂ = com inoculante); e o segundo fator, quantidade de reserva nas gemas, três níveis (G₁ = 1,5, G₂ = 3,0 e G₃ = 4,5 g de matéria seca).

Tabela 3. Tratamentos do experimento 1, com combinação da aplicação do inoculante com quantidade de reserva nas gemas.

Tratamentos	Inoculante	Reserva nas gemas (g de MS)
1	Sem	1,5
2	Sem	3,0
3	Sem	4,5
4	Com	1,5
5	Com	3,0
6	Com	4,5

3.1.3. Avaliações

3.1.3.1. Índice de velocidade de brotação (IVB)

A brotação foi avaliada diariamente e considerada quando o broto se sobressaía à superfície do substrato. A partir da contagem diária das brotações, foi calculado o índice de velocidade de germinação de Maguire (1962), aqui chamado de índice de velocidade de brotação (IVB), obtido pela seguinte equação:

$$IVB = (B_1/N_1 + B_2/N_2 + B_3/N_3 + \dots + B_n/N_n),$$

em que: B_n é o número de brotações computadas nas “n” contagens e N_n é o número de dias do plantio das gemas às “n” contagens.

3.1.3.2. Biometria das plantas

Dados biométricos de altura (cm) e massas de matéria seca (g) do sistema radicular (MSR), parte aérea (MSPA) e total (MST) foram determinados ao final dos 50 dias do experimento. A altura foi determinada medindo-se da base da planta até a lígula da folha +1 (sistema de numeração de Kuijper) utilizando uma régua graduada; já a matéria seca foi determinada desmembrando-se a planta em parte aérea (colmo, folhas verdes e folhas secas/palha) e raízes. O material foi lavado

para retirada de impurezas e, posteriormente, seco em estufa a 65 °C. Após a secagem, o material foi pesado em uma balança semi-analítica, determinando a MSR e MSPA. A MST foi obtida pela soma da MSR com a MSPA.

3.2. Experimento 2: mudas pré-brotadas em vasos a campo submetidas à inoculação e adubação nitrogenada

3.2.1. Coleta e características químicas e físicas do solo

O solo utilizado foi coletado na região de Águas de São Pedro – SP, em uma área sem qualquer cultivo, cujos resultados das análises química e granulométrica são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Atributos químicos e físicos do solo utilizado coletado na região de Águas de São Pedro – SP.

Análise Química do Solo												
pH (CaCl ₂)	M.O. (g dm ⁻³)	P (resina) (mg dm ⁻³)	K	Ca	Mg	H+Al (mmolc dm ⁻³)	Al	SB	CTC	V%	m%	S (mg dm ⁻³)
5,0	2,0	3,0	0,1	4,0	1,0	12,0	0,0	5,0	17,0	30,0	0,0	11,0
Análise Textural do Solo												
Areia Fina	Areia Grossa	Areia Total	Silte			Argila			Textura			
----- (%) -----												
46,7	44,8	91,5	1,6			6,9			Arenosa			

Pelas composições químicas e granulométricas (Tabela 4), o solo foi caracterizado de baixa fertilidade e arenoso. De acordo com Gosal et al. (2012) e Oliveira et al. (2006) este tipo de solo é mais responsivo à adubação nitrogenada e à inoculação.

3.2.2. Calagem e fosfatagem

Baseando-se na análise química do solo e nas recomendações de Raij et al. (1997), foram calculadas e aplicadas as quantidades de calcário para 96 kg de solo. Pretendeu-se elevar a saturação por bases do solo para 60%. Para cada 96 kg de solo, correspondente à massa de solo destinado a cada vaso, foi aplicado o equivalente a 418 kg ha⁻¹ de calcário (20 g por vaso) com 45% de CaO e 18% MgO e PRNT de 122%. O calcário foi incorporado ao solo utilizando uma betoneira. Após três meses, foi feito processo semelhante ao do calcário com o superfosfato simples. Foi aplicado o equivalente a 100 kg ha⁻¹ de P₂O₅ (25 g de superfosfato simples por vaso) ao solo e homogeneizado com betoneira para posteriormente transferi-lo para os vasos.

3.2.3. Área experimental e montagem dos vasos

Foi selecionada uma área nivelada, de aproximadamente 80 m² e sem qualquer vegetação arbórea nas proximidades, a fim de evitar interferências da exposição dos vasos à radiação solar. Foi aplicado na área em pós-emergência glifosato para controle de plantas daninhas e, posteriormente, a área foi coberta por uma lona plástica e, em seguida, despejada uma camada de brita zero sobre a lona. Para apoio de cada vaso, foram utilizadas quatro lajotas de oito furos, distribuídas de forma que o espaçamento entre os vasos fosse de 0,5 m.

Os vasos de 130 L com diâmetros superior e inferior a 0,60 m e altura de 0,45 m foram obtidos a partir de bombonas plásticas de 260 L cortadas ao meio com serra circular. No fundo de cada vaso foram feitos 16 furos com broca de 10 mm para drenagem. Os vasos foram preenchidos com uma camada de 10 cm de brita zero, coberta por uma manta acrílica 100 (100 g m⁻²) em poliéster com a finalidade drenar a água e evitar a perda de solo. Sobre a manta, foi colocado 96 kg (ou 80 L) de solo corrigido tanto pela calagem, quanto pela fosfatagem.

Foram montados, no total, 64 vasos, considerando cada vaso como unidade experimental (parcela).

3.2.4. Adubação do solo e transplântio de mudas

As adubações foram realizadas seguindo as indicações de Raij et al. (1997). A adubação em cada vaso foi feita através da abertura de uma cova, aplicando o equivalente 100 kg ha^{-1} de P_2O_5 (25 g de superfosfato simples por vaso). Após essa aplicação, foram transplantadas as mudas com 50 dias de idade, aproveitadas do Experimento 1. Foram selecionadas plantas provenientes de gemas com valores intermediários de reserva (gemas com 3,0 g de MS). Para fornecimento de potássio, foi aplicado equivalente a 150 kg ha^{-1} de K_2O (22,5 g de cloreto de potássio por vaso) parcelado em duas aplicações de 11,25 g de KCl, sendo uma no momento do plantio e outra em cobertura (30 DAT). O potássio foi diluído em água e aplicado em cada vaso 73,3 ml de solução contendo 11,25 g de KCl. Na mesma solução, foi diluído 2 g de Cana Micros Plus[®] (10% S, 5% B, 4,5% Cu, 4,4 % Mn, 1% de Mo e 11% Zn) como fonte de micronutrientes. Para adubação nitrogenada, nos tratamentos em que foram utilizadas, foi utilizado sulfato de amônio (20 % de N) diluído em água ($312,5 \text{ mg ml}^{-1}$ de sulfato de amônio ou $62,5 \text{ mg ml}^{-1}$ de N), contendo 1,04% em átomos de ^{15}N e aplicado 80 ml da solução (equivalente a 50 kg ha^{-1} de N) com pipeta em um sulco circular, aberto ao redor da planta e coberto após a aplicação.

3.2.6. Controle de pragas e doenças

Não houve o aparecimento de doenças, porém houve o aparecimento de pulgões (*Melanaphis sacchari*) e lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*). O controle foi feito através de catação manual, evitando o risco de afetar os tratamentos com inoculante.

3.2.7. Dados meteorológicos e irrigação

Os dados meteorológicos foram coletados na estação meteorológica automática pertencente à APTA Polo Centro Sul, localizada a 25 m de distância do experimento.

O fornecimento de água para o experimento ocorreu por meio de chuvas e irrigação. A irrigação foi realizada para manter capacidade de campo, utilizando água deionizada aplicada com baldes de 5 L graduados.

3.2.8. Delineamento experimental

O delineamento foi em blocos casualizados com quatro repetições e 16 tratamentos (Tabela 5), arranjos em esquema fatorial (2 x 2 x 4). Os fatores componentes dos tratamentos foram: (1) Com e sem inoculação; (2) Doses de N de 0 e 50 kg ha⁻¹; (3) Épocas de avaliações, aos 45, 90, 135 e 180 dias após o transplântio (DAT).

Tabela 5. Tratamentos constituídos da combinação da aplicação do inoculante com nitrogênio em quatro épocas de avaliação .

Tratamentos	Inoculante	Dose de N (kg ha ⁻¹)	Épocas de Avaliação (DAT)
1	Sem	0	45
2	Sem	0	90
3	Sem	0	135
4	Sem	0	180
5	Sem	50	45
6	Sem	50	90
7	Sem	50	135
8	Sem	50	180
9	Com	0	45
10	Com	0	90
11	Com	0	135
12	Com	0	180
13	Com	50	45
14	Com	50	90
15	Com	50	135
16	Com	50	180

3.2.9. Avaliações

3.2.9.1. Índice SPAD

O índice foi determinado na folha +1 utilizando o medidor de clorofila SPAD-502 da marca Konica Minolta. Nos vasos que apresentaram perfilhamento, foram aferidos, em todas as folhas +1, os valores do índice SPAD e feitas as médias.

3.2.9.2. Análise de crescimento

a. Perfilhamento, somatória das alturas (Σ ALT) e dos diâmetros (Σ DIAM)

Antes de cada avaliação destrutiva, foi feita a contagem do número de perfilhos por vaso e a medição das alturas somadas (Σ ALT) dos perfilhos, feita da base da planta até a folha +1. No caso de haver mais que um perfilho por vaso, estas alturas foram somadas. Realizou-se também a somatória dos diâmetros (Σ DIAM), medidos na base de cada perfilho e somados quando existiam mais perfilhos.

b. Área foliar (AF), matéria seca de colmos (MSC), matéria seca de folhas (MSF), matéria seca de palha (MSP) e matéria seca total (MST)

Nas avaliações destrutivas, foram, primeiramente, retiradas as partes aéreas de cada vaso, separados em colmos, folhas verdes e palha. Nas folhas verdes, foi medida a área foliar (cm^2) com um medidor portátil de área foliar da marca CID Bio-Science modelo CI-203. A seguir, os materiais vegetais das partes da planta foram colocados em sacos de papel e levados à estufa a 65°C até que atingissem massa constante. Cada parte da planta foi pesada em uma balança semi-analítica (precisão 0,01 g) e determinou-se a matéria seca de colmos (MSC), folhas (MSF) e palha (MSP). A matéria seca total (MST) foi obtida pela soma da matéria seca (g) de todas as partes da planta (MSC, MSF, MSP e MSR).

c. Determinação do comprimento radicular (CR) e matéria seca de raízes (MSR)

O sistema radicular foi separado do solo ainda no campo com auxílio de duas peneiras sobrepostas, uma de malha de 2,0 mm e outra de 1,0 mm, e de água corrente. Os vasos foram cortados ao meio e colocados sobre as peneiras. A maior parte do solo foi retirada com o auxílio de jatos de água. As raízes foram levadas ao laboratório, colocadas sobre as peneiras sobrepostas e lavadas minuciosamente. Após a lavagem, as raízes foram armazenadas em sacos plásticos contendo uma

solução de etanol 10% e colocadas em geladeira a 5°C, para melhor conservação, até o momento das avaliações (NAVROSKI et al., 2010).

As raízes foram tiradas da solução dispostas em bandejas acrílicas transparentes, com dimensões de 21 x 30 cm, preenchidas com água. As bandejas foram colocadas em um *scanner* de alta resolução modelo HP Scanjet G4050 e as imagens das raízes foram digitalizadas com uma definição de 300 dpi. As imagens geradas foram processadas pelo software Safira (JORGE; SILVA; RODRIGUES, 2010) e, através das imagens, obtiveram-se os valores das somatórias de todos os eixos radiculares, o comprimento radicular (m).

Depois de escaneadas, as raízes foram acondicionadas em sacos de papel e levadas à estufa a 65°C, até obter massa constante. Após secas, as amostras foram pesadas em balança semi-analítica e obtiveram-se as massas de matéria seca de raízes (MSR).

d. Cálculo de índices fisiológicos

A partir dos valores obtidos nos itens anteriores foi possível calcular os seguintes índices (LUCHESE, 1984; MARAFON, 2012):

- **Índice de área foliar (IAF):**

$$IAF = AF/S,$$

em que: AF é a área foliar (cm²) e S é a área do solo do vaso disponível para o crescimento da planta (cm²);

- **Taxa de crescimento relativo (TCR):**

$$TCR = (\ln MST_2 - \ln MST_1)/(t_2 - t_1) = \quad , \text{ em } g \text{ g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$$

em que: \ln é o logarítmo neperiano e MST_1 e MST_2 são as massas de matéria seca, em gramas, nos tempos t_1 e t_2 ;

- **Taxa de produção de matéria seca (TPMS):**

$$TPMS = (MST_2 - MST_1) / S / (t_2 - t_1), \text{ em } g \text{ m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$$

em que: MST_1 e MST_2 são as massas de matéria seca, em gramas, nos tempos t_1 e t_2 (em dias), S é a área do solo do vaso (m^2);

- **Relação da parte aérea pelo sistema radicular (RPASR):**

$$RPASR = MSPA / MSR,$$

em que: $MSPA$ é a massa de matéria seca da parte aérea (g) e MSR é a matéria seca de raízes (g).

