

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**MODOS DE INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* EM CANA-  
DE-AÇÚCAR**

**DANIELE SCUDELETTI**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP – Campus  
de Botucatu, para obtenção do título de Mestre  
em Agronomia (Agricultura)

BOTUCATU – SP  
Julho - 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**MODOS DE INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* EM CANA-DE-  
AÇÚCAR**

**DANIELE SCUDELETTI**

Orientador: Carlos Alexandre Costa Crusciol

Co-orientador: Marcelo de Almeida Silva

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Agricultura).

BOTUCATU – SP  
Julho - 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S436m	<p>Scudeletti, Daniele, 1990-</p> <p>Modos de inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> em cana-de-açúcar / Daniele Scudeletti. - Botucatu : [s.n.], 2016 x, 42 f. : fots. color., grafs., tabs.</p> <p>Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2016 Orientador: Carlos Alexandre Costa Crusciol Coorientador: Marcelo de Almeida Silva Inclui bibliografia</p> <p>1. Cana-de-açúcar - Crescimento (Plantas). 2. Bactérias nitrificantes. 3. Nitrogênio - Fixação. 4. Produtividade agrícola. I. Crusciol, Carlos Alexandre Costa. II. Silva, Marcelo de Almeida. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.</p>
-------	---



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "MODOS DE INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* EM CANA-DE-AÇÚCAR"

AUTORA: DANIELE SCUDELETTI

ORIENTADOR: CARLOS ALEXANDRE COSTA CRUSCIOL

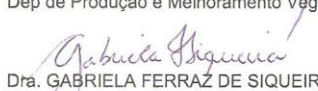
CO-ORIENTADOR: MARCELO DE ALMEIDA SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA (AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. MARCELO DE ALMEIDA SILVA

Dep de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu



Dra. GABRIELA FERRAZ DE SIQUEIRA

Pós-doutoranda - Dep de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu



Dr. EDUARDO NEGRISONI

TECHFIELD ASSESSORIA E CONSULTORIA AGRÍCOLA E AMBIENTAL

Botucatu, 27 de julho de 2016.

*“A vida é fruto da decisão de cada momento. Talvez seja por isso que a ideia de plantio seja tão reveladora sobre a arte de viver. Viver é plantar. É atitude de constante semeadura de deixar cair na terra de nossa existência as mais diversas formas de sementes...”*

**Padre Fábio de Melo**

**DEDICO**

Aos meus queridos e amados pais Maria Leucina de Oliveira Scudeletti e Mauricio Almir  
Scudeletti

## **OFEREÇO**

À minha família e amigos que sempre estiveram ao meu lado e sempre me apoiaram independente das minhas escolhas. Agradeço por acreditar em meu potencial e compreender em momentos de ausência. Agradeço em especial às minhas avós Neide Michelin e Antônia Oliveira, aos meus tios e tias Ignez Michelin, Valdomiro Stefanoni, Maristela Scudeletti, Márcia Maristela Scudeletti, minha madrinha Leudina de Oliveira Castro, meus primos e aos amigos Dante Galbier, Eva Perazzoli, Ivan Perazzoli, Giovan Nascimento, Tamires Moreno Carvalho.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir concluir mais uma etapa de minha formação profissional e pessoal, pela presença em todos os momentos da minha vida e pelas bênçãos alcançadas.

Ao Professor Dr. Carlos Alexandre Costa Crusciol, pela orientação, paciência, dedicação, incentivo, desenvolvimento profissional, pessoal, pela amizade durante o período de pós-graduação e por ser esse “paizão”.

Ao co-orientador Marcelo de Almeida Silva, pela colaboração, apoio e amizade.

Agradeço em especial Marcelo Giroto, Rosilaine Araldi, Adriana Aki Tanaka e Natalia Corniani que sempre me apoiaram e me incentivaram durante a minha graduação e iluminaram meu caminho para que eu não desistisse dos meus sonhos.

Agradeço ao Dorival Arruda e Amanda Bedette que também sempre me apoiaram e me incentivaram a continuar meus estudos.

Agradeço aos amigos de graduação Leonardo Vidotti, Lucas Feresin, Maico Sirqueira, Marcelo Longatto, Marcos Martinez, Milena Regina Silva, Murilo Bassan, Paulo Abarca Carmezini e Rafael Gazola que sempre me apoiaram a dar continuidade nos estudos.

Agradeço à Dr<sup>a</sup>. Gabriela Ferraz de Siqueira por todo apoio, recepção, pela amizade, companheirismo e paciência.

Agradeço ao Jorge Martinelli Martello pela ajuda, ensinamentos, dicas, pela recepção e amizade.

Agradeço ao Dr. Otavio Bagiotto Rossato pela ajuda, ensinamentos durante a condução do experimento.

Agradeço a Ariane Garcia pelo apoio, ajuda durante o desenvolvimento do projeto e pela amizade.

A Elisa Oliveira pela amizade, pela ajuda e pela parceria durante todo o período de trabalho.



Agradeço ao pessoal da salinha de pós-graduação: Claudio Hideo Martins da Costa, Cleiton José Alves, Fernando Vieira Costa Guidorizi, Jayme Ferrari Neto, José Gerardo Espinoza, Leontino de Oliveira Neto, Letusa Momesso Marques, Murilo Souza, Katiuça Sueko Tanaka e Tiara Guimarães pela amizade, companheirismo, ajuda direta ou indiretamente.

Aos amigos de pós-graduação do Departamento de Engenharia Rural, Edilson Ramos, Gilberto Winckler e Flávia Mota e ao Prof. Dr. Fernando Broetto, pela ajuda e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal, Célio Mariano, Casimiro Alves, Milton Matheus Vieira, Ciro de Oliveira, Antônio Oliveira Camargo, e às funcionárias da seção técnica de pós-graduação Edna Regina Prado e Tainah R.M. da Silva.

Aos funcionários da Raízen Energia S/A - Unidade Barra em especial Sebastião Santos Ribeiro, Adauto Aparecido Biega, Jaqueline Cristiane Adorna e Dirceu Olímpio que me ajudaram no desenvolvimento do projeto.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia/Agricultura, e a Faculdade de Ciências Agronômicas pela formação e também a oportunidade. A CAPES, pela bolsa de estudos concedida. Ao Grupo Farroupilha pela oportunidade e incentivo à pesquisa. E agradeço a todas as pessoas que contribuíram de alguma maneira para a realização trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	IX
LISTA DE TABELAS ... ..	X
1 RESUMO .....	1
2 SUMMARY .....	3
3 INTRODUÇÃO .....	5
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
4.1 Importância da cultura da cana-de-açúcar .....	8
4.2 Fixação biológica de nitrogênio por bactérias diazotróficas endofíticas em cana-de-açúcar.....	10
4.3 Importância agrônômica da aplicação de <i>Azospirillum brasilense</i> em gramíneas ...	14
5 MATERIAL E MÉTODOS .....	17
5.1 Localização e caracterização da área experimental e análise química do solo.....	17
5.2 Delineamento experimental e tratamentos.....	18
5.3 Instalação e condução do experimento .....	19
5.4 Características da variedade.....	20
5.5 Variáveis avaliadas .....	20
5.6 Análise estatística .....	25
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
6.1 Teores de nutrientes e índice de clorofila foliar .....	26
6.2 Características Biométricas e TCH.....	27
6.3 Parâmetros tecnológicos e de produtividade .....	29
7 CONCLUSÕES.....	31
8 REFERÊNCIAS .....	32

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1. Precipitação (mm) e temperatura média mensal (°C) entre junho de 2015 e junho de 2016. Estação Meteorológica do Grupo Raízen - Usina da Barra, município de Santa Maria da Serra (SP), ano agrícola 2015/16. .... 18
- Figura 2. Aplicação de *Azospirillum brasilense* no tolete. Fonte: Arquivo pessoal..... 20
- Figura 3. Avaliação de índice de clorofila foliar em cana-de-açúcar no ponto de maturação. Santa Maria da Serra (SP), 2016. Fonte: Arquivo pessoal..... 21