3.2.9.3. Acúmulo de nutrientes e cálculo da eficiência de recuperação do N-fertilizante (^{15}N)

Todo o material vegetal da parte aérea (colmos, folhas e palha) foi agrupado e moído em moinho de facas tipo Willey. O material moído foi acondicionado em sacos plásticos. Para o sistema radicular, o procedimento foi semelhante. Depois de identificados, todo o material vegetal foi encaminhado para determinação dos teores dos nutrientes de acordo com metodologia descrita por Malavolta; Vitti e Oliveira, (1997). Para análise de abundância de átomos de ^{15}N , parte do material moído foi separado, encaminhado ao Laboratório de Isótopos Estáveis da Embrapa Agrobiologia, localizado em Seropédica-RJ, onde as amostras foram moídas finamente, em um sistema semelhante ao de Arnold e Schepers (2004), para posteriormente serem analisadas. O acúmulo de nutrientes (A) no sistema radicular e na parte aérea das plantas por vaso foi calculado pela seguinte expressão:

$$A = MS \times T, \text{ em g}$$

em que: MS é a massa de matéria seca da parte aérea ou de raízes (g) e T é o teor do nutriente (g kg^{-1}).

O acúmulo de nutrientes na planta toda foi obtido pela soma do total de nutrientes acumulados na parte aérea com os nutrientes acumulados nas raízes.

Com os resultados da abundância de átomos de ^{15}N em % das amostras da parte aérea e das raízes das plantas de cana-de-açúcar, foram calculados o N na planta proveniente do fertilizante (Nppf) e a eficiência da utilização do fertilizante nitrogenado (Eufn) por meio das seguintes expressões:

$$\text{Nppf (\%)} = [(a-c)/(b-c)] \times 100 ,$$

$$\text{Nppf (g vaso}^{-1}\text{)} = [\text{Nppf (\%)/100}] \times \text{NA} ,$$

$$\text{Eufn (\%)} = [\text{Nppf (g vaso}^{-1}\text{)} / \text{QNA (g vaso}^{-1}\text{)}] \times 100 ,$$

onde a e b são as abundância de ^{15}N (% em átomos) na parte da planta (parte aérea ou raízes) e no fertilizante (sulfato de amônio); c é a abundância natural de ^{15}N (0,366% em átomos), NA é o nitrogênio acumulado na planta (g vaso^{-1}) e QNA é a quantidade de N aplicado como fertilizante marcado (g vaso^{-1}). Assim como Vitti (1998), o parâmetro Nppf foi utilizado para se quantificar o aproveitamento pela planta do N do fertilizante em comparação ao N extraído de outras fontes, neste caso, o solo e fixação biológica de N atmosférico.

3.2.9.4. Análise química do solo

Ao final do experimento, foram coletadas amostras compostas de solo de cada vaso, utilizando trado tipo sonda e o material submetido à análise.

3.3. Análise dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, aplicando-se o teste F. Quando houve significância, foi feita comparação de médias pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Realizou-se, ainda, estudo de regressão polinomial para verificar o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas e do nitrogênio sobre algumas variáveis com relação ao tempo de avaliação. Todas as análises estatísticas foram realizadas empregando-se o programa AgroEstat (BARBOSA; MALDONADO JUNIOR, 2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento 1: brotação, altura e matéria seca de mudas pré-brotadas

Na fase de formação de mudas, a variedade RB867515 mostrou-se altamente responsiva à inoculação com bactérias diazotróficas e influenciada pela quantidade de reserva das gemas, sendo constatado efeito significativo destes fatores para todas as variáveis analisadas e ocorrendo interação entre eles apenas para altura de plantas (Tabela 6).

O IVB representa a brotação média diária, ou seja, quanto maior o índice calculado, mais rápida a brotação. Todos os tratamentos apresentaram 100% de gemas brotadas, diferindo quanto à velocidade da brotação. A média dos tratamentos com inoculação foi superior a dos tratamentos sem inoculação, demonstrando que as bactérias diazotróficas aceleraram a brotação (Tabela 6). Possivelmente isto ocorreu porque, em condições propícias (umidade, por exemplo), as gemas são ativadas e dão início ao processo de crescimento e desenvolvimento devido à presença de reservas nutricionais, atividade enzimática e fitorreguladores de crescimento (DILLEWIJN, 1952). As bactérias diazotróficas, através de sua

capacidade de síntese de diferentes fitorreguladores (SANTI et al., 2013), podem favorecer a brotação ao aumentar a concentração destes nas gemas.

Em relação às reservas das gemas, foi possível verificar que as gemas com 4,5 g de massa de matéria seca tiveram IVB superior às demais (gemas com 1,5 e 3 g de massa seca), as quais não diferiram entre si (Tabela 6).

De acordo com Carneiro et al. (1995), a reserva orgânica e de N dos minirrebolos têm influência direta sobre a brotação e desenvolvimento inicial da planta. No estudo realizado, Carneiro et al. (1995) observaram, através da técnica de diluição isotópica, que minirrebolos com maiores reservas de nitrogênio no plantio foram os maiores liberadores, em quantidade, deste nutriente e, por consequência, tiveram resposta positiva na brotação, assim como nos resultados obtidos no presente estudo ao realizar-se o tratamento com maior quantidade de reserva (Tabela 6).

As massas de matéria seca de raízes (MSR), parte aérea (MSPA) e total (MST), apresentaram ganhos com a inoculação de bactérias (Tabela 6). Muthukumarasamy et al. (2006). Em um experimento semelhante realizado na Índia com duas espécies bacterianas *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* sp. (estirpes T8 e H22, respectivamente), também estudadas aqui, observaram ganhos proporcionados pela inoculação. Dos tratamentos testados pelos autores, a combinação de duas bactérias diazotróficas proporcionou melhores resultados, tanto para biomassa de raízes, quanto para a parte aérea quando comparados à inoculação individual das estirpes e ao controle. Da mesma forma, Muñoz-Rojas e Caballero-Mellado (2003), também em um experimento de curta duração, constataram que a inoculação de estirpes bacterianas proporcionou maiores ganhos na parte aérea e sistema radicular de mudas micropropagadas, porém estes ganhos dependeram da variedade e das estirpes utilizadas. Resultados positivos também foram obtidos por Marques Júnior et al. (2008). Os autores testaram o efeito de bactérias diazotróficas e ácidos húmicos sobre minirrebolos tratados termicamente ou não. Eles constataram o efeito positivo da inoculação sobre os minirrebolos tratados termicamente, assim como constataram o fato de

a inoculação, combinada com ácidos húmicos, também proporcionar ganhos, mas apenas em biomassa da parte aérea, comprimento e área radicular.

A quantidade de reserva das gemas também influenciou a produção de MSR, MSPA e MST (Tabela 6). Gemas com reserva de 1,5 g apresentaram resultados inferiores aos demais tratamentos (gemas com 3,0 e 4,5 g de reserva). Apenas para MSR, as gemas com 3,0 g tiveram resultados que não diferiram tanto de gemas com 1,5 quanto com 4,5 g.

Segundo Carneiro et al. (1995), 50-60 dias após o plantio é o período em que as maiores taxas de exportação de N ocorrem e de 60-70 dias é quando ocorre maior degradação da reserva orgânica do minirrebolo. Essas informações da literatura associadas aos resultados deste estudo revelam que as reservas orgânicas e de N do colmo devem ser consideradas, junto com outros fatores, responsáveis por influenciar a produtividade da cana-planta, ou seja, na fase inicial. A maior parte do que é utilizado pela planta é proveniente das reservas do minirrebolo, explicando as maiores produções de massa de matéria seca para gemas com maiores reservas.

Tabela 6. Índice de velocidade de brotação (IVB) e produção de matéria seca de raízes (MSR), parte aérea (MSPA) e total (MST) de mudas de cana-de-açúcar com 50 dias de idade.

Fatores	IVB	Altura (cm)	MSR	MSPA	MST
			----- (g planta ⁻¹)-----		
Sem inoculante	0,92 b	5,58 b	0,15 b	0,50 b	0,65 b
Com inoculante	1,42 a	7,97 a	0,31 a	1,21 a	1,52 a
Gema 1,5 g	1,07 b	5,46 b	0,19 b	0,60 b	0,80 b
Gema 3,0 g	1,12 b	7,23 a	0,24 ab	0,90 a	1,14 a
Gema 4,5 g	1,32 a	7,63 a	0,26 a	1,05 a	1,31 a
		Teste F			
Inoculante (I)	204,17 **	114,95 **	83,41 **	71,58 **	100,44 **
Gemas(G)	19,12 **	35,74**	4,60 *	9,71 **	11,85 **
IxG	3,52 ns	10,92 **	0,22 ns	2,19 ns	1,79 ns
CV(%)	7,32	8,08	18,92	24,14	19,71

Médias seguidas pela mesma letra, em colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade; * e ** significativo a 5 e 1%, respectivamente; ns: não significativo. CV: coeficiente de variação.

A altura foi o único parâmetro influenciado pela interação entre inoculante e reserva nas gemas (Tabela 6). Para os tratamentos sem inoculante, a maior quantidade de reserva (4,5 g) promoveu incremento nas alturas em relação a menor quantidade (1,5 g). A intermediária (3,0 g) não diferiu das demais (Tabela 7). Em relação aos tratamentos inoculados, verificou-se que as reservas de 3,0 e 4,5 g não diferiram entre si e apresentaram ganhos na altura de aproximadamente 50% em relação ao tratamento com menor reserva (1,5 g) (Tabela 7). De modo geral, foi possível observar que quanto maiores as reservas, maiores as alturas (Tabela 7). Os resultados concordam com estudo realizado por Simões Neto e Marcos (1987), com diferentes quantidades de reserva nos minirrebolos, no qual maiores reservas também refletiram maiores alturas de plantas.

Tabela 7. Desdobramento da interação entre inoculante e quantidade de reserva nas gemas referente a altura das plantas (cm).

Inoculante	Quantidade de reserva nas gemas (g)		
	1,5	3,0	4,5
Sem	4,98 Bb	5,52 Bab	6,24 Ba
Com	5,94 Ab	8,95 Aa	9,02 Aa
DMS colunas (5%)	0,82 cm		
DMS linhas (5%)	1,00 cm		

Letras diferentes, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%. DMS: diferença mínima significativa.

4.2. Experimento 2: acúmulo de material vegetal, nutrientes e estimativa da recuperação do N-sulfato de amônio (^{15}N) na cana-de-açúcar até os 180 DAT

Durante a condução do experimento a campo, de 22 de abril a 29 de outubro de 2013, a temperatura média foi de 20,4 °C e a precipitação pluvial acumulada foi de 620,2 mm. Também foram necessárias irrigações suplementares (volume total de 196,2 mm) para que o crescimento da cultura não fosse prejudicado (Figura 1).

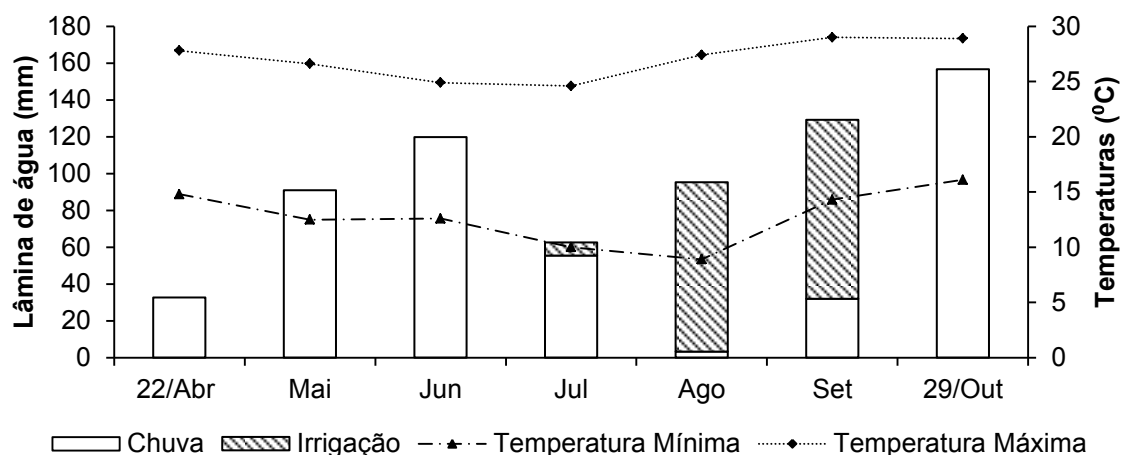


Figura 1. Volume de água recebida pela cultura e temperaturas médias, máximas e mínimas, ocorridas no período de 22 de abril a 29 de outubro de 2013, durante a condução do experimento 2.

Na Tabela 8 estão expostos os resultados das características químicas finais dos solos dos vasos. O pH dos tratamentos que utilizaram sulfato de amônio ficaram reduzidos em relação aos tratamentos sem N. De acordo com Costa et al., (2008), a maior acidificação do solo pelo sulfato de amônio se deve à nitrificação do NH_4^+ , pois há liberação de H^+ e NO_3^- , acidificando o solo. Além disso, o SO_4^{2-} , presente na sua estrutura, e o NO_3^- podem promover a lixiviação de bases, também contribuindo para maior acidez do solo e redução da V%. Para K, Ca e Mg foram verificadas menores quantidades para os tratamentos com N, pelo maior desenvolvimento das plantas destes tratamentos e conseqüentemente maior extração do solo. O enxofre presente em maiores quantidades no solo dos tratamentos T8 e T16 é devido à fonte de N utilizada (sulfato de amônio), que fornece cerca de 24% de S.

Tabela 8. Média das análises químicas dos solos dos tratamentos sem inoculante e sem nitrogênio (T4), sem inoculante e com nitrogênio (T8), com inoculante e sem nitrogênio (T12) e com inoculante e com nitrogênio (T16), aos 180 dias após o transplântio.

Tratamentos ¹	pH (CaCl ₂)	M.O. (g dm ⁻³)	P (resina) (mg dm ⁻³)	K	Ca	Mg	H+Al	Al	SB	CTC	V%	m%	S (mg dm ⁻³)	
				----- (mmolc dm ⁻³) -----										
4	6,4	<5,0	17,5	2,2	4,2	1,5	7,0	0,3	7,9	14,9	52,8	3,7	7,25	
8	5,9	<5,0	15,5	1,2	2,8	0,8	8,0	0,5	4,8	12,8	37,5	8,7	9,75	
12	6,5	<5,0	15,8	2,3	4,3	1,6	7,0	0,5	8,2	15,2	53,5	5,5	6,25	
16	5,9	<5,0	17,8	1,3	2,5	0,7	8,5	0,3	4,5	13,0	34,5	6,1	10,25	

¹Tratamentos correspondem aos da última avaliação aos 180 DAT, em que: T4: sem inoculante + 0 N; T8: sem inoculante + 50 N; T12: com inoculante + 0 N e T16: com inoculante + 50 N.

Avaliando isoladamente os efeitos de cada um dos fatores sobre número de perfilhos, somatória das alturas (Σ ALT) e diâmetros (Σ DIAM), comprimento de raízes (CR) e matéria seca de raízes (MSR), colmos (MSC), folha (MSF), palha (MSP) e total (MST), foi possível verificar que o inoculante (I) não favoreceu o número de perfilhos por vaso, MSR e MSF (Tabela 9). Já o nitrogênio (N) proporcionou ganhos altamente significativos para todas as variáveis mencionadas (Tabela 9).

Apesar da massa do sistema radicular não ter sido favorecida pela inoculação, é possível inferir que as bactérias diazotróficas modificaram a arquitetura do sistema radicular, como observado por Hari e Srinivasan (2005) e Gosal et al. (2012). Isto porque, mesmo apresentando massas iguais, o comprimento radicular dos tratamentos inoculados foi maior que os não inoculados (Tabela 9) e, portanto, composto por um sistema radicular mais fino, que propicia maior superfície de contato, permitindo captar mais água e nutrientes (VESSEY, 2003; BHATTACHARJEE et al., 2008). Esta alteração é atribuída à síntese de hormônios que alteram a morfologia das raízes, favorecendo o aumento das raízes laterais e pêlos radiculares (OKUMURA et al., 2013; SANTI et al., 2013). Tal fato pôde ser constatado a partir da segunda avaliação (Figura 2).

Tabela 9. Número de perfilhos, somatória de altura (Σ ALT) e diâmetro (Σ DIAM), comprimento de raízes (CR) e massas de matéria seca de raízes (MSR), colmos (MSC), folhas (MSF), palha (MSP) e total (MST) de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em vasos até os 180 DAT.

Fatores	Perfilhos por vaso	Σ ALT (cm)	Σ DIAM (mm)	CR (m)	----- (g vaso ⁻¹) -----				
					MSR	MSC	MSF	MSP	MST
Sem inoculante	4,40	61,77 b	48,31 b	90,88 b	30,35	24,17 b	13,60	12,03 b	80,15 b
Com inoculante	4,56	72,70 a	54,34 a	114,96 a	31,96	27,95 a	14,69	15,17 a	89,78 a
0 kg ha ⁻¹ de N	1,41 b	16,67 b	14,88 b	25,82 b	7,68 b	3,92 b	3,38 b	2,82 b	17,81 b
50 kg ha ⁻¹ de N	7,56 a	117,81 a	87,78 a	180,02 a	54,63 a	48,20 a	24,90 a	24,38 a	152,12 a
45 DAT	2,94 b	22,46 d	20,50 d	10,10 d	3,04 d	3,47 d	2,80 c	0,66 d	9,96 d
90 DAT	3,63 b	60,36 c	43,56 c	55,19 c	16,63 c	21,76 c	8,21 b	5,96 c	52,56 c
135 DAT	5,81 a	85,36 b	64,44 b	134,50 b	40,71 b	30,42 b	21,22 a	15,27 b	107,62 b
180 DAT	5,56 a	100,77 a	76,81 a	211,89 a	64,25 a	48,59 a	24,36 a	32,51 a	169,72 a
Teste F									
Inoculante (I)	0,26 ns	8,46 **	5,27 *	31,69 **	1,38 ns	5,45 *	1,48 ns	8,81 **	5,90 *
Nitrogênio (N)	406,05 **	724,12 **	769,41 **	1298,90 **	1171,29 **	745,50 **	569,47 **	415,54 **	1147,31 **
Época (E)	21,63 **	82,71 **	88,40 **	432,76 **	387,50 **	133,83 **	130,52 **	174,70 **	304,70 **
IxN	5,53 *	12,22 **	5,94 *	28,68 **	1,74 ns	4,87 *	1,80 ns	8,75 **	6,02 *
IxE	1,57 ns	3,21 *	1,24 ns	4,58 **	0,19 ns	2,16 ns	0,52 ns	1,79 ns	1,00 ns
NxE	24,84 **	63,43 **	72,66 **	297,54 **	268,23 **	100,84 **	101,03 **	129,11 **	219,55 **
IxNxE	0,21 ns	1,79 ns	0,41 ns	5,64 **	0,30 ns	1,81 ns	0,90 ns	1,87 ns	1,33 ns
CV(%)	27,25	22,36	20,48	16,63	17,61	24,89	25,50	31,10	18,67

Médias seguidas pela mesma letra, em colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade; * e ** significativo a 5 e 1%, respectivamente; ns: não significativo. DAT: dias após o transplante. CV: coeficiente de variação.

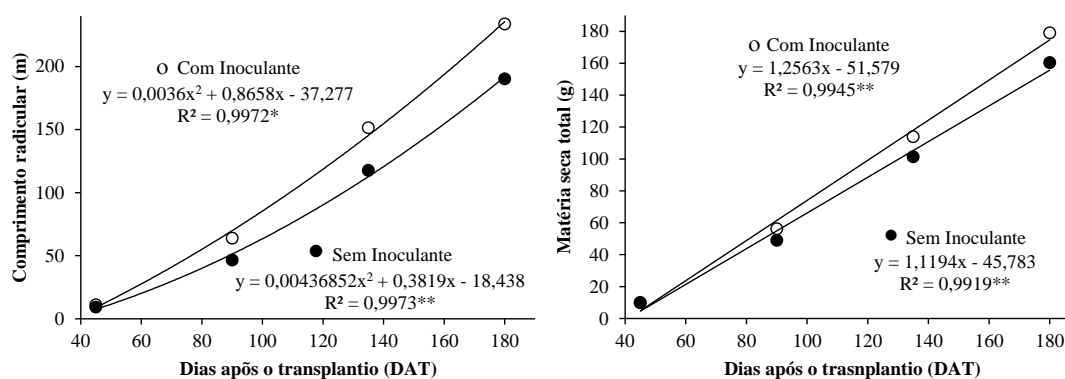


Figura 2. Produção de massa de matéria seca total, relação entre produção de matéria seca na parte aérea pelo sistema radicular e comprimento radicular, com e sem inoculação, em função do tempo.

Tanto para tratamentos inoculados, quanto não inoculados, a MST teve comportamento linear, mas é possível verificar que o coeficiente angular dos tratamentos inoculados foi maior do que os não inoculados, refletindo no aumento da diferença entre eles ao longo do tempo (Figura 2).

O efeito do N, ao longo do tempo, promoveu ganhos crescentes até os 180 dias para somatória das alturas e diâmetros, MSR, MSC, MSP e MST (Figura 3). Por outro lado, quando a cana-de-açúcar não foi adubada com a dose de 50 kg de N, verificou-se que as plantas apresentaram baixo desenvolvimento e a diferença entre as adubadas foi visualizada já a partir da segunda amostragem (Figuras 3).

O número de perfilhos teve um comportamento similar ao da MSF, houve crescimento até os 135 DAT, estabilizando-se após este período e, segundo Orlando Filho e Rodella (1995) e Simões et al. (2005), deverá diminuir após este período por coincidir com os efeitos de competição e auto-sombreamento ou fechamento da cultura.

Em relação à parte aérea, apenas colmos e palha responderam à inoculação e à interação com N. A maior produção de palha pode ser efeito da deficiência de N, pois houve o crescimento da planta e, possivelmente, diluição do N do fertilizante absorvido. Segundo Hawkesford et al. (2012), quando ocorre a carência de N, a planta passa a mobilizá-lo de folhas mais velhas para as mais jovens, promovendo uma clorose generalizada e senescência de folhas (formação de palha) (Figura 3).

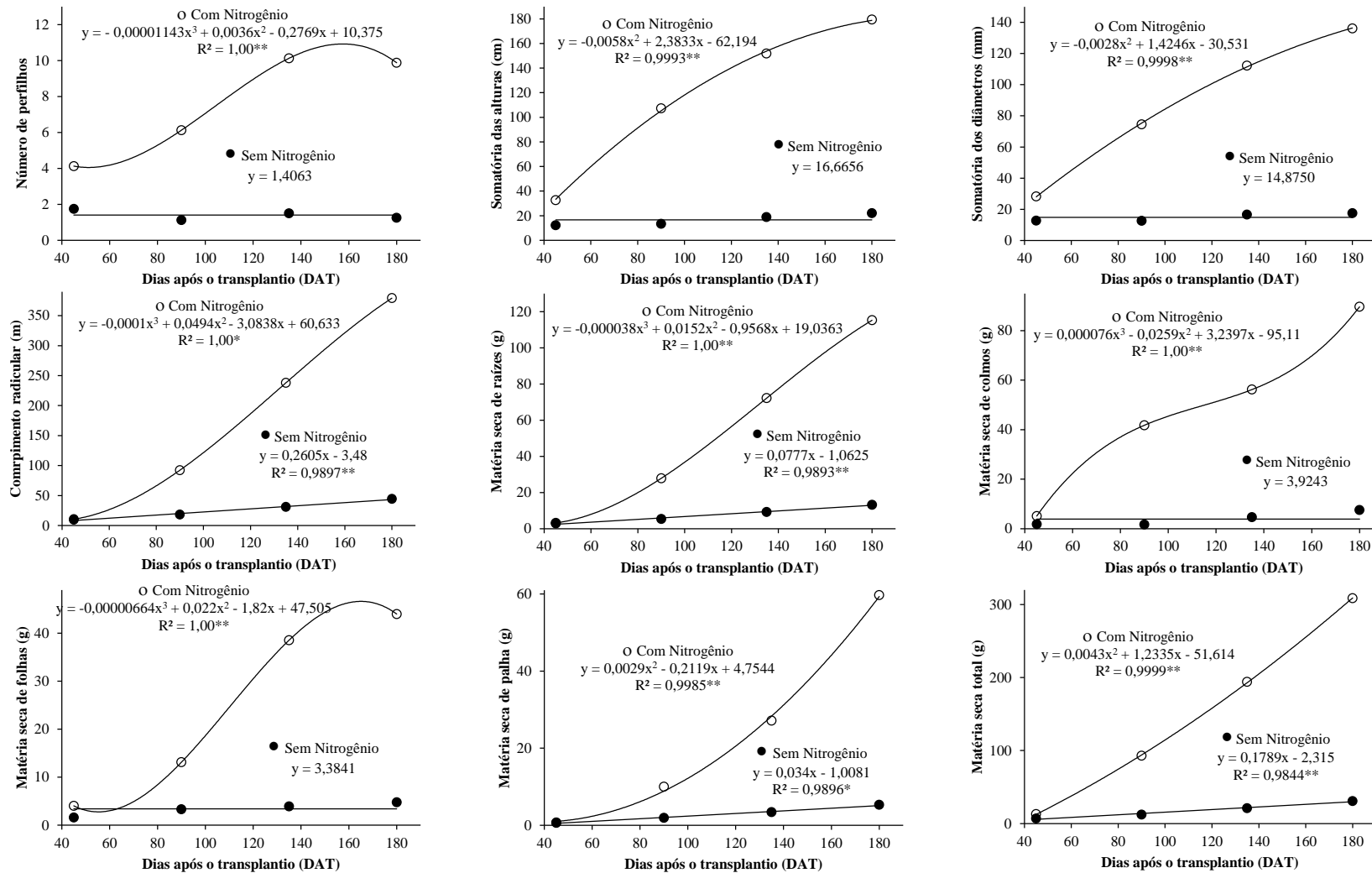


Figura 3. Número de perfilhos, somatória das alturas e diâmetros e massas de matéria seca de raízes, colmos, folhas, palha e total por vaso, com e sem nitrogênio, na dose de 50 kg ha^{-1} , em função do tempo.

O aumento da produção de palha também pode explicar o comportamento da MSF que, após os 135 DAT, demonstrou uma redução no acréscimo de matéria seca, mesmo nos tratamentos com N, enquanto a MSP (folhas secas) apresentou um crescimento linear sem N e exponencial com N (Figura 3).

Ao observar as interações, verificou-se que as respostas à inoculação são causadas pela interação I x N, inclusive para o número de perfilhos que não apresentou resposta ao fator inoculação isoladamente (Tabela 9).

Nos desdobramentos das interações significativas de I x N (Figura 4) foi constatado que, quando o inoculante foi associado ao fertilizante nitrogenado, houve acréscimos significativos em todas as variáveis em relação ao uso apenas do N. Os ganhos para número de perfilhos, somatória das alturas e diâmetros, comprimento de raízes, MSC, MSP e MST foram de 12, 23, 15, 30, 17, 30 e 14%, respectivamente. Similarmente aos resultados obtidos por Muthukumarasamy et al. (2006), verificou-se que bactérias diazotróficas influenciam positivamente a produção de massa de matéria seca total.