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1. Análise química inicial do solo, na profundidade 0-20 cm. Ano agrícola 2015. Santa Maria da Serra, SP, 2015. .... 18
- Tabela 2. Dados climáticos do dia da inoculação. Estação Meteorológica do Grupo Raízen - Usina da Barra, município de Santa Maria da Serra (SP), ano agrícola 2015/16. .... 19
- Tabela 3. Teores foliares médios de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e índice de clorofila foliar (ICF) na cultura da cana-de-açúcar em função de modos de aplicação (no tolete ou via foliar) e da inoculação ou não de *Azospirillum brasilense* e probabilidade de F. Santa Maria da Serra, SP, 2015/2016. .... 26
- Tabela 4. Número de colmos, altura de plantas, número de entrenó, comprimento médio entrenó (CME), diâmetro do colmo, peso de colmo, produtividade de colmos (TCH) de cana-de-açúcar e probabilidade de F em função da inoculação e dos modos de aplicação de *Azospirillum brasilense*. Santa Maria da Serra, SP, 2016. .... 28
- Tabela 5. Variáveis tecnológicas [pol cana, pureza do caldo, fibra, açúcar redutor, açúcar teórico recuperável (ATR)], produtividade de açúcar (TPH) de cana-de-açúcar e probabilidade de F em função da inoculação e dos modos de aplicação de *Azospirillum brasilense*. Santa Maria da Serra, SP, 2016..... 29

## 1 RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma cultura de grande importância econômica para o Brasil, pois além de gerar empregos em setores como agrícola, industriais e terceiros, a cultura também proporciona a produção de biomassa energética. Há muitas evidências de que esta cultura seja beneficiada pela interação com bactérias diazotróficas, principalmente as do gênero *Azospirillum* que, além da fixação de N atmosférico podem produzir fitormônios que promovem, na maioria dos casos, efeitos positivos no crescimento vegetal, no rendimento e nas alterações fisiológicas da planta. A principal barreira à utilização do *Azospirillum* a cultura da cana-de-açúcar tem sido a inconsistência dos resultados de pesquisa, que podem variar de acordo com a cultivar, as condições edafoclimáticas e a metodologia de condução da pesquisa. Objetivou-se, mediante o presente estudo, avaliar a eficácia dos modos de inoculação de *Azospirillum brasilense*, nos parâmetros biométricos, fisiológicos e tecnológicos, e as possíveis melhorias na absorção de nutrientes do solo e na produtividade. O trabalho foi desenvolvido em área experimental pertencente à Usina da Barra, localizada no município de Santa Maria da Serra - SP, na safra 2015/2016. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, em esquema fatorial 2 x 2, com 4 repetições. Os tratamentos foram constituídos por inoculação do *Azospirillum brasilense* (sem e com) e pelos modos de aplicação (tolete e foliar). Foi considerada como área útil as 4 linhas centrais de 8 linhas plantadas. A inoculação foi realizada por meio da aplicação de 2 L ha<sup>-1</sup> do produto comercial. A inoculação via tolete foi realizada antes do cobrimento do sulco e nas

parcelas que receberam via foliar, ocorreu no estágio de perfilhamento. Concluiu-se que a inoculação com *Azospirillum brasilense* não afetou os teores de macronutrientes, índice de clorofila foliar, número de colmos, número de entrenó e a qualidade tecnológica da cana-de-açúcar e houve aumento na altura de colmos em razão do aumento no comprimento médio do entrenó, refletindo aumento na produtividade de colmos e açúcar em torno de 15%.

Palavras-chave: *Saccharum* spp., bactéria diazotrófica, promotores de crescimento, fixação biológica de nitrogênio, produtividade.

INOCULATION MODES OF *Azospirillum brasilense* IN SUGARCANE. Botucatu, 2016. 42p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: DANIELE SCUDELETTI

Adviser: CARLOS ALEXANDRE COSTA CRUSCIOL

Co-Adviser: MARCELO DE ALMEIDA SILVA

## 2 SUMMARY

The sugarcane (*Saccharum* spp.) is a crop of great economic importance to Brazil, as well as create jobs in several sectors such as agricultural, industrial and third culture also provides the production of energy biomass. There are many evidences that this crop culture is benefited by interaction with diazotrophs, especially the *Azospirillum* genus that in addition to atmospheric N fixation can produce phytohormones that promote, in most cases, positive effects on plant growth, yield and amendments physiological plant. The main barrier to the use of *Azospirillum* in sugarcane has been the inconsistency of search results, which may vary according to the cultivar, the climatic conditions and methodology of research. The aim, through this study, was to evaluate the effectiveness of *Azospirillum brasilense* inoculation modes, the biometric, physiological and technological parameters, and possible improvements in the uptake of soil nutrients and yield. The study was conducted in the experimental area of Sugar mill Barra, localized in Santa Maria da Serra - SP, in 2015/2016. The experimental design was a randomized block in factorial 2 x 2, with four repetitions. The treatments consisted of inoculation of *Azospirillum brasilense* (with and without) and the application modes (stem and leaf). It was considered useble area of the center lines 4 of 8 lines planted. The inoculation was performed by applying 2 L<sup>-1</sup> ha of the commercial product. The inoculation of the stems was performed before covering the plating furrows and in plots that received foliar it occurred at tillering stage. It was concluded that inoculation with *Azospirillum brasilense* did not affect the macronutrient content, leaf chlorophyll content, stalk number, internode number and the technological quality of sugarcane and there was an increase in stalk height due to the increase in average length internode, resulting in higher yield in sugar and cane yield around 15%.

Keywords: *Saccharum* spp, diazotrophic bacteria, growth promoters, biological nitrogen fixation, yield.



### 3 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas do mundo, cultivada em mais de 100 países, onde o Brasil se destaca por ser o maior produtor mundial e o segundo em produção de etanol, atrás apenas dos USA. Em relação ao uso de biocombustíveis, o país conquista cada vez mais o mercado externo. Além disso, a cana-de-açúcar é considerada uma das melhores fontes de energia renovável, com perspectivas positivas no mercado, assim como na cogeração de energia elétrica (UNICA, 2016).

Até o surgimento do Proálcool na década de 70, o cultivo da cana-de-açúcar limitava-se às terras de maior fertilidade na região Centro Sul do país (TOKESHI, 1991) e a partir de então, com os incentivos governamentais para aumentar a produção de etanol, a cultura expandiu-se do Estado de São Paulo para áreas menos tradicionais, onde predominavam solos arenosos com baixa disponibilidade de nutrientes (SOBRAL; WEBER, 1983), o que contribuiu, em partes, para a redução da produtividade média brasileira.

A cana-de-açúcar é uma cultura que extrai expressiva quantidade de nitrogênio (N). Para alcançar produtividade média de 100 t ha<sup>-1</sup> de colmos, acumula em sua parte aérea 180-250 e 120-180 kg ha<sup>-1</sup> de N, nos ciclos culturais de cana-planta (primeiro ciclo) e soqueiras (ciclos seguintes), respectivamente (SAMPAIO et al., 1984).

De acordo com Perin (2007), a cana-de-açúcar é uma das culturas que mais se beneficia com a fixação biológica de nitrogênio (FBN). Estima-se que a FBN na cana-de-açúcar no Brasil pode gerar uma economia de equivalente a US\$ 200 milhões

de N-fertilizante ao ano, além de contribuir para a conservação do meio ambiente. A contribuição da FBN não está associada somente à variedade, mas também ao tipo de solo, às condições climáticas, e ao tipo de manejo empregado, principalmente pelo fato de que têm-se demonstrado alto número de bactérias diazotróficas endofíticas no interior de diferentes partes das plantas de cana-de-açúcar (URQUIAGA et al., 2005).

Os fatores que interferem nas respostas das culturas à inoculação de *Azospirillum* ainda não estão totalmente esclarecidos (REPKE et al., 2013). Estudos mais detalhados têm mostrado que há uma grande quantidade de bactérias do gênero *Azospirillum* que vivem naturalmente no interior das plantas de cana-de-açúcar, em grande quantidade nas raízes e no colmo desta cultura, e em menor quantidade nas folhas (BODDEY; DÖBEREINER, 1995; MILANI; MACHINESKI; BALOTA, 2011).

Há uma imensa diversidade de espécies de bactérias no solo, que são capazes de viver livremente ou em associação com plantas, responsáveis por uma série de interferências como a decomposição de matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes, que podem afetar positivamente a qualidade do solo, contribuindo para uma produção agrícola sustentável (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; CARDOSO; NOGUEIRA, 2007).

De acordo com Hungria (2011) existem vários trabalhos na literatura que confirmam a atuação do *Azospirillum* na produção de fitormônios, capazes de estimular o crescimento das raízes de diversas espécies de plantas e, ainda, pode fixar N e disponibilizá-lo à planta. Segundo a mesma autora, o maior desenvolvimento das raízes pela inoculação com *Azospirillum* proporciona incrementos na absorção de água e minerais, tolerância a estresses como salinidade e seca, contribuindo para a obtenção de plantas mais vigorosas e produtivas.

É possível que os primórdios radiculares, ao fornecerem nos seus exsudatos, substâncias ricas em carboidratos, ácidos orgânicos e vitaminas, e o solo, por contribuir com macro e micronutrientes, possibilitem o desenvolvimento de grande número de bactérias próximo ao tolete (PERIN, 2007). Entretanto, o fato das aberturas naturais, como os estômatos e hidatódios, facilitarem a entrada do *Azospirillum* (REIS; OLIVARES, 2006) e, devido ao menor número destas bactérias nativas nas folhas proporcionarem menor competição, pode-se obter resultados positivos com outros modos de inoculação em comparação ao tolete.

Outro fator que deve-se levar em consideração quanto à eficiência da inoculação é a tecnologia de aplicação. Quando o *Azospirillum* é aplicado via tolete, a

inoculação é realizada em sulco durante o plantio, o que acaba não sendo tão eficiente pois as bactérias, usualmente, dependem de ferimentos e/ou aberturas naturais para ganhar o interior das plantas (GOODMAN et al., 1986). A inoculação via foliar ocorre por estômatos, onde as bactérias podem multiplicar-se rapidamente e invadir a câmara subestomática e, por conseguinte, os espaços intercelulares das células do mesófilo (KAKU, 2004). A infecção dos estômatos por bactérias fixadoras de nitrogênio foi relatada para *H. rubrisubalbicans* em cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1993)

Contudo, os resultados obtidos ainda são inconsistentes, necessitando estudos que visem melhoria na eficiência da inoculação e a eficácia desse processo, pois a utilização de inoculante é influenciada por fatores edafoclimáticos, práticas de manejo e, também, quanto ao modo da inoculação (CAMPO et al., 2009; ZILLI et al., 2009).

Diante disto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficiência dos modos de aplicação de *Azospirillum brasilense* em cana planta, mediante as variáveis biométricas, fisiológicas e tecnológicas e as possíveis melhorias de absorção de nutrientes do solo e produtividade.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Importância da cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é originária do centro da Nova Guiné onde possui registros com mais de 8000 mil anos sobre seu cultivo e existem indícios de que, neste mesmo período, a cana-de-açúcar era utilizada na China (JAMES, 2004). Desde então, essa é uma das culturas mais eficientes e produtivas, no mundo, esta cultura tem importância na produção de alimentos, sendo designada cerca de 75% para o consumo humano (IRVINE, 1980; SOUZA et al., 2008).

Nos últimos anos a produção de cana-de-açúcar teve aumento expressivo assim como o uso do combustível (etanol). Conseqüentemente houve crescimento nas instalações de novas unidades industriais de açúcar e álcool no Estado de São Paulo, devido não somente a condições favoráveis vividas pelo mercado internacional de açúcar, assim como, o aumento da procura por etanol (CAMARGO JUNIOR; TONETO JUNIOR, 2009).

A produção da cultura da cana-de-açúcar está presente em pouco mais de 1,0% do território do país, sendo que 2,5% das áreas são utilizadas para a agropecuária. A cultura da cana-de-açúcar é uma das melhores opções dentre as fontes de energia renováveis, para a produção de etanol, açúcar, bioeletricidade e de outros produtos (UNICA, 2016).

Quanto ao etanol, os EUA é o maior produto mundial, seguido o Brasil, que na safra 2014/2015 o volume produzido atingiu 28 bilhões de litros. Já em relação ao açúcar, o Brasil é o maior produtor, com 36 milhões de toneladas produzidas e

24 milhões de toneladas exportadas no ciclo 2014/2015, quantias equivalentes a 20% da produção global e 40% da exportação mundial, respectivamente. A produção de bioeletricidade também é outro aspecto importante, sendo a terceira fonte de geração mais importante da matriz elétrica atrás somente das fontes hídrica e fóssil. O volume de energia renovável e limpa produzida a partir do bagaço e da palha da cana, ofertado à rede em 2014, equivale ao atendimento de quase 10 milhões de residências ao longo daquele ano. Sem essa geração de energia, o setor elétrico teria um acréscimo de 18% em novas matrizes energéticas (UNICA, 2016).

Segundo os dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2016) a produção de cana-de-açúcar para a safra 2016/17 está estimada em 684.773,9 milhões de toneladas, um aumento que deverá ser de 2,9% em relação à safra anterior. No entanto, em relação a área prevista de plantio deverá ser 8.973,2 mil hectares, com aumento prevista de 3,7 %, se comparada com a safra 2015/16. Já a produção de açúcar, deverá atingir 39.962,8 milhões de toneladas, 19,3 % superior à safra 2015/16. No entanto, a produção de etanol nesta safra, é de aumento na produção de anidro, passando de 11,2 bilhões de litros para 11,49 bilhões de litros, aumento de 27% da mistura de etanol anidro na gasolina, além do aumento do consumo deste combustível deve ser responsável por este aumento. O etanol hidratado deverá ter redução na sua produção, tendo vista que, além de destinarem uma parcela maior da moagem para produção de açúcar. A estimativa de 16,38 bilhões de litros é 14,9% inferior à safra passada. Deste modo, a cana-de-açúcar é uma das principais culturas de relevância no Brasil que a torna importante tanto no aspecto social, ambiental e econômico no país.

A cana-de-açúcar é uma planta que se adapta a uma ampla variação de condições climáticas, no entanto seu potencial produtivo é afetado por outros fatores como, por exemplo, a variedade utilizada e o solo. O manejo adequado da fertilidade do solo se faz necessário para obter alta produtividade e como consequência da ausência desse manejo, a planta pode apresentar deficiência de macronutrientes e/ou micronutrientes que levam a má formação dos perfilhos, diminuição da atividade fotossintética e diminuição da sacarose (ORTOLANI FILHO, 1983).

O nitrogênio é o segundo macronutriente mais exigido depois do potássio. A extração de nitrogênio pelas plantas varia durante o ciclo de desenvolvimento da planta em função da quantidade de raízes e da taxa de absorção por unidade de peso de raiz (moles  $\text{NO}^{3-}$  ou  $\text{NH}^{4+}$   $\text{h}^{-1}$   $\text{g}^{-1}$  raiz). Dentre as principais funções do nitrogênio nas

plantas, destaca-se por ser constituinte de aminoácidos, nucleotídeos e coenzimas, e esta relacionado diretamente com o crescimento das plantas, em sua ausência, um dos principais sintomas da deficiência do nitrogênio é a clorose das folhas, devido à inibição da síntese de clorofila, que é determinante para a produção das culturas levando conseqüentemente à obtenção de maiores produtividades (CREGAN; BERKUM, 1984; MAE, 1997).

A utilização de microrganismos, como as bactérias fixadoras de nitrogênio é uma alternativa ao uso de adubos químicos. Estes microrganismos são normalmente utilizados como inoculantes ou biofertilizantes (REIS, 2006). No entanto, o obstáculo para a utilização da tecnologia é a inconsistência de dados e a eficiência desse processo, pois o uso desse inoculante é influenciada por fatores edafoclimáticos, práticas de manejo, ou até mesmo, o modo da inoculação (CAMPO et al., 2009; ZILLI et al., 2009).