Estudos de diversos autores (HARI; SRINIVASAN, 2005; MUTHUKUMARASAMY et al., 2006; GOSAL et al., 2012) constataram que bactérias promotoras de crescimento possibilitam a redução no uso de fertilizantes. No Brasil, são observadas baixas respostas de cana-planta ao uso de nitrogênio, possivelmente pela matéria orgânica (M.O.) presente no solo suprir boa parte da necessidade da cultura e pela provável ocorrência da fixação biológica (ROSSETTO et al., 2010; URQUIAGA et al., 2012). Já Oliveira et al. (2006), observaram que as maiores respostas ao uso de bactérias diazotróficas ocorriam em solos de média e baixa fertilidade. Como no presente estudo, foi utilizado um solo de baixa fertilidade e com baixo teor de M.O. ($2,0 \text{ g dm}^{-3}$), verificou-se respostas altamente significativas ao uso de nitrogênio e o incremento ocasionado pelo inoculante foi devido à interação com nitrogênio.

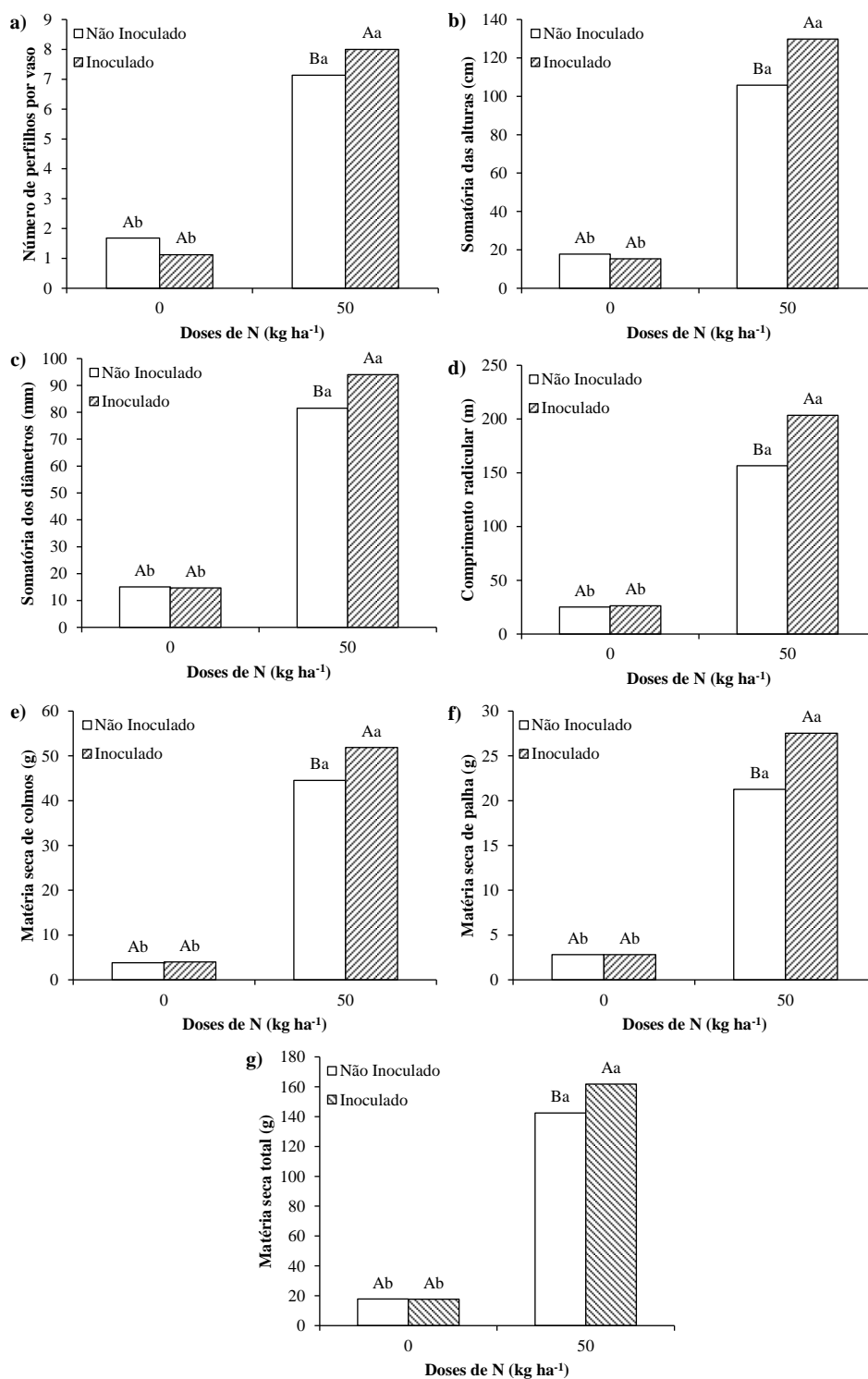


Figura 4. Desdobramento da interação entre Inoculação e Doses de N para: a) número de perfilhos, b) somatória das alturas, c) somatória dos diâmetros, d) comprimento radicular, e) matéria seca de colmos, f) matéria seca de palha e g) matéria seca total. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste Tukey a 5%, sendo que maiúsculas comparam inoculação dentro de doses de N e minúsculas comparam doses de N dentro de inoculação.

Na Tabela 9 é possível observar que o índice SPAD, relação da parte aérea pelo sistema radicular (RPASR), taxa de crescimento relativo (TCR), taxa de produção de matéria seca (TPMS) e índice de área foliar (IAF) não foram influenciados pela inoculação, mesmo quando combinados à adubação nitrogenada. Para RPASR, tanto tratamentos inoculados, quanto não inoculados, verificou-se uma redução nos valores ao longo do tempo, indicando uma carência de N (Figura 5).

Por outro lado, todos os fatores foram influenciados pela aplicação de N (Tabela 9).

Ao se observar o comportamento do índice SPAD, a RPASR e o IAF no tempo em função da aplicação de N, verificaram-se indícios de que, mesmo nos tratamentos adubados, houve deficiência de N, indicando que as bactérias não conseguiram suprir a necessidade das plantas (Figura 6).

O índice SPAD reflete teores relativos de clorofila, ou seja, indica a intensidade da coloração verde na folha. Como a clorose ficou mais evidente ao longo do tempo, os valores deste índice também foram reduzidos, tanto para 0 quanto para 50 kg ha⁻¹ de N, demonstrando a diluição e deficiência de N (Figura 6).

De acordo com Hawkesford et al. (2012), quando há deficiência de N, além dos sintomas mencionados anteriormente, podem haver reduções no alongamento foliar e na RPASR, já que o sistema radicular pode continuar a se desenvolver em relação à parte aérea por necessitar explorar um maior volume de solo, compensando a carência. O IAF aumentou até os 135 DAT, período no qual, possivelmente, o suprimento de N foi suficiente. Ao reduzir o suprimento abaixo da necessidade da planta (após os 135 DAT), o IAF teve seus valores reduzidos (Figura 6). Além disso, a redução no IAF também pode ocorrer porque, após o período de intenso crescimento (por volta de 180 dias), a cana passa a evitar gastos de energia para produção folhas verdes por iniciar o processo de maturação e também porque, devido a redução do número de perfilhos (Figura 3), há consequente redução da área foliar (AQUINO; MEDINA, 2014).

Tanto para RPASR, quanto IAF, os valores dos tratamentos não adubados se mantiveram estáveis (Figura 6).

Tabela 10. Índice SPAD, relação da parte aérea pelo sistema radicular (RPASR), taxa de crescimento relativo (TCR), taxa de produção de matéria seca (TPMS) e índice de área foliar (IAF) de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em vasos até os 180 DAT em função da aplicação de inoculante e doses de nitrogênio.

Fatores	SPAD	RPASR	TCR (g g ⁻¹ dia ⁻¹)	TPMS (g m ⁻² dia ⁻¹)	IAF
Sem inoculante	29,98	1,83	0,03	3,13	0,45
Com noculante	29,37	1,80	0,02	3,50	0,47
0 kg ha ⁻¹ de N	27,05 b	1,41 b	0,02 b	0,59 b	0,11 b
50 kg ha ⁻¹ de N	32,30 a	2,22 a	0,03 a	6,04 a	0,82 a
45 DAT	39,24 a	2,40 a	0,05 a	0,72 b	0,10 c
90 DAT	30,11 b	1,84 b	0,03 b	3,34	0,29 b
135 DAT	25,98 bc	1,51 b	0,01 c	4,32 a	0,78 a
180 DAT	23,36 c	1,51 b	0,01 c	4,88 a	0,69 a
Teste F					
Inoculante (I)	0,28 ns	0,09 ns	0,84 ns	0,62 ns	0,30 ns
Nitrogênio (N)	21,05 **	64,76 **	53,63 **	138,88 **	429,13 **
Época (E)	37,06 **	17,17 **	111,51 **	15,77 **	86,15**
IxN	0,05 ns	0,54 ns	10,00 ns	0,80 ns	0,61 ns
IxE	0,77 ns	1,18 ns	0,63 ns	0,07 ns	0,47 ns
NxE	3,90 *	8,40 **	14,27 **	13,94 **	70,36 **
IxNxE	0,03 ns	0,07 ns	0,45 ns	0,14 ns	0,49 ns
CV(%)	15,41	22,26	27,17	55,89	29,75

Médias seguidas pela mesma letra, em colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade; * e ** significativo a 5 e 1%, respectivamente; ns: não significativo. DAT: dias após o transplantio. CV: coeficiente de variação.

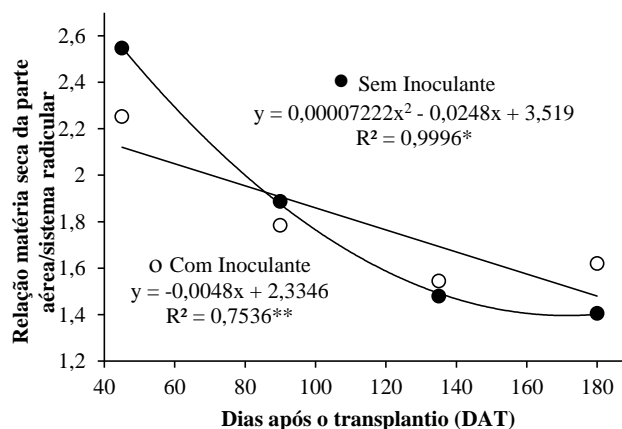


Figura 5. Relação entre produção de matéria seca na parte aérea pelo sistema radicular (RPASR), com e sem inoculação, em função do tempo.

A taxa de crescimento relativo (TCR) apresentou maiores valores na fase inicial e foi reduzindo até estabilizar, dos 135 DAT em diante, tanto para tratamento com ou sem aplicação de N (Figura 6). Este comportamento é atribuído ao aumento da competição intraespecífica por fatores responsáveis pelo crescimento, como: nutrientes, luz e difusão do CO₂ dentro do *stand* (GAVA et al, 2001; AQUINO; MEDINA, 2014).

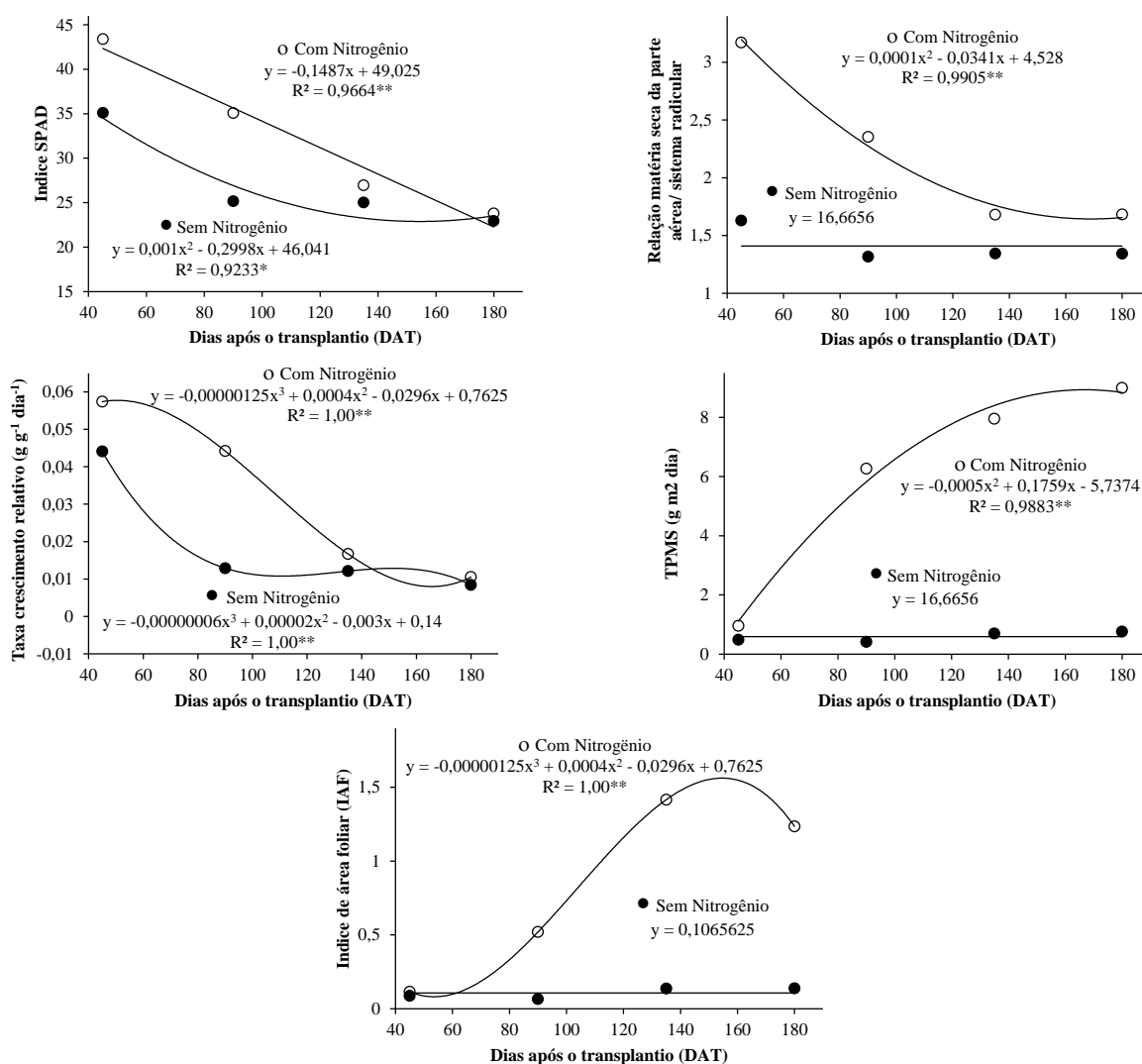


Figura 6. Índice SPAD, relação da parte aérea pelo sistema radicular, taxa de crescimento relativo, taxa de produção de matéria seca (TPMS) e índice de área foliar, com e sem nitrogênio, na dose de 50 kg ha⁻¹, em função do tempo.