#### **4.2 Fixação biológica de nitrogênio por bactérias diazotróficas endofíticas em cana-de-açúcar**

Os diazotróficos compreendem ampla gama de microrganismos procariotos, incluindo representantes de arqueobactérias, cianobactérias, bactérias gram-positivas e gram negativas que apresentam grande diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. Tal diversidade garante não só a resiliência dos processos que mediam em um determinado ecossistema, como também a ocorrência deste, nos mais diferentes habitats terrestres (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os diazotróficos podem ser de vida livre, estar associado a espécies vegetais ou, ainda, estabelecer simbiose com leguminosas. Os estudos com bactérias diazotróficas são de grande importância, devido à contribuição destas para o fornecimento de nitrogênio a diversos ecossistemas, naturais ou manejados (MOREIRA; et al., 2010).

As primeiras observações feitas indicando interações dos diazotróficos com plantas não leguminosas foi em 1925 sob o nome de *Spirillum lipoferum* e acreditava-se que o benefício da fixação de nitrogênio em plantas não leguminosas pudesse favorecer as plantas do mesmo modo em que ocorre nas leguminosas, conhecido como fixação biológica do nitrogênio (FBN) (DÖBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003). Na FBN, os microrganismos são capazes de reduzir o N-atmosférico a formas inorgânicas assimiláveis, e garantir a resiliência deste processo, estabelecendo uma

relação de simbiose entre planta-microrganismo. A reação de redução do  $N_2$  a  $NH_3$  é realizada por diversos grupos de bactérias, sendo alguns organismos pertencentes ao grupo Archaea que tem como característica a enzima nitrogenase, conhecidos como fixadores de  $N_2$  ou diazotróficos, (CANTARELLA, 2007; PERIN, 2007; VITORINO, et al., 2012).

No Brasil as pesquisas com bactérias fixadoras de nitrogênio em gramíneas tiveram início pelos pesquisadores Johanna Döbereiner e Alaíde Ruschel na década de 50, onde isolaram a bactéria fixadora de nitrogênio *Beijerinckia fluminensis* da rizosfera da cana de açúcar (DÖBEREINER; RUSCHEL, 1958). A descoberta destes microrganismos, que colonizam em números elevados raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar e outras gramíneas, muda por completo o conceito de associações rizosféricas, que acontecem naturalmente ou através de inoculação (FRANCO; DÖBEREINER, 1994).

Cinco espécies de bactérias diazotróficas foram selecionadas após anos de pesquisas pela Embrapa Agroecologia para formulação do inoculante. São elas: *Azospirillum amazonense*; *Herbaspirillum seropedicae*; *Herbaspirillum rubrisubalbicans*; *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Burkholderia tropica*, todas isoladas de tecidos de diferentes variedades de cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2002, 2006; REIS et al., 2009b).

No entanto, quando se analisa as diferenças em relação à FBN em cana-de-açúcar, é necessário considerar a diversidade genética das bactérias diazotróficas relacionada com o genótipo da planta (PIÑERO et al., 1988; COMBE et al., 1994). Porém os mecanismos de associação entre bactérias diazotróficas e a cana-de-açúcar não foram totalmente esclarecidos, pois essa associação envolve diversos gêneros bacterianos e mecanismos (JAMES, 2000),

O processo de infecção e colonização de plantas por bactérias caracterizam-se pela adesão e posterior penetração e multiplicação no interior das mesmas (REIS; OLIVARES, 2006). As bactérias diazotróficas endofíticas penetram de forma passiva e infectam a planta hospedeira, essa infecção ocorre principalmente por aberturas naturais no sistema radicular e na parte-aérea. O eixo radicular é a principal porta de entrada dessas bactérias em gramíneas, que ganham acesso ao tecido radicular principalmente por meio de cavidades formadas pela emergência de raízes laterais. Dentro dos tecidos radiculares, as bactérias diazotróficas colonizam os diferentes nichos por espalhamento sistêmico passivo (via fluxo respiratório) e ativo (via movimento flagelar) e alcançam os tecidos aéreos da planta através do xilema. Além desses mecanismos,

envolvendo estabelecimento endofítico radicular e a possibilidade de espalhamento sistêmico para parte aérea, existe a possibilidade de infecção direta da parte aérea pela abertura estomática e, em menor frequência, por meio de tricomas quebrados (BALDANI et al., 2009).

A seleção de genótipos de plantas no Brasil, em solos fertilizados com fosfatos e microelementos, porém com baixo ou nenhuma aplicação de N, é um dos fatores-chave para as contribuições de FBN, podendo enriquecer em 60% o conteúdo de N da cana-de-açúcar (BODDEY et al., 2001). A FBN em cana-de-açúcar também é influenciada pela disponibilidade de água no solo (BODDEY; DÖBEREINER, 1984); idade da planta (FUENTES-RAMIREZ et al., 1993); inoculações realizadas em condições de laboratório ou de campo, (SEVILLA et al., 2001); nutrição da planta, com destaque para o molibdênio que é essencial para a síntese da enzima nitrogenase (POLIDORO, 2001); e da adubação nitrogenada (REIS JUNIOR et al., 2000a). Os melhores resultados na FBN por organismos endofíticos estão relacionados à sua localização, próximos à fonte de energia disponibilizada pelas plantas, como a sacarose, e devido ao interior vegetal, que garante uma baixa pressão de oxigênio, ideal para a atividade da nitrogenase (BALDANI; BALDANI, 2005).

O nutriente mineral que tem maior influencia na FBN é o nitrogênio (FRANCO; NEVES, 1992). Vários trabalhos demonstram que a adubação nitrogenada em cana-de-açúcar pode diminuir a população de organismos diazotróficos com capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1999; MUTHUKUMARASAMY et al., 1999; REIS JUNIOR et al., 2000a). A redução da população de bactérias pode variar de acordo com a fonte de nitrogênio aplicada (FRANCO; NEVES, 1992).

Oliveira et al., (2006), ao estudar a aplicação do inoculante na cultura de cana-de-açúcar em campo associado a doses de N e com solo de baixa, media e alta fertilidade, mostraram que a eficiência do inoculante é dependente da fertilidade do solo, sendo os melhores resultados observados no Planossolo sem fertilização nitrogenada, ou seja, baixa fertilidade. Há controvérsias sobre bactérias fixadoras versus adubação nitrogenada. Foram encontradas populações de *Gluconactobacter diazotrophicus* isoladas de cana em campos comerciais, no entanto, outros trabalhos mostraram a redução da população de bactérias, em áreas com elevada adubação nitrogenada (LI; MACRAE, 1991; FUENTES-RAMIREZ et al. 1993; PERIN et al. 2004; MEDEIROS et al. 2006).



A bactéria *Herbaspirillum* spp. é considerada mais resistente à maiores doses de nitrogênio (MUTHUKUMARASAMY et al., 1999), quando comparada com *Gluconacetobacter diazotrophicus* (REIS JUNIOR et al., 2000a). Não há relação direta entre a presença das bactérias diazotróficas e altas doses de N, uma vez que estas continuam a fixar o nitrogênio mesmo com concentrações altas de nitrato. Provavelmente, haja uma alteração fisiológica na planta em presença de altas doses de N e, posteriormente, afetando a associação com estes microrganismos (REIS JUNIOR et al., 2000a).

As bactérias do gênero *Azospirillum*, quando inoculada pode não alcançar a eficiência similar das simbioses rizóbio-leguminosas no solo, mas o N fixado para gramíneas está em torno de 25 a 50 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>, equivalendo ao suprimento médio de aproximadamente 17% da demanda das culturas (MOREIRA et al., 2010). Variedades de cana-de-açúcar inoculadas com maior número de bactérias diazotróficas, *Azospirillum* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*, apresentaram maior potencial de FBN, porém, quando submetidas à metade da dose recomendada (50 kg ha<sup>-1</sup>) de fertilizante nitrogenado, atingiram níveis de produtividade similares aos de plantas com a dose completa e também melhoria na eficiência do uso de N-fertilizante. Diferentemente, das variedades inoculadas com *Herbaspirillum*, onde houve um aumento da população com dose completa do fertilizante nitrogenado (SUMAN et al, 2008).