A taxa de produção de matéria seca (TPMS) não apresentou crescimento para tratamentos não adubados, mas apresentou um crescimento exponencial para os tratamentos adubados (Figura 6). Gava et al. (2001) observaram um comportamento semelhante na TPMS, em que o aumento dos valores foi mais intenso até os 135 dias e, após esse período, houve um decréscimo. Neste estudo, este comportamento de decréscimo da TPMS não foi visível por ter durado apenas 180 dias. Os valores médios observados no presente estudo ($3,31 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) também foram bem menores em relação aos $11,0 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ observados por Gava et al. (2001), por se tratar de um experimento em vasos enquanto o dos autores mencionados foi um experimento a campo com maior volume de plantas por área.

Existem indícios na literatura de que a inoculação com bactérias diazotróficas pode favorecer, em alguns casos, o acúmulo e concentração de nutrientes nas plantas pela fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfatos e Zn, efeito sobre o crescimento radicular possibilitando captar mais nutrientes, ou até pela síntese de sideróforos capazes reduzir o Fe^{3+} (MUÑOZ-ROJAS; CABALLERO-MELLADO, 2003; SARAVANAN et al., 2007; ESTRADA; 2013; LIN et al., 2012). Porém, no presente estudo, o inoculante não promoveu qualquer efeito sobre os teores de N, P, K, Ca e Mg, enquanto a aplicação de N promoveu efeito sobre o N nas raízes, na parte aérea e Ca e Mg apenas na parte aérea (Tabela 11).

Vale et al. (2011) realizaram um estudo de omissão de nutrientes sobre os teores de nutrientes em cana-de-açúcar em solução nutritiva. Os autores verificaram que, ao utilizarem a solução completa (todos nutrientes), os teores de N nas raízes e parte aérea foram de $10,5$ e $22,9 \text{ g kg}^{-1}$, respectivamente. Quando o N foi omitido da solução, os teores constatados na raiz e parte aérea foram de $8,1$ e $6,8 \text{ g kg}^{-1}$, respectivamente. Tendo estes valores como parâmetros, verificou-se, no presente estudo (Figura 7), que as plantas apresentaram, inicialmente, teores de N próximos aos encontrados pelos autores nas raízes e parte aérea, além de estar na faixa de teores adequado, de $18-25 \text{ g kg}^{-1}$, estabelecido por Raij et al. (1997). Entretanto, com o crescimento da planta ao longo do tempo, provavelmente o N absorvido foi diluído, chegando a valores de teores de N inferiores aos mencionados por Vale et al (2011) e da faixa considerada adequada (Figura 7).

Tabela 11. Teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) nas raízes (R) e parte aérea (PA) de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em vasos até os 180 DAT.

Fatores	N-R	N-PA	P-R	P-PA	K-R	K-PA	Ca-R	Ca-PA	Mg-R	Mg-PA
	(g kg ⁻¹)									
Sem inoculante	4,53	9,13	0,60	2,06	1,72	16,07	2,24	3,10	0,86	1,81
Com lioculante	4,43	8,81	0,57	1,95	1,66	15,19	2,32	3,04	0,88	1,86
0 kg ha ⁻¹ de N	3,73 b	7,00 b	0,56	2,08	1,52	15,41	2,36	2,91 b	0,85	1,71 b
50 kg ha ⁻¹ de N	5,23 a	10,94 a	0,62	1,94	1,86	15,85	2,20	3,24 a	0,90	1,96 a
45 DAT	7,11 a	16,32 a	0,78 a	3,42 a	0,86 b	19,13 a	2,78 a	3,59 ab	1,24 a	2,63 a
90 DAT	4,76 b	8,84 b	0,53 b	2,18 b	1,18 b	15,09 b	2,58 ab	3,11 b	0,89 b	1,96 b
135 DAT	3,26 c	6,40 c	0,55 b	1,46 c	1,58 b	16,31 b	2,29 b	3,75 a	0,78 b	1,74 b
180 DAT	2,79 c	4,33 d	0,49 b	0,98 d	3,13 a	11,99 c	1,47 c	1,85 c	0,58 c	1,01 c
Teste F										
Inoculante (I)	0,19 ns	0,93 ns	0,81 ns	1,97 ns	0,04 ns	3,29 ns	1,13 ns	0,14 ns	0,22 ns	0,74 ns
Nitrogênio (N)	46,77 **	142,12 **	3,07 ns	3,11 ns	1,44 ns	0,81 ns	3,64 ns	4,54 *	1,43 ns	14,04 **
Época (E)	78,13 **	250,14 **	14,92 **	181,69 **	13,02 **	37,01 **	48,66 **	30,30 **	40,45 **	101,18 **
IxN	0,12 ns	1,14 ns	0,17 ns	0,27 ns	0,95 ns	0,09 ns	1,57 ns	1,21 ns	0,06 ns	1,21 ns
IxE	0,67 ns	1,65 ns	0,75 ns	0,67 ns	0,82 ns	0,84 ns	0,84 ns	1,26 ns	0,99 ns	1,45 ns
NxE	21,09 **	64,76 **	0,09 ns	4,60 **	2,36 ns	5,86 **	1,41 ns	2,41 ns	0,63 ns	1,75 ns
IxNx E	0,84 ns	1,71 ns	1,92 ns	0,59 ns	3,80 *	1,40 ns	1,53 ns	0,30 ns	1,79 ns	2,22 ns
CV(%)	19,63	14,76	22,61	15,66	66,06	12,45	14,51	20,33	19,80	14,52

Médias seguidas pela mesma letra, em colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade; * e ** significativo a 5 e 1%, respectivamente; ns: não significativo. DAT: dias após o transplante. CV: coeficiente de variação.

Assim como o índice SPAD, redução do IAF e a RPASR (Tabela 10), os teores de N evidenciaram que houve carência de N mesmo nos tratamentos que receberam aplicação do adubo nitrogenado. A quantidade aplicada parece ter sido suficiente apenas na fase inicial. Durante o período de condução do experimento houve um regime intenso de chuva, o que também pode ter ocasionado perdas do fertilizante aplicado.

Além disso, os teores baixos de N em tratamentos inoculados dão evidências de que o crescimento observado nas plantas se deu mais em função dos efeitos fisiológicos das bactérias do que de fixação biológica de nitrogênio. Caso tenha ocorrido, a FBN parece não ter sido suficiente para suprir as necessidades da planta (Tabela 11).

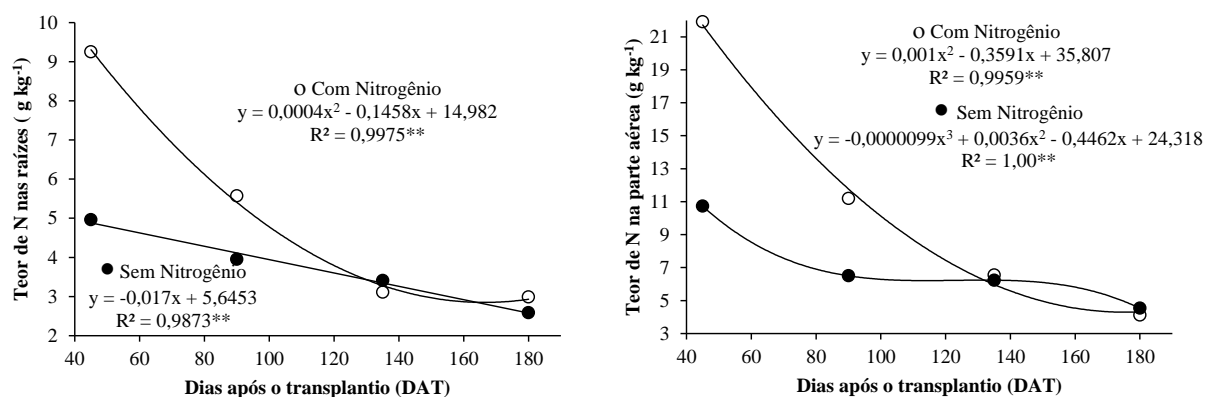


Figura 7. Teor de nitrogênio nas raízes e na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, com e sem nitrogênio, na dose de 50 kg ha⁻¹, em função do tempo.

O Ca e o Mg apresentaram teores considerados adequados na parte aérea das plantas e, possivelmente, o efeito da adubação com N promoveu maior concentração de Ca e Mg devido ao aumento do volume das raízes, possibilitando maior captação. Além disso, o Ca está diretamente relacionado ao crescimento do sistema radicular.

Os teores de P e K não apresentaram resposta à inoculação nem à adubação, mas seus teores na parte aérea das plantas estavam nas faixas consideradas adequadas (RAIJ et al., 1997).

Na Tabela 12 estão apresentados os valores do acúmulo de nutrientes no sistema radicular e na parte aérea em função da inoculação e da aplicação de N. Não foi observado efeito do inoculante sobre o acúmulo de nutrientes na parte aérea e no sistema radicular, no entanto a aplicação de N foi altamente significativa para ambas as partes da planta, assim como observado por Franco et al. (2007) em cana-planta (Tabela 12).

Franco et al. (2007) sugeriram que o nitrogênio promove maior acúmulo de matéria seca por favorecer uma maior superfície específica e, conseqüentemente, ao explorar um maior volume de solo, as raízes absorvem mais água e nutrientes. A partir dos dados da Tabela 9 é possível confirmar esta observação, pois os valores de matéria seca das raízes e comprimento radicular foram cerca de sete vezes (700%) superiores às médias dos tratamentos sem N. Isto explica o maior acúmulo de todos os nutrientes analisados quando aplicado fertilizante nitrogenado (Tabela 12). Os maiores acúmulos de nutrientes ocorreram na parte aérea em relação ao sistema radicular, também devido ao maior acúmulo de matéria seca. O nitrogênio promoveu maior acúmulo de nutrientes, independente da inoculação, nas seguintes ordens decrescentes de grandeza: $K > N > Ca > Mg > P$ na parte aérea e $N > K > Ca > Mg > P$ nas raízes (Tabela 12).

A adubação com N em relação à testemunha promoveu ganhos no acúmulo, na parte aérea e sistema radicular, de N, P, K, Ca e Mg de aproximadamente dez e sete vezes, respectivamente (Tabela 12). De acordo com Franco et al. (2007) o nitrogênio apresenta efeito sinérgico no acúmulo dos demais nutrientes, principalmente nas raízes. O maior acúmulo de nutrientes, principalmente o N, pode ser explicado pelo fato de que, por volta de 170 dias de ciclo, a planta passa a mobilizar os nutrientes da parte aérea para o sistema radicular, estimulando a emissão de novas raízes e aumentando o volume de solo explorado (GAVA, 1999).

Tabela 12. Acúmulo de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) nas raízes (R) e parte aérea (PA) de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em vasos até os 180 DAT.