Trabalhados realizados com cana-de-açúcar mostraram que a promoção do crescimento das plantas pode não ser, necessariamente, atribuído somente à FBN, mas também à produção de fitormônios pelas bactérias. Esses estimulam o crescimento das raízes em baixas concentrações, auxiliando no desenvolvimento nos primeiros estádios de crescimento da planta, porém, causam efeito inibitório em altas concentrações, sugerindo que a inoculação com grande número de células bacterianas viáveis pode causar inibição, ao invés de estimular o crescimento das raízes (DOBBELAERE; CROONENBORGHES 2002).

A contribuição dos diazotróficos para o suprimento de nitrogênio à cultura da cana-de-açúcar está relacionada ao fato de que, em certas variedades, a fixação de nitrogênio pode ser suficiente para suprir três vezes a média atual da produtividade brasileira, desde que os demais nutrientes e água não sejam fatores limitantes (FRANCO; DOBEREINER, 1994). Este processo possui grande importância nos aspectos econômico e ecológico em sistemas agrícolas e florestais, afetando diretamente o metabolismo das

plantas e auxiliando no biocontrole de patógenos (BASHAN, DE-BASHAN,2005; REIS; TEIXEIRA, 2005).

A estimativa de economia pelo uso de organismos diazotróficos em lavouras de cana-de-açúcar brasileiras com a substituição de 50% da dose recomendada de N fertilizante ( $60 \text{ kg N ha}^{-1}$ ), representaria economia de 150.000 toneladas de N por ano, que corresponderia a 735 milhões de reais, tornando os derivados da cultura (etanol e açúcar) ainda mais competitivos no mercado internacional, além de contribuir na preservação do meio ambiente (REIS et al., 2008; REIS et al., 2009a).

### **4.3 Importância agrônômica da aplicação de *Azospirillum brasilense* em gramíneas**

As bactérias do gênero *Azospirillum* são conhecidas como bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) e caracterizadas como bactérias de vida livre no solo, rizosfera, rizoplano e filosfera que, sob algumas condições, são benéficas às plantas. As mais conhecidas entre as não simbióticas BPCP são bactérias do gênero *Azospirillum* (BASHAN; BASHAN, 2005).

Essas bactérias são benéficas às plantas e possuem a capacidade de colonizar as raízes e outros tecidos internos do vegetal, sem causar sintomas de doenças (REIS *et al.*, 2006). É uma relação simbiótica, onde as bactérias se beneficiam por colonizarem um ambiente protegido contra vários estresses bióticos e abióticos (REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998), em contrapartida podem promover o crescimento da planta hospedeira através de diversos mecanismos (GOVINDARAJAN *et al.*, 2006; MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 2006; SEVILLA *et al.*, 1998).

O crescimento da planta ocorre por diversos mecanismos, como a fixação biológica de nitrogênio, a produção de hormônios de plantas (auxina, giberelina e citocinina, estimulando a ramificação da raiz, aumentando a biomassa da parte aérea e da raiz, aumentam a permeabilidade da raiz, melhoram a absorção de minerais em geral, e aumentam a resistência em condições adversas como seca, salinidade e compostos tóxicos (BASHAN; BASHAN, 2005).

Hungria *et al.*(2010), ao avaliar a inoculação com estirpes selecionadas de *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum* na melhoria do rendimento de

milho e trigo no Brasil, comprovaram a absorção de macronutrientes e micronutrientes pelas plantas inoculadas, e aumento na eficiência do uso dos nutrientes disponíveis.

Barros Neto (2008), em pesquisa avaliando o rendimento de grãos de milho em resposta a adubação nitrogenada e a inoculação das sementes com produto pré-comercial a base de *Azospirillum brasilense*, identificou 9% de aumento na produtividade de grãos de milho em razão do uso do inoculante. Portugal et al. (2012), utilizando doses de N e inoculação via foliar com *Azospirillum brasilense* em milho de Cerrado, observaram incremento de 868 kg ha<sup>-1</sup> na produtividade de grãos, ou seja, aumento de 14,75% em plantas inoculadas. Díaz-Zorita; Fernandez Canigia,(2008), observaram aumento médio de 472 kg ha<sup>-1</sup> na produtividade do milho.

No trabalho de Galindo (2015), o diâmetro do colmo de milho foi influenciado positivamente pela inoculação com *A. brasilense*, onde os tratamentos inoculados apresentaram maior diâmetro do colmo quando comparados aos tratamentos sem inoculação, diferentemente do verificado por Kappes et al. (2013), que não encontraram diferenças significativas no diâmetro do colmo, para tratamentos com inoculação. O aumento do diâmetro de colmo com inoculação é desejável, pois quanto maior diâmetro maior será a capacidade da planta em armazenar fotoassimilados favorecendo o enchimento dos grãos (CRUZ et al., 2008; LANA et al., 2009).

Acredita-se que a inoculação de *Azospirillum brasilense* em sementes de milho possa ter contribuído com o aumento do acúmulo de matéria seca associadas à doses elevadas de nitrogênio e conseqüentemente o aumento da atividade das enzimas fotossintéticas e de assimilação de nitrogênio. Reis Júnior et al. (2008) comprovaram o aumento de matéria seca e o acúmulo de nutrientes em plantas inoculadas com *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio (STANCHEVA et al., 1992).

Em sementes de genótipos de milho, inoculados com *Azospirillum* spp. no Rio Grande do Sul, Quadros (2009) observou o aumento no volume de raízes nos cultivares avaliados, além de aumentar o rendimento de matéria seca na parte aérea de plantas de milho, o que está relacionado com o aumento das atividades das enzimas fotossintéticas.

Silva et al. (2010), no estudo sobre fixação biológica de nitrogênio em pastagens com diferentes intensidades de corte, observaram que a contribuição da FBN pelas bactérias diazotróficas nas pastagens variou de 10 a 42%. Os autores salientaram

também que as intensidades de corte não influenciaram na contribuição da FBN em nenhuma das pastagens estudadas (*Brachiaria humidicola* Rendle, *B. decumbens* Stapf. e *Pennisetum purpureum* Schum). Guimarães (2011) avaliou o crescimento e desenvolvimento inicial de *Brachiaria decumbens* inoculada com *Azospirillum* spp e observou incremento de 11% na massa seca do colmo, quando a planta foi inoculada com a estirpe AZ17.

Na cultura da cana-de-açúcar, promoveu incrementos na produtividade de colmos de forma similar à adubação com 120 kg ha<sup>-1</sup> de N, nos ciclos de cana-planta, primeira e segunda socas, em área de cultivos comerciais (REIS JÚNIOR et al. 2000b). Já ao estudar o efeito do inoculante e três estirpes individuais de bactérias em cana-planta, por imersão dos toletes, em seis variedades de cana-açúcar. Pereira et al. (2013) concluíram que a inoculação promove ganhos de biomassa, sendo a contribuição diferente entre variedades e estirpes, sugerindo uma interação entre esses fatores.

Em trabalho realizado por Shultz et al. (2012), as bactérias diazotróficas promoveram incremento no desenvolvimento e produtividade similar à adição de 120 kg ha<sup>-1</sup> de N fertilizante à variedade de cana-de-açúcar RB867515. De acordo com, o Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar (2010) essa variedade é mais exigente quanto à fertilidade de solo, o que justifica sua resposta ao fertilizante nitrogenado e à inoculação. Além disso, o genótipo da variedade RB867515 respondeu melhor à inoculação, favorecendo o aumento de produtividade testemunha. Segundo Urquiaga et al. (1992) e Boddey et al. (2003), a interação bactéria-planta e a eficiência da FBN são dependentes do genótipo da planta.