Fatores	N-R	N-PA	P-R	P-PA	K-R	K-PA	Ca-R	Ca-PA	Mg-R	Mg-PA
	----- (g vaso ⁻¹) -----									
Sem inoculante	0,101	0,316	0,017	0,064	0,074	0,683	0,055	0,143	0,022	0,077
Com inoculante	0,111	0,378	0,017	0,069	0,088	0,774	0,065	0,168	0,023	0,086
0 kg ha ⁻¹ de N	0,025 b	0,060 b	0,004 b	0,017 b	0,014 b	0,149 b	0,016 b	0,026 b	0,006 b	0,015 b
50 kg ha ⁻¹ de N	0,187 a	0,633 a	0,029 a	0,117 a	0,147 a	1,309 a	0,104 a	0,285 a	0,039 a	0,148 a
45 DAT	0,021 c	0,128 b	0,002 d	0,023 b	0,002 c	0,136 c	0,009 c	0,025 c	0,004 d	0,019 c
90 DAT	0,087 b	0,378 a	0,009 c	0,074 a	0,023 bc	0,555 b	0,041 b	0,122 b	0,016 c	0,078 b
135 DAT	0,128 b	0,438 a	0,023 b	0,087 a	0,077 b	1,058 a	0,092 a	0,246 a	0,031 b	0,122 a
180 DAT	0,189 a	0,444 a	0,033 a	0,085 a	0,22 a	1,167 a	0,097 a	0,229 a	0,04 a	0,108 ab
Teste F										
Inoculante (I)	0,66 ns	3,63 ns	0,29 ns	1,09 ns	0,74 ns	2,96 ns	2,98 ns	1,75 ns	0,77 ns	1,03 ns
Nitrogênio (N)	178,19 **	310,87 **	272,64 **	499,60 **	68,22 **	484,64 **	234,28 **	184,87 **	274,98 **	245,79 **
Época (E)	33,69 **	20,97 **	76,34 **	43,32 **	37,15 **	81,75 **	54,79 **	29,12 **	62,6 **	28,82 **
IxN	0,62 ns	3,46 ns	1,22 ns	1,03 ns	2,01 ns	3,39 ns	3,50 ns	2,00 ns	1,30 ns	0,65 ns
IxE	0,60 ns	0,98 ns	0,03 ns	2,40 ns	0,74 ns	2,28 ns	0,61 ns	0,43 ns	0,08 ns	1,30 ns
NxE	25,39 **	17,34 **	56,00 **	35,09 **	25,95 **	58,39 **	41,22 **	23,28 **	49,05 **	23,99 **
IxNxE	1,14 ns	1,09 ns	0,79 ns	2,54 ns	2,24 ns	2,63 ns	0,94 ns	0,47 ns	0,74 ns	1,38 ns
CV(%)	45,68	37,49	37,01	26,66	79,47	28,92	38,20	48,92	36,00	41,82

Médias seguidas pela mesma letra, em colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade; * e ** significativo a 5 e 1%, respectivamente; ns: não significativo. DAT: dias após o transplante. CV: coeficiente de variação.

Este comportamento seria um reflexo fisiológico da maturação, pois, desta forma, a planta passa a aumentar sua reserva de nutrientes nas raízes para seu desenvolvimento no próximo ciclo (GAVA, 1999; VITTI et al., 2011).

Apesar do acúmulo de matéria seca total dos tratamentos inoculados serem superiores à matéria seca total dos não inoculados (Tabela 9), isto não refletiu de forma estatística em maior acúmulo total de nutrientes, mesmo aparentando ser ligeiramente superior (Figura 8).

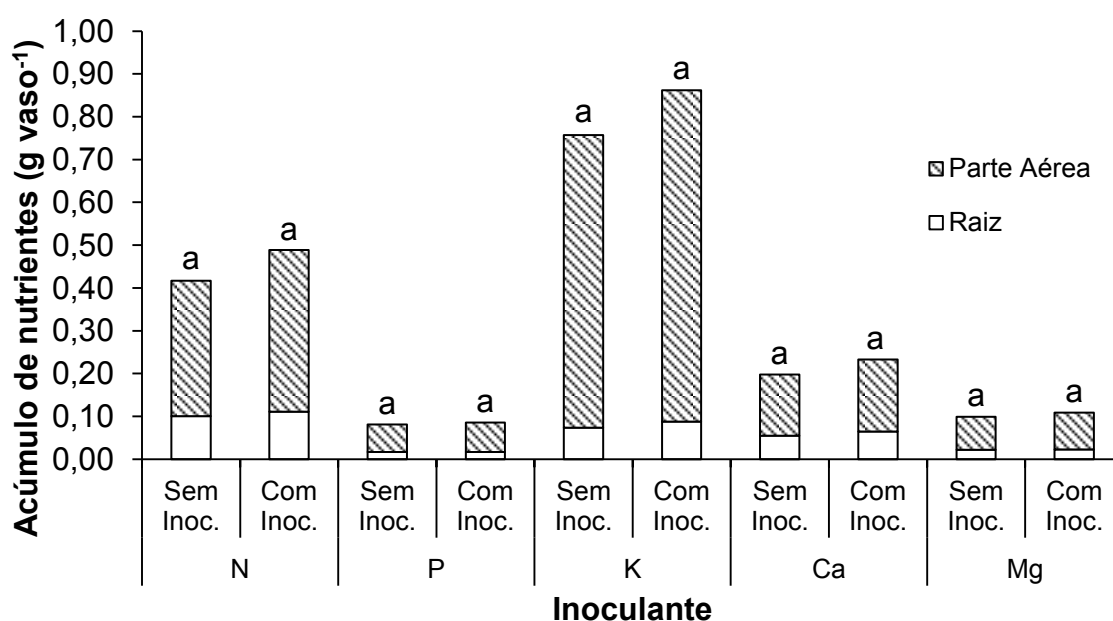


Figura 8. Acúmulo de nutrientes nas raízes, parte aérea e planta toda, em plantas de cana-de-açúcar cultivadas em vasos até os 180 dias após o transplante, em relação à aplicação de inoculante. Letras diferentes indicam diferença significativa do acúmulo total de nutrientes pelo teste Tukey a 5%.

Já para o acúmulo total em função das doses de N, é possível observar a grande diferença que o N promoveu em relação aos tratamentos não adubados, concordando novamente com a afirmação de Franco et al. (2007) quanto ao sinergismo do N no acúmulo de nutrientes (Figura 9).

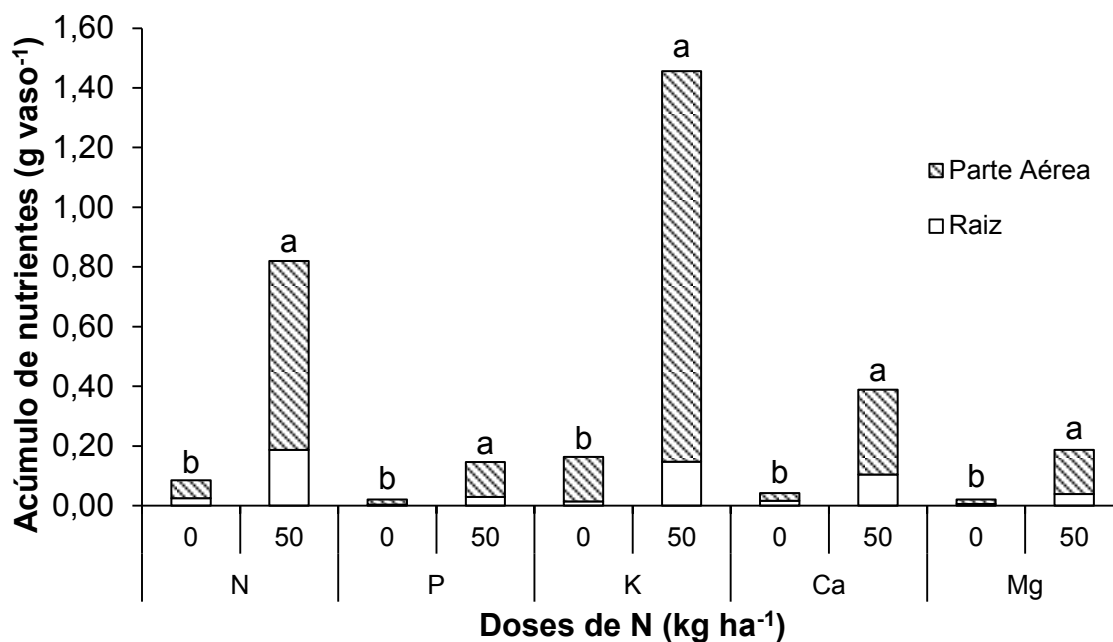


Figura 9. Acúmulo de nutrientes nas raízes, parte aérea e planta toda, em plantas de cana-de-açúcar cultivadas em vasos até os 180 dias após o transplante, em relação às doses de nitrogênio. Letras diferentes indicam diferença significativa do acúmulo total de nutrientes pelo teste Tukey a 5%.

Os acúmulos de N nas raízes apresentaram um ligeiro aumento dos 135 para os 180 DAT, enquanto a parte aérea apresentou uma redução (Tabela 13). Possivelmente tenha ocorrido uma mobilização de N da parte aérea para as raízes com a finalidade de aumentar suas reservas (GAVA, 1999; VITTI et al., 2011). Foi possível observar que as médias dos tratamentos com inoculante foram 36% superiores às médias dos tratamentos apenas com adubo nitrogenado. Isso seria um reflexo do maior acúmulo de biomassa pelos tratamentos inoculados (Tabela 9) e da média do teor de N na parte aérea, por ser superior ao do não inoculado (Tabela 13).

O NPPF (g vaso⁻¹) no sistema radicular não sofreu influência da inoculação e nem da época avaliada. Na parte aérea, o inoculante promoveu aumento de 33% do NPPF em relação ao não uso do inoculante (Tabela 13). Provavelmente isto tenha ocorrido pelas alterações que as bactérias podem causar no sistema radicular (GOSAL et al., 2012), pois, apesar da massa do sistema radicular não ter sido alterada pela inoculação, o comprimento radicular foi (Tabela 9). Isto propicia à planta maior capacidade de interceptação de água e nutrientes.

Tabela 13. Nitrogênio total acumulado, nitrogênio na planta proveniente do fertilizante (NPPF) e eficiência da utilização do fertilizante nitrogenado (Eufn) nas raízes, parte aérea e na planta toda de cana-de-açúcar cultivada em vasos, nos tratamentos com uso de fertilizante nitrogenado (^{15}N), aos 135 e 180 dias após o transplântio (DAT).

Tratamentos	Raiz			Parte Aérea		
	135 DAT	180 DAT	Médias	135 DAT	180 DAT	Médias
	Teor de N (g kg^{-1})					
50 kg N	4,08	2,98	3,53	6,30	4,00	5,15 b
INOC + 50 kg N	4,13	3,00	3,56	7,55	4,43	5,99 a
	N Acumulado (g vaso^{-1})					
50 kg N	0,2858	0,3348	0,3103	0,7190	0,7033	0,7111 b
INOC + 50 kg N	0,3070	0,3525	0,3298	1,0105	0,9300	0,9703 a
	NPPF (g vaso^{-1})					
50 kg N	0,2264	0,2388	0,2326	0,6094	0,4781	0,5438 b
INOC + 50 kg N	0,2385	0,2607	0,2496	0,7972	0,6532	0,7252 a
	NPPF(%)					
50 kg N	79,21	71,33	75,00	84,76 aA	67,98 aB	76,47
INOC + 50 kg N	77,69	73,96	75,68	78,89 bA	70,24 aB	74,74
	Eufn (%)					
50 kg N	4,53	4,78	4,65	12,19	9,56	10,88 b
INOC + 50 kg N	4,77	5,21	4,99	15,95	13,06	14,50 a
	Eufn Planta Toda (%)					
	135 DAT	180 DAT	Médias			
50 kg N	16,72	14,34	15,53			
INOC + 50 kg N	20,72	18,28	19,50			

Médias seguidas de letras distintas minúsculas em colunas e maiúsculas nas linhas (comparando épocas) diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. INOC: inoculante.

Na Tabela 13 são observados os valores de N acumulado na planta, nitrogênio proveniente do fertilizante (NPPF) e eficiência da utilização do fertilizante nitrogênio (Eufn) no sistema radicular e parte aérea para os tratamentos com aplicação de nitrogênio (com e sem inoculação) aos 135 e 180 DAT.

Em relação à NPPF (%), verificou-se de forma não significativa uma redução dos 135 para os 180 DAT e de forma significativa à parte aérea. Esta redução pode estar relacionada a perdas gasosas do N pela parte aérea da planta (FRANCO et al. 2008). O restante do N presente na planta (cerca de 25%) pode ter vindo de fontes como a M.O. do solo (mesmo sendo baixa), chuvas, além da própria fixação biológica de N.

A parte aérea teve melhor Eufn em relação às raízes. O inoculante não aumentou a Eufn nas raízes, mas ela foi significativa na parte aérea fazendo com que apresentasse valores 33% superiores ao tratamento não inoculado na parte aérea (Tabela 13). A Eufn na planta toda evidenciou as possíveis perdas de N das folhas devido à redução entre o período de 135 a 180 DAT.

De um modo geral, verificou-se que o aumento dos valores de Eufn (Tabela 13) atribuídos à inoculação foram maiores devido ao maior volume de raízes formado (Tabela 9), que permitiu uma captação mais eficiente do fertilizante aplicado.

5. CONCLUSÕES

1. Na formação de mudas pré-brotadas (MPB) da variedade RB867515, a inoculação resultou em aumento na velocidade de brotação e no acúmulo de matéria seca das raízes e parte aérea, independente da quantidade de reserva da gema.
2. A inoculação associada ao nitrogênio, em solo de baixa fertilidade, promoveu ganhos no crescimento inicial da parte aérea (até os 180 DAT), aumentando o perfilhamento, altura, diâmetro e produção de matéria seca de colmos, palha e total das mudas.
3. A utilização do inoculante não resultou em incrementos na matéria seca de raízes, porém promoveu aumento no comprimento radicular.
4. O inoculante não promoveu maior acúmulo de nutrientes e nem aumento nos teores de N. O nitrogênio promoveu maior acúmulo de nutrientes e, inicialmente, promoveu maiores teores de N que foram reduzidos ao longo de tempo.
5. O inoculante favoreceu a eficiência da utilização do fertilizante nitrogenado na parte aérea da planta.
6. Os resultados demonstraram que o inoculante apresentou efeito promotor de crescimento em plantas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROSANO, E. J. TRIVELIN, P.C.O.; CANTARELLA, H.; AMBROSANO, G.M.B; SCHAMMASS, E.A.; GUIRADO, N.; ROSSI, F.; MENDES, P.C.D.; MURAOKA, T. Utilization of nitrogen from green manure and mineral fertilizer by sugarcane. **Sciencia Agrícola**, v.62, n 6, p. 534-542, 2005.