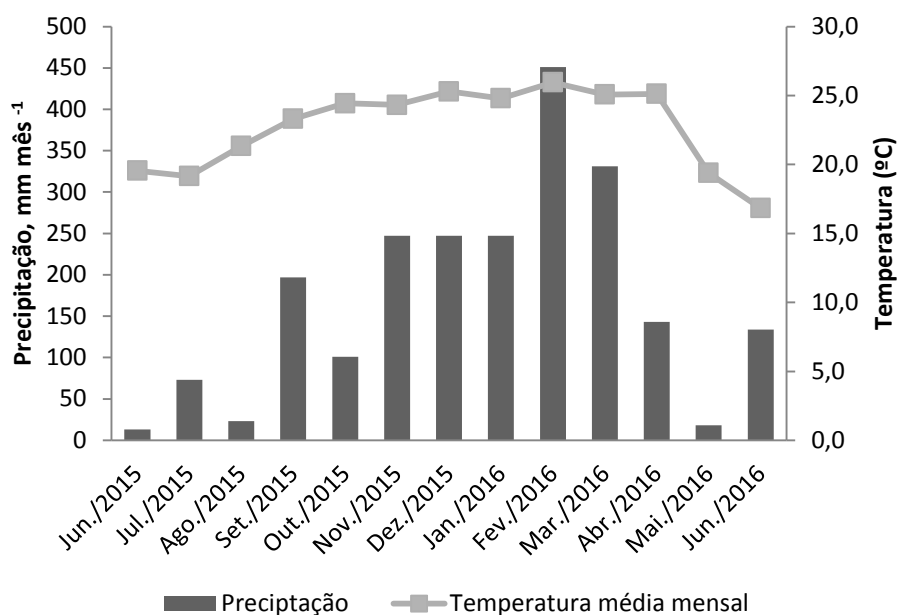
Em trabalho realizado por Reis *et al.* (2009), os estudos de inoculação com o coquetel de bactérias diazotróficas, observaram em um dos ensaios, aumento significativo de produtividade na variedade RB867515. De acordo com Chapola et al. (2010), esse aumento na produtividade desta nesta variedade é de grande interesse dos produtores, devido a esta variedade ser a principal variedade de cana-de-açúcar cultivada na região Centro-Sul, respondendo por 20,5% da área plantada.

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Localização, caracterização e análise química do solo da área experimental**

O experimento foi desenvolvido no ano agrícola 2015/16, em área experimental pertencente ao Grupo Raízen, Unidade Barra, localizada no município de Santa Maria da Serra (SP), apresentando como coordenadas geográficas 48° 20' de longitude Oeste de Greenwich e 22° 31' de latitude Sul, com altitude de 495 metros.

De acordo com a classificação de Köppen, o clima predominante da região é subtropical úmido (Cfa) com pluviosidade significativa ao longo do ano. A temperatura, precipitação e umidade relativa média anual são: 22,3°C, 1.467 mm e 70%, respectivamente. Na Figura 1 são apresentados os dados de precipitação e temperatura média mensal, registrados durante a condução do experimento na Estação Meteorológica instalada na área experimental.



**Figura 1.** Precipitação (mm) e temperatura média mensal (°C) entre junho de 2015 e junho de 2016. Estação Meteorológica do Grupo Raízen- Usina da Barra, município de Santa Maria da Serra (SP), ano agrícola 2015/16.

De acordo com Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos (EMBRAPA, 2006), o solo da área experimental é classificado como Neossolo Quartzarênico. As características químicas do solo foram determinadas antes da instalação do experimento, conforme metodologia proposta por Raij (2001), cujo resultados encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1.** Análise química inicial do solo, na profundidade 0-20 cm. Ano agrícola 2015. Santa Maria da Serra, SP, 2015.

Camada (cm)	pH	M.O g dm <sup>-3</sup>	P resina mg dm <sup>-3</sup>	S	Al <sup>3+</sup>	H+Al <sup>3+</sup>	K	Ca	Mg	SB	CTC	V
	CaCl <sub>2</sub>				.....mmolc dm <sup>-3</sup> .....							%
0-20	5,25	13,5	10,5	0	0,42	14,5	6,82	18,92	11,58	37,32	51,5	72

## 5.2 Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, em esquema fatorial 2 x 2, com 4 repetições. Os tratamentos foram constituídos por inoculação (sem e com) e modo de inoculação (tolete e foliar). Cada unidade experimental foi constituída de

8linhas de plantio, com 14 metros de comprimento, perfazendo uma área total de 134,4m<sup>2</sup>. Para as avaliações foi considerada como área útil as 4 linhas centrais de cada parcela.

### 5.3 Instalação e condução do experimento

Antes da instalação do experimento, realizou-se a análise de solo e de acordo com esta análise foi não necessária a calagem em área total para elevar a saturação por bases a 70% conforme recomendação de Spironello et al. (1996).

O experimento foi conduzido em cana planta, variedade RB867515, plantada manualmente (18/06/2015), utilizando o espaçamento combinado de 1,5 m x 0,9 m, com 15 gemas por metro (Figura 2 A). A adubação de plantio constou da aplicação de 550 kg ha<sup>-1</sup> do formulado N-P-K 10-25-25. A emergência das plantas ocorreu aproximadamente 30 dias após o plantio (DAP).

A inoculação foi realizada com inoculante líquido, contendo a estirpe Abv-5 de *Azospirillum brasilense* em concentração de 1x10<sup>8</sup>cfu/L (colony-formingunit/Litro), por meio da aplicação de 2 L ha<sup>-1</sup>, utilizando calda de 150 L ha<sup>-1</sup>. A inoculação via tolete foi realizada antes do cobrimento do sulco e nas parcelas que receberam via foliar, esta ocorreu no estágio de perfilhamento (98 DAP - 24/09/2015), sendo que ambas as aplicações foram efetuada com a utilização de pulverizador costal pressurizadas a CO<sub>2</sub> e com ponta do tipo “leque”. A caracterização climática do dia da inoculação consta na tabela 2.

**Tabela 2.** Dados climáticos do dia da inoculação. Estação Meteorológica do Grupo Raízen - Usina da Barra, município de Santa Maria da Serra (SP), ano agrícola 2015/16.

<u>Data de aplicação</u>	Temperatura média °C	Umidade relativa do ar (%)	Velocidade do vento (ms <sup>-1</sup> )
18/06/2015	22,5	83,1	1,5
24/09/2015	29	46,6	1,1

O controle de pragas e doenças foi realizado de forma preventiva no dia do plantio. Foram utilizados os fungicidas com principio ativo azoxistrobina (50 g ha<sup>-1</sup>) e ciproconazol (20 g ha<sup>-1</sup>) e os inseticida com principio ativo Fipronil (31,25 g ha<sup>-1</sup>). Ambos aplicados no sulco de plantio.

Aos 15 DAP foi realizado o controle de plantas daninhas. Esse controle se deu por meio da aplicação dos princípios ativos Clomazine (864 g.i.a ha<sup>-1</sup>) e

posteriormente Diurom (1280 g ha<sup>-1</sup>), ambos utilizando um volume de calda de 200 L ha<sup>-1</sup>. Os demais tratos culturais foram realizados de acordo com as necessidades da cultura.



**Figura 2.** Aplicação de *Azospirillum brasilense* no tolete.

#### **5.4 Características da variedade**

A variedade utilizada foi a RB867515 que tem as seguintes características: apresenta hábito de crescimento ereto e despalha fácil com boa capacidade de brotação mesmo em plantio tardio sob baixas temperaturas; o perfilhamento é médio com colmos de diâmetro regular e alta uniformidade; os colmos possuem entrenós cilíndricos, de cor verde-arroxeadado sob a palha e roxo intenso quando expostos ao sol, apresentando pouca rachadura; as folhas são de largura média, arqueadas, curvas e com bordos serrilhados; a bainha é de comprimento longo com quantidade de cera regular e pouco joçal, neste caso, caduco; o palmito é médio, de cor verde-arrocheado e com pouca cerra; o teor de fibra é relativamente alto, em média 13%, e a maturação é média recomendada para colheita do meio para o final de safra. Há relatos que produtividade agroindustrial superior a outras importantes variedades, além de melhor desempenho em solos de textura leve e fertilidade média (CATÁLOGO NACIONAL DE VARIEDADES “RB” DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2010).

#### **5.5 Variáveis avaliadas**

##### **5.5.1 Teor foliar de macronutrientes**



Para determinar os teores de macronutrientes nas folhas da cana-de-açúcar, realizou-se a coleta de 10 folhas folha +1 [conhecida como folha TVD (Top Visible Dewlap) ou folha +1] por unidade experimental no período de máximo desenvolvimento vegetativo da cana-de-açúcar (235 DAP 09/03/2016), das quais foram retiradas a nervura central, destacando-as manualmente e, posteriormente, lavando-as com água deionizada para remoção de partículas de solo e poeira. As amostras foram acondicionadas em sacos de papel devidamente identificados e submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar com temperatura média de 60°C por 72 horas. Posteriormente o material foi moído em equipamento dotado de peneira com crivo de 1 mm e em seguida analisado os teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S), conforme metodologia proposta por Malavolta et al. (1997).

### 5.5.2 Estimativa do índice de clorofila foliar

Na pré-colheita (15/06/2016) realizou-se a estimativa do teor médio de clorofila foliar (Figura 3), por meio de clorofilômetro portátil “SPAD-502” (Minolta Corp., Ramsey, NJ, EUA), as leituras correspondem ao teor de pigmento na folha, e seu valor é equivalente a quantidade de luz transmitida pela folha em duas regiões de comprimento de onda, nas quais a absorção de clorofila é diferente (MALAVOLTA et al., 1997), chamadas de Índice de Clorofila Foliar (ICF). Cada medição foi realizada no limbo foliar da folha +1, obtendo-se três medições por planta, em 10 plantas por parcela.



**Figura 3.** Avaliação de índice de clorofila foliar em cana-de-açúcar no ponto de maturação. Santa Maria da Serra (SP), 2016.

### **5.5.3 Variáveis biométricas**

#### **a) Número de colmos por metro**

O número médio de colmos foi determinado pela contagem de 2 m em 2 fileiras duplas, sendo, portanto, em um total de 4 fileiras de plantas, efetuado com o auxílio de um gabarito, disposto aleatoriamente nas 2 linhas duplas centrais da área útil da parcela.

#### **b) Altura de plantas**

A altura de plantas foi realizada em 20 colmos sequenciados, nas mesmas áreas utilizadas para determinação do item 5.5.3a, por meio de medição com régua graduada em centímetros, considerando a distância entre o solo até a região auricular da folha +1, de acordo com a numeração sugerida por Kuijper (DILLEWIJN, 1952).

#### **c) Número de entrenós**

O número de entrenós foi realizado por meio da contagem de entrenós nos mesmos colmos utilizados para determinação do item 5.5.3b.

#### **d) Comprimento médio de entrenó (CME)**

O comprimento médio de entrenó foi calculado dividindo-se os valores de altura de planta pelo número de entrenós.

#### **e) Diâmetro do colmo**

A determinação do diâmetro de colmo foi efetuada com auxílio de paquímetro digital, realizada no terceiro entrenó acima da superfície do solo, nas mesmas plantas utilizadas para determinação do item 5.5.3b.

### **5.5.4 Produtividade de colmos (TCH)**

Realizou-se a colheita dos colmos contidos em duas fileiras duplas centrais em 2 m, portanto, em um total de 4 fileiras de plantas, e posteriormente os mesmos foram pesados. De posse destes resultados e dos valores da população de colmos por área, calculou-se a produtividade de colmos em  $t\ ha^{-1}$ .

### 5.5.5 Parâmetros Tecnológicos

#### a) Pol (%)

A pol representa a porcentagem aparente de sacarose contida numa solução de açúcares. Para o caldo de cana madura o teor de glicose e frutose é geralmente baixo, menor do que 0,5%, comparado ao teor de sacarose, que pode estar acima de 16%, na média da safra, fazendo com que seu valor se aproxime bastante do teor real de sacarose, sendo normalmente aceito como tal. A sacarose, um dissacarídeo, é o principal parâmetro de qualidade tecnológica da cana-de-açúcar; refere-se ao açúcar diretamente cristalizável no processo de fabricação (FERNANDES, 2003).

Obtida através da fórmula  $PCC (Pol\% \text{ cana}) = Pol\% \text{ caldo} * (1 - 0,01 * Fibra) * C$ , onde  $C =$  coeficiente de transformação da pol do caldo extraído em pol do caldo absoluto, calculado pela equação  $C = 1,0313 - 0,00575 * Fibra$ . A Pol% caldo refere-se à sacarose aparente por cento do caldo e foi determinada em sacarímetro digital automático.

#### b) Pureza do Caldo

A pureza reflete a porcentagem de sacarose contida nos sólidos solúveis, sendo denominada “pureza real”, entretanto quando esta determinação é realizada numa solução açucarada impura, diz-se “pureza aparente”. A pureza expressa quantos por cento dos sólidos solúveis (°Brix) são representados pela sacarose (pol) (FERNANDES, 2003). Determinada através da seguinte relação:

$$P (\text{Pureza}) = (\text{Pol}\% \text{ caldo} / \text{Brix}\% \text{ caldo}) \times 100 \quad (1)$$

O Brix% caldo refere-se aos sólidos solúveis por cento do caldo e foi determinado em refratômetro digital de leitura automática.

#### c) Fibra

A fibra é a matéria insolúvel em água contida na cana. No colmo de cana, as fibras do parênquima são de estrutura mais frágil e fina, e formam as células isodiamétricas de estocagem do caldo de alto teor de sacarose (FERNANDES, 2003). No sistema de pagamento de cana pelo teor de sacarose (PCTS) a fibra é estimada em função do peso de bagaço úmido da prensa. Determinada pelo método da prensa hidráulica,

conforme determinado no Ato 13/83, de 21/04/1983 – IAA, citado por Mutton (1984) e atualizações semestrais do Conselho dos Produtores de Cana-de-Açúcar, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo (1997).

$$F = 0,08 * PBU + 0,876,$$

Onde F:

- F é a Fibra cana e PBU refere-se ao peso do bagaço úmido da prensa, em gramas.

#### **d) AR cana (%)**

Os açúcares redutores (AR) referem-se ao termo utilizado para designar os açúcares (monossacarídeos), glicose e frutose, principalmente. Os açúcares redutores são produtos precursores de cor no processo industrial, isto é, participam de reações que aumentam a cor do açúcar, depreciando a qualidade do produto. Durante a maturação da cana-de-açúcar, à medida que o teor de sacarose se eleva os açúcares redutores decrescem de aproximadamente 2,0% para valores abaixo de 0,5%, entre março/abril e setembro/outubro no Hemisfério Sul, podendo chegar a 0,2%. Esse comportamento torna importante a análise do teor de açúcares redutores para acompanhamento e julgamento da maturação, principalmente nos primeiros meses de safra (FERNANDES, 2003).

$$AR = (9,9408 - 0,1049 \times \text{Pureza}) \times (1 - 0,01 \times \text{Fibra}) \times (1,0313 - 0,00575 \times \text{Fibra})$$

- primeiro parênteses: Regressão que correlaciona Pureza da cana com teor de AR;
- segundo parênteses: Regressão que transforma a AR do caldo para AR da cana;
- terceiro parênteses: Regressão que corrige a extração da prensa para extração real.

#### **e) Açúcar teórico recuperável cana (ATR)**

O açúcar teórico recuperável (ATR) constitui uma das variáveis do sistema de pagamento de cana implantado em São Paulo a partir da safra de 1998/99, e reflete o resultado da diferença entre o ART (açúcares redutores totais) da cana e as perdas na lavagem de cana, no bagaço final, na torta do filtro ou prensa e as “indeterminadas”, considerando a eficiência média padrão, ou seja, representa a quantidade de açúcares (na forma de açúcares invertidos ou ART) que são recuperados na usina assumindo perdas de 12% na lavagem de cana, extração (perda de pol no bagaço final), torta dos filtros ou

prensas e as “indeterminadas” (FERNANDES, 2003). Açúcar teórico recuperável - ATR (kg t colmos): calculado pelo SPCTS atual, aprovado pelo Conselho dos Produtores de Cana-de-Açúcar, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo (2006).

$$\text{ATR} = 10 \times 0,88 \times 1,0526 \times \text{PCC} + 10 \times 0,88 \times \text{ARC}$$

- o fator 10, refere-se à Transformação de kg Pol/100 kg cana (%) em kg Pol t<sup>-1</sup> cana;
- o fator 0,88, refere-se à Eficiência industrial de lavagem, extração e tratamento caldo juntas, ou seja, coeficiente de recuperação, para uma perda industrial de 12%;
- o fator 1,0526, refere-se ao Fator que transforma a Pol em AR, ou seja, coeficiente estequiométrico para a conversão de Pol em açúcares redutores.