AQUINO, G.S.; MEDINA, C.C. Produtividade e índices biométricos e fisiológicos de cana-de-açúcar cultivada sob diferentes quantidades de palhada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.49, n.3, p173-180, 2014.

ARNOLD, S.L.; SCHEPERS, J.S. A simple roller-mill grinding procedure for plant and soil samples. **Communication in soil Science and Plant Analysis**, v.35, p.537-545, 2004.

AZEREDO, D.F.; BOLSANELLO, J.; WEBWE, H.; VIEIRA, J.R. Nitrogênio em cana-planta doses e fracionamento. **STAB Açúcar e Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.4, n.5, p.25-29, 1986.

BALDANI, V.L. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. No processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. 1996. 234 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1996.

BARBOSA, J.C.; MALDONADO JR., W. AgroEstat - Sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos. Versão 1.1.0.701, 2011.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2003.

BEVIVINO, A.; SARROCCO, S.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CANTALE, C.; CHIARINI, L. Characterization of a free-living maizerhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. **FEMS Microbiology Ecology**, v.27, p.225–237, 1998.

BHATTACHARJEE, R.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S.N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Application of Microbiology na Biotechnology**, v.80, p-199-209, 2008.

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

BIGGS, I.M.; WILSON, J.R.; KEATING, B.A.; CRITCHLEY, C. Does biological N₂-fixation contribute to nitrogen requirements in Australian sugarcane. *Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists*, v.22, p.133-138, 2000.

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

BODEY, R.M.; URQUIAGA, S.; REIS, V.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. **Plant and Soil**, n.137, p.111-117, 1991.

BOLOGNA-CAMPBELL, I. **Balço de nitrogênio e enxofre no sistema solo-cana-de-açúcar no ciclo de cana-planta**. 2007. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Plano setorial de mitigação e de adaptação às mudanças climáticas para a consolidação de uma economia de baixa emissão de carbono na agricultura**. Brasília, DF, 2012, 173p.

CABALLERO-MELLADO, J.; FUENTES-RAMÍREZ, L.E.; REIS, V.M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.3008-3013, 1995.

CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P.C.O. Determinação de nitrogênio inorgânico em solo pelo método da destilação a vapor. In: RAIJ, B.; ANDRANDE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. (Ed.). **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Fundação IAC, 2001. cap. 10, p. 270-276.

CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P.C.O.; VITTI, A.C. Nitrogênio e enxofre na cultura da cana-de-açúcar. In: YAMADA, T.; ABDALL, A S.R.S.; VITTI, G.C. **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute, 2007, p. 355-412.

CARNEIRO, A.E.V.; TRIVELIN, P.C.O.; VICTORIA, R.L. Utilização da reserva orgânica e de nitrogênio do tolete de plantio (colmo-semente) no desenvolvimento da cana-planta. **Scientia Agricola**, v.52, n.2, p.199-209, 1995.

CASAGRANDE, A.A. **Tópicos de morfologia e fisiologia da cana -de-açúcar**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. 157p.

CHANWAY, C.P.; ANAND, R.; YANG, H. Nitrogen fixation outside and inside plant tissues. In: OHYAMA, T. (Ed.). **Advances in biology and ecology of nitrogen fixation**, InTech, 2014. cap.1, p.3-21.

CHAPOLA, R.G.; CRUZ, J.A.; NUNES, I.K.; FERNANDES JÚNIOR, A.R. Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético. **Censo varietal 2012**. Araras, SP, 2012, 55p.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2014/2015, primeiro levantamento**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_04_15_15_44_37_boletim_cana_portugues_-_1o_lev_-_14.pdf. Acesso em: 20 mai. 2014.

COSTA, K.A.P.; FAQUIN, V.; OLIVEIRA, I.P.; RODRIGUES, C.; SEVERINO, E.C. Doses e fontes de nitrogênio em pastagem de campim-marandu. I – Alterações nas características químicas do solo. **Revista Brasileira de Ciência de Solo**, v. 32, p.1591-1599, 2008.

DALTON, D.A.; KRAMER, S. Nitrogen-fixing bacteria in non-legumes. In: GNANAMANICKAM, S. (Ed.). **Plant-associated bacteria**. Netherlands: Springer, 2006. cap.3, p.131-154.

DANTAS NETO, J.; FIGUEREDO, J.L.C.; FARIAS, C.H.A.; AZEVEDO, C.A.V. Resposta de cana-de-açúcar, primeira soca, a níveis de irrigação e adubação de cobertura. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.10, n.2, p. 283-288, 2006.

DILLEWIJN, V.C. **Botany of sugarcane**. Waltham: The Chronica Botanica, 1952. 371p.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. ; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bacterias diazotroficas de plantas nao-leguminosas. Brasília: Embrapa-SPI,1995. 60p.

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

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 10 mai 2014.

FIGUEIREDO, P. Breve história da cana-de-açúcar e do papel do Instituto Agrônomo no seu estabelecimento no Brasil. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**, Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. cap.1, p.29-44.

FRANCO, H.C.J.; BOLOGNA, I.R.; FARONI, C.E.; VITTI, A.C.; TRIVELIN, P.C.O. Acúmulo de macronutrientes em cana-de-açúcar em função da adubação nitrogenada e dos resíduos culturais incorporados ao solo no plantio. **Bragantia**, v.66, n4., p.669-674, 2007.

FRANCO, H.C.J.; TRIVELIN, P.C.O.; FARONI, C.E.; VITTI, A.C.; OTTO, R. Aproveitamento pela cana-de-açúcar da adubação nitrogenada de plantio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. especial, 2008.

FUENTES-RAMIREZ, L.E.; CABALLERO-MELLADO, J.; SEPULVEDA, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. **Microbiology Ecology**, n.29, p.117-128, 1999.

GALAZZINI, J.L. APTA de Jaú desenvolve projeto inovador com cana-de-açúcar. **Jaú Mais**, 17 out. 2013. Disponível em: <<http://www.jaumais.com.br/?pg=not%EDcia&id=8271>> . Acesso em: 20 out. 2013.

GAVA, G.J.; TRIVELIN, P.C.O; OLIVEIRA, M.W.; PENATTI, C.P. Crescimento e acúmulo de nitrogênio em cana-de-açúcar cultivada em solo coberto com palhada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.11, p.1347-1354, 2001.

GAVA, G.J.C. **Utilização do nitrogênio da uréia (15N) e da palhada (15N) por soqueira de cana-de-açúcar no manejo sem despalha a fogo**. 1999. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

GLICK, B.R.; PENROSE, D.M; MA, W. Bacterial promotion of plant growth. **Biotechnology Advances**, n.19, p.135-138, 2001.

GOMES, C. IAC desenvolve sistema inédito que muda o conceito de plantar. **IAC Notícias**, 10 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/noticiasdetalhes.php?id=836>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

GOSAL, S.K.; KALIA, A.; UPPAL, S.K.; KUMAR, R.; WALIA, S.S.; SINGH, K.; SINGH, H. Assessing the benefits of *Azobacter* bacterization in sugarcane: a field appraisal. **Sugar Tech**, v.14, n.1, p.61-67, 2012.

GUTIERREZ-MANERO, F.J.; RAMOS-SOLANO, B.; PROBANZA, A.; MEHOUACHI, J.; TADEO, F.R.; TALON, M. The plant-growthpromoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiology Plant**, v.111, p.206–211, 2001.

HARI, K.; SRINIVASAN, T.R. Response os sugarcane varieties to application of nitrogen fixing bacteria under different nitrogen levels. **Sugar Tech**, v.7, n.2, p. 28-31, 2005.

HAWKESFORD, M.; HORST, W.; KICHEY, T.; LAMBERS, H. SCHJOERRING, J.; SKRUMSAGER, M.; WHITE, P. Functions of macronutrients. In: MARSCHNER, P. (Ed.). **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. Australia: The University of Adelaide, Elsevier, 2012. p. 135-188.

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

JAIN, R.; SOLOMON, S.; SHRIVASTAVA, A.K.; CHANDRA, A. Sugarcane bud chips: a promising seed material. **Sugar Tech**, v. 12, p. 67-69, 2010.

JORGE, L. A. C.; SILVA, D. J. C. B.; RODRIGUES, A. F. O. SAFIRA – Software para a análise de fibras e raízes. Versão 1.1. Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2010.

KORNDÖRFER, G.H.; MARTINS, M. Importância da adubação na qualidade da cana-de-açúcar. **STAB**, v.10, n.3, p.26-31, 1992.

LANDELL, M.G; CAMPANA, M.P.; FIGUEIREDO, P. XAVIER, M.A.; ANJOS, I.A.; DINARDO-MIRANDA, L.L.; SCARPARI, M.S.; GARCIA, J.C.; BIDÓIA, M.A.P.; SILVA, D.N.; MENDONÇA, J.R.; KANTHACK, R.A.D.; CAMPOS, M.F.; BRANCALIÃO, S.R.; PETRI, R.H.; MIGUEL P.E.M. **Sistema de multiplicação de de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas**. Ribeirão Preto: Instituto Agrônomo de Campinas, 2012. 17 p. (Documentos IAC, 109).

LEE, T.S.G.; BRESSAN, E.A. Clean cane with nitrogen fixing bacteria. **Sugar Tech**, v.7, n.1, 2005.

LEITE, G.H.P.; CRUSCIOL, C.A.C. Reguladores vegetais no desenvolvimento e produtividade da cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.8, p.995-1001, 2008.

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

LOGANANDHAN, N.; GUJJA, B.;GOUD, V.;NATARAJAN, U.S. Sustainable sugarcane initiative (SSI): a methodology of 'more with less'. **Sugar Tech**, v.15, p.98-102, 2013.

LUCCHESI, A. A. Utilização prática da análise de crescimento vegetal. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 41, p. 181-201, 1984

LYNCH, J.; MARSCHNER, P.; RENGEL, Z. Effect of internal and external factors on root growth and development. In: MARSCHNER, P. (Ed.). **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. Australia: The University of Adelaide, Elsevier, 2012. cap.13, p.135-188.

MAGALHÃES, A. C. N. Análise quantitativa do crescimento. In: FERRI, M. G. (Coord.). *Fisiologia vegetal 1*. São Paulo: EPU. Ed. Da Universidade de São Paulo, 1979. v.1, cap. 8, p.331-350.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.1, p.176-177. 1962.

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

MARAFON, A.C. Análise quantitativa de crescimento em cana-de-açúcar: um introdução ao procedimento prático. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012. 29 p. (Documentos Embrapa, 168).

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

MIRZA, M.S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K.A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. **Plant Soil**, v.237, p.47–54, 2001.

MUCHOVEJ, R.M.; NEWMAN, P.R. Nitrogen fertilization of sugarcane on a Sandy soil: II. Soil and groundwater analyses. **Journal American Society Sugar Cane Technologists**, v.24, 2004.

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

MUTHUKUMARASAMY, R.; GOVINDARAJAN, M.; VADIVELU, M.; REVATHI, G. N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspiillum* sp. in micropropagated sugarcane plants. **Microbiological Research**, n. 161, p.238-245, 2006.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Hesbaspirillum* spp. From Indian sugar cane varieties. **Biology and Fertility of Soil**, v.29, p.157-164, 1999.

NAVROSKI, M.C.; BIALI, L.J.; BIANCHIN, J.E.; CAMARGO, L.; SCHUMACHER, M.V. Quantificação de biomassa e comprimento de raízes finas em povoamento de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.5, n.4, p.535-540, 2010.

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

OKUMURA, R.S.; MARIANO, D.C.; DALLACORT, R.; ALBUQUERQUE, A.N.; LOBATO, A.K.S.; GUEDES, E.M.S.; OLIVEIRA, C.F. *Azospirillum*: a new and eficiente alternative to biological nitrogen fixation in grasses. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.11, n.1, p.1142-1146, 2013

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

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

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

OLIVEIRA, J.C.M.; REICHARDT, K.; BACCHI, O.S.; TIMM, L.C.; DOURADO-NETO, D.; TRIVELIN, P.C.O.; TOMINAGA, T.T.; NAVARRO, R.C.; PICCOLO, M.C.; CÁSSARO, F.A.M. Nitrogen dynamics in a soil-sugar cane system. **Scientia Agricola**, v.57, n.3, p.467-472, 2000.

OLIVEIRA, R.A.; DAROS, E.; ZAMBON, J.L.C.; WEBER, H.; IDO, O.T.; BESPALHOK-FILHO, J.C.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; SILVA, D.K.T. Área foliar em três cultivares de cana-de-açúcar e sua correlação com a produção de biomassa. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n.1, p. 71-76, 2007.

ORLANDO FILHO, J.; RODELLA, A.A. Adubação nitrogenada em cana-planta: perfilhamento e produtividade agrícola. **STAB**, v.13, n.3, p.16-18, 1995.

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

OTTO, R.; FRANCO, H.C.J.; FARONI, C.E.; VITTI, A.C.; TRIVELIN, P.C.O. Fitomassa de raízes e da parte aérea da cana-de-açúcar relacionada à adubação de nitrogenada de plantio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.4, p.398-405, 2009.

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

PEIXOTO, C. P.; PEIXOTO, M. F. S. P. Dinâmica do crescimento vegetal (Princípios Básicos). Material Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Disponível em: <<http://www.ufrb.edu.br/mapeneo/index.php/downloads/curso-fisiologia-vegetal-minter/analise-de-crescimento/146-dinamica-do-crescimento-vegetal>>. Acesso em: 12 jun. 2013.

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

PROENÇA, E.R.; TARSITANO, A.; BOLONHEZI, A.C.; RAPASSI, R.M.A.; COSTA, S.M.A.L. Inovações tecnológicas adotadas por usinas do setor sucroalcooleiro na regional de Andradina estado de São Paulo. In: CONGRESSO SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA ADMINISTRAÇÃO E SOCIEDADE RURAL, 47., 2009, Porto Alegre. **Anais eletrônicos...** Porto Alegre: SOBER, 2009. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/13/693.pdf>>. Acesso em: 08 jan. 2009.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2.ed. Campinas: Instituto Agronômico, 1997. 255p. (Boletim Técnico, 100).

REIS JÚNIOR, F. B.; REIS V. M.; URQUIAGA S.; DÖBEREINER, J. Influence of nitrogen fertilization on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**, v.210, p.153-159, 2000.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; URQUIAGA, S. Recomendação de uma mistura de estirpes de cinco bactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação de cana de açúcar. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 2009. 4p. (Circular Técnica 30).

REIS, V.M. Aspectos ecológicos e fisiologia da bactéria fixadora de N₂ *Acetobacter diazotrophicus*. 1991. 213 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo) – Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1994.

REIS, V.M.; PEREIRA, W.; HIPÓLITO, G.S. Métodos de aplicação de bactérias diazotróficas em cana-planta para fins de determinação de eficiência agrônômica. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 4 p. (Comunicado Técnico, 118).

RIPOLI, T.C.C.; RIPOLI, M.L.C.; CASAGRANDE, D.V.; IDE, B. Y. Plantio mecanizado: ensaio padrão. (2 ed.). **Plantio de cana-de-açúcar: estado da arte**, Piracicaba: ESALQ-USP, 2006. cap.1, p.1-50.

ROSSETTO, R.; CANTARELLA, H.; DIAS, F.L.F.; VITTI, A.C.; TAVARES, S. Cana-de-açúcar. In: PROCHNOW, L.I.; CASARIN, V.; STIPP, S.R. **Boas práticas para uso eficientes de fertilizantes**. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute, 2010. p. 161-230.

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

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.

SARTORI, R.H. **Eficiência do uso de nitrogênio e enxofre pela cana-de-açúcar (primeira e segunda rebrota) em sistema conservacionista (sem queima)**. 2010. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

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

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

SILVEIRA, J.A.G. Interações entre assimilação de nitrogênio e o crescimento de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) cultivada em condições de campo. 1985. 152p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985.

SIMÕES NETO; MARCOS, Z.Z. Influência da quantidade e localização da reserva nutricional do tolete sobre o desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 4., 1987, Olinda. **Anais...** Olinda: STAB, 1987. p.342-351.

SIMÕES, M.S.; ROCHA, J.V.; LAMPARELLI, R.A.C. Growth indices and productivity in sugarcane. **Scientia Agricola**, v.62, p.23-30, 2005.

SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Nitrogênio. In: Fernandes, M.S. (Org.). **Nutrição mineral de plantas**. 1. ed. Viçosa: SBCS, 2006, v. 1, p.215-252.

TAIZ, L. AND ZEIGER, E. *Plant Physiology*, 5 ed. Sinauer Associates. Sunderland, MA. 2010.

TRIVELIN, C. P. Três casos estudados com uso de traçador ^{15}N . Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo – CENA/USP. Para obtenção do título de Livre Docente. Piracicaba, março 2000, 139p.

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

URQUIAGA, S.;XAVIER, R.P.; MORAIS, R.F.; BATISTA, R.B.;SCHULTZ, N.; LEITE, J.M.; SÁ, J.M.; BARBOSA, K.P.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. Evidence from field nitrogen balance and ^{15}N natural abundance data for the contribution of biological N_2 fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v.356, p.5-21, 2012.

VALE, D.W.; PRADO, R.M.; AVALHÃES, C.C.; HOJO, R.H. Omissão de macronutrientes na nutrição e crescimento da cana-de-açúcar cultivada em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciências Agárias**, v.6, n.2, p.189-196, 2011.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v.255, p. 571-586, 2003.

VITTI, A.C. **Utilização pela cana-de-açúcar (cana planta) do nitrogênio da uréia (^{15}N) e do mineralizado no solo em sistemas de manejo com e sem a queima**. 1998. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicicaba, 1998.

VITTI, A.C.; CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P.C.O.; ROSSETTO, R. Nitrogênio. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**, Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. cap.10, p.239-287.

VITTI, A.C.; FRANCO, H.C.J.; TRIVELIN, P.C.O.; FERREIRA, D.A.; OTTO, R.; FORTES, C.; FARONI, C.E. Nitrogênio proveniente da adubação nitrogenada e de resíduos culturais na nutrição da cana-planta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.3, 287-293, 2011.

APÊNDICES

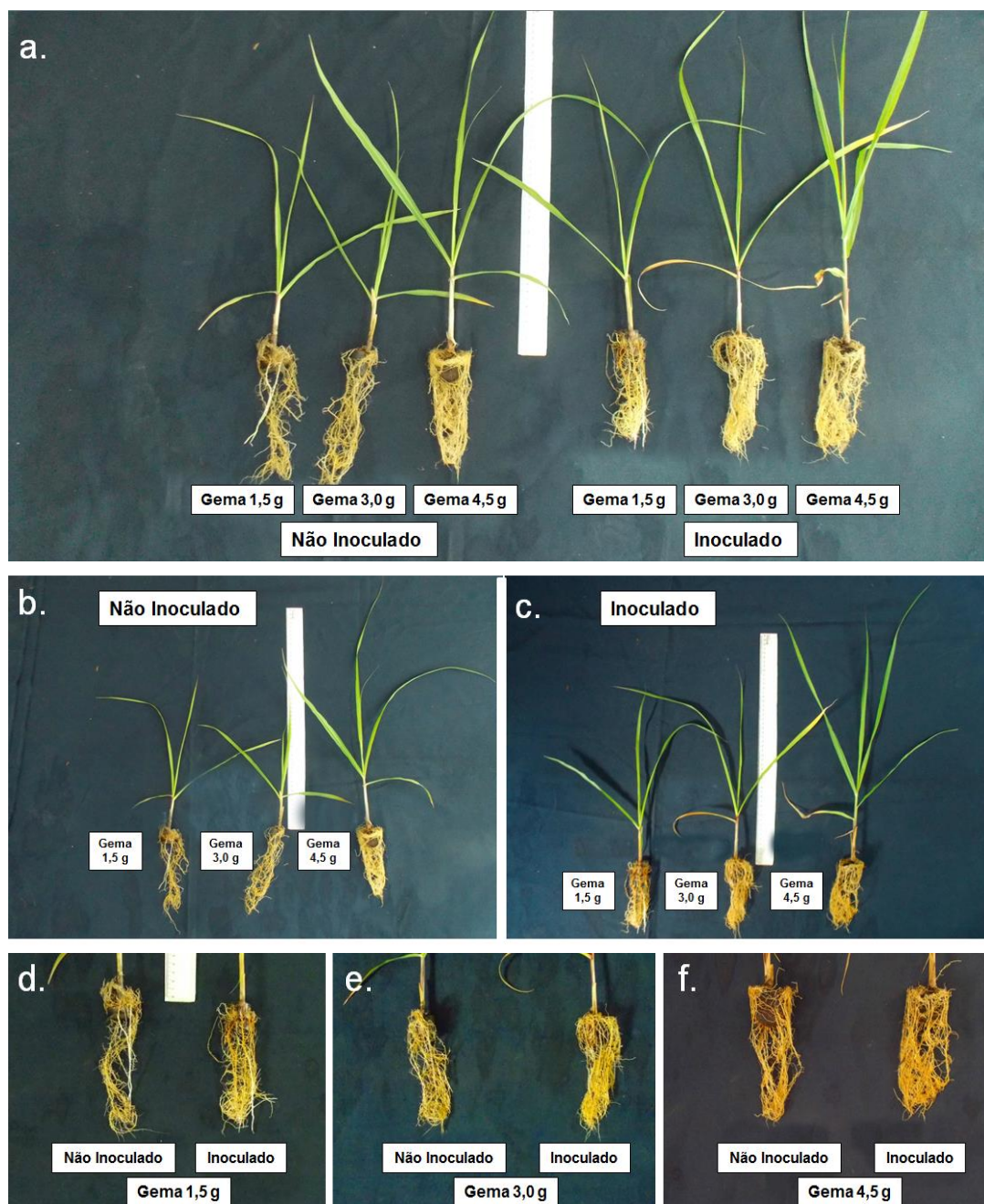


Figura 1. Comparativo entre quantidade de reserva nas gemas dos tratamento sem e com inoculante(a); comparativo entre a quantidade de reserva nas gemas dos tratamentos não inoculados(b) e inoculados (c); comparativo entre tratamentos sem e com inoculante em gemas com 1,5 g (d), 3,0 g (e) e 4,5 g (f).

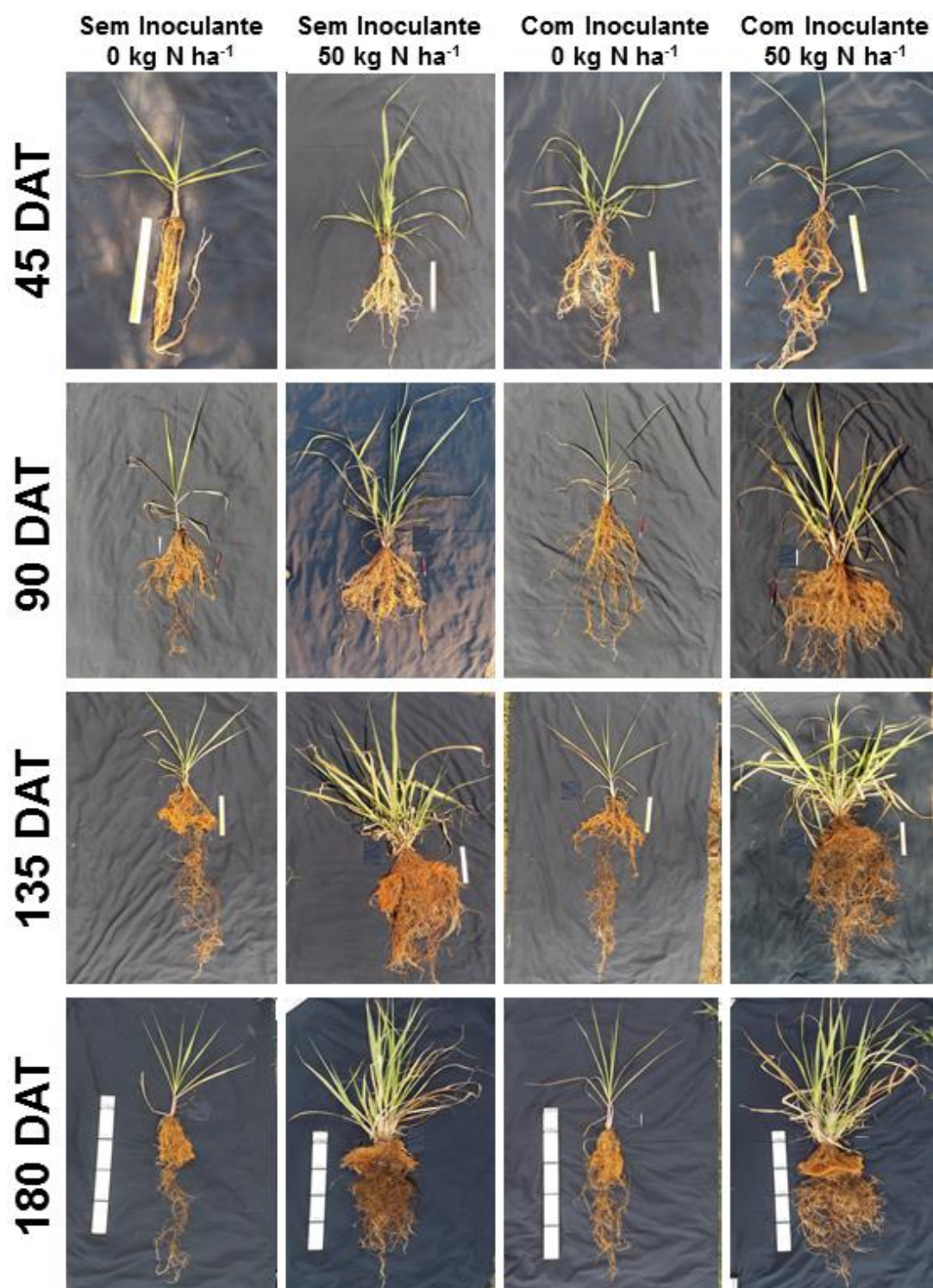


Figura 2. Plantas dos tratamentos sem e com inoculante combinados com as doses de 0 e 50 kg ha⁻¹ de N, após colheitas aos 45, 90, 135 e 180 DAT.