#### **5.5.6 Produtividade de açúcar (TPH)**

A determinação da TPH (t ha<sup>-1</sup>) foi realizada por meio do produto da multiplicação dos valores de TCH (t ha<sup>-1</sup>) pelos valores de Polcana (%) dividido por 100.

### **5.6 Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de t (LSD) a 10% de probabilidade, utilizando o software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2008).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Teores de nutrientes e índice de clorofila foliar

Na Tabela 3 estão contidos os resultados de teores de nutrientes e índice de clorofila foliar em função da inoculação com *A. brasilense* e dos modos de aplicação do inoculante. Em nenhuma variável houve efeito do modo de inoculação, bem como da interação entre os fatores.

**Tabela 3.** Teores foliares médios de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e índice de clorofila foliar (ICF) na cultura da cana-de-açúcar em função de modos de aplicação (no tolete ou via foliar) e da inoculação ou não de *Azospirillum brasilense* e probabilidade de F. Santa Maria da Serra, SP, 2015/2016.

<u>Modos de aplicação</u>	N	P	K	Ca	Mg	S	ICF
		.....g kg <sup>-1</sup> .....					
Controle	17,1b	2,2 a	9,0 a	8,8 a	1,9 a	1,4 a	28,5 a
Tolete	16,1 ab	2,3 a	7,9 b	8,4 a	1,8 a	1,5 a	29,0 a
Foliar	15,4 a	2,3 a	8,5 ab	8,9 a	1,9 a	1,2 a	29,3 a
Média geral	16,21	2,2	8,5	8,7	1,9	1,4	28,9
CV (%)	5,19	5,46	7,9	6,59	5,09	15,11	6,21
<u>Probabilidade de F</u>	0,0670	0,8501	0,1367	0,4449	0,6977	0,4405	0,8113

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste t (LSD) a 10% de probabilidade.

Os resultados dos teores foliares de nutrientes da cana-de-açúcar foram significativos para o nitrogênio e potássio em decorrência da inoculação ou não com *A. brasilense* (Tabela 3). Os maiores teores foram observados nas plantas não inoculadas,

com teores de nitrogênio e potássio de 17,1 e 9,0 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente, valores estes 8,9 e 10,2% superiores aos valores constatados nas plantas inoculadas. Este efeito pode ser decorrente do efeito diluição, em que as concentrações dos nutrientes são diluídas em virtude do maior crescimento da planta (JARRELL; BEVERLY, 1981; MISHRA; KURCHANIA, 2001).

De maneira geral, os teores de foliares de P, Ca e Mg encontravam-se dentro da faixa considerada adequada para a cultura (AMBROSANO et al., 1997). Contudo, os teores de N, K e S encontravam-se abaixo da faixa considerada adequada. Estes resultados podem ser atribuídos ao fato de que as amostras foliares foram colhidas no estágio de maior desenvolvimento da cultura, onde a taxa de crescimento relativa de matéria seca foi superior à taxa de absorção do nutriente, causando dissolução dos nutrientes em virtude do crescimento das plantas (GOMEZ-ALVAREZ, 1974).

Quanto ao índice de clorofila foliar (ICF), a ausência de efeito da inoculação e do modo de aplicação corroboram os resultados observados por Portugal et al. (2012) e Müller et al (2012). No caso desses trabalhos as plantas absorveram quantidade excessiva de N e esse acumula-se na forma de nitrato, dessa maneira, o N não se associa à molécula de clorofila, sendo assim, não é detectado pelo medidor de clorofila (DWYER et al., 1995).

Cabe ressaltar que, apesar das diferenças observadas nos teores de N este não se correlacionou com o ICF, o que confirma a hipótese de que possa ter ocorrido efeito diluição, visto que, este índice é altamente correlacionado com o teor de clorofila das folhas, que pode ser um indicativo de deficiência de N (MARKWELL et al., 1995; GUIMARÃES et al., 1999).

## **6.2 Características Biométricas e TCH**

Os parâmetros altura de plantas e comprimento médio de entrenós (CME) foram influenciados pela inoculação com *Azospirillum brasilense*, aumentando o comprimento dos entrenós e, conseqüentemente, proporcionando maior altura de plantas (Tabela 4). Estudos têm indicado que o uso dessas bactérias estimula o crescimento vegetal através da produção de hormônios como, por exemplo, auxinas, citocininas, giberelinas e etileno (OLIVARES, et al., 1996).

Quanto ao diâmetro, número de colmos e entrenós não teve diferença entre a inoculação com *Azospirillum brasilense*, o modo de aplicação, bem como a interação entre os fatores (Tabela 4). Estes parâmetros biométricos apresentam pouca variação, pois dependem das características do genótipo, do número de perfilhos, do espaçamento entre linhas, da área foliar e das condições ambientais (LANDELL; SILVA, 1995).

**Tabela 4.** Número de colmos, altura de plantas, número de entrenó, comprimento médio entrenó (CME), diâmetro do colmo, peso de colmo, produtividade de colmos (TCH) de cana-de-açúcar e probabilidade de F em função da inoculação e dos modos de aplicação de *Azospirillum brasilense*. Santa Maria da Serra, SP, 2016.

<u>Modos de aplicação</u>	Colmo	Altura	Entrenó	CME	Diâmetro	Peso	TCH
	n°	m	n°	cm	mm	kg	t ha <sup>-1</sup>
Controle	9,2 a	2,7 b	19,5 a	14,1 b	27,2 a	1,1 c	84 c
Tolete	9,2 a	2,9 a	19,3 a	15,3 a	27,4 a	1,3 b	97 b
Foliar	9,2 a	2,8 ab	19,9 a	14,6 b	27,6 a	1,5 a	107 a
Média geral	9,2	2,8	19,6	14,6	27,4	1,3	96
CV (%)	13,96	2,85	2,69	2,50	3,71	3,40	7,15
<u>Probabilidade de F</u>	1,0000	0,0422	0,3581	0,0133	0,9057	0,0001	0,0108

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste t (LSD) a 10% de probabilidade.

A produtividade de colmos por hectare (TCH) foi maior quando as plantas de cana-de-açúcar foram inoculadas com *Azospirillum brasilense*, reflexo dos resultados obtidos para altura de plantas, peso dos colmos e CME, aumentando 21,5% comparado as plantas não inoculadas (Tabela 4). Esses resultados foram semelhantes aos observados por Pereira et al. (2008) em condições controladas e utilizando mini toletes inoculados com uma mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas, que verificaram maior fito massa seca na variedade RB72454. Diversos grupos de bactérias têm demonstrado contribuição significativa na cultura da cana-de-açúcar, seja pela capacidade de fixar N ou por outros benefícios promotores de crescimento. No entanto, o melhor resultado para a produtividade de colmos por hectare (TCH) foi para a inoculação via foliar. Em trabalho realizado por Portugal et al. (2012), utilizando doses de N (0, 30, 60 e 90 kg ha<sup>-1</sup>) e inoculação via foliar com *A. brasilense* em milho de safra verão, obtiveram aumento de 14,75% quando as plantas foram inoculadas.



Contudo, estudos específicos com a bactéria *A. brasilense* na cultura da cana-de-açúcar ainda são escassos, mas assim como observado na cultura do milho, incrementos de 7 a 15% na produtividade (LANA et al., 2012), os resultados tendem a ser promissores para a cana-de-açúcar. Esses resultados podem ser maximizados com a seleção de genótipos eficientes na associação, conhecimento sobre os quais fatores bióticos e abióticos envolvidos no processo e quais alterações ocorrem nas plantas e nas bactérias (REIS, 2006).

### 6.3 Parâmetros tecnológicos e de produtividade

Os parâmetros tecnológicos não foram influenciados pela inoculação, os modos de aplicação, bem como a interação entre os fatores (Tabela 5). Esse mesmo resultado foi obtido por Oliver (2014) e Schultz (2012). Esses parâmetros são pouco influenciados pela inoculação com bactérias diazotróficas, visto que, estas bactérias são conhecidas por promoverem a síntese de substâncias promotoras do crescimento (BASHAN et al., 2004).

**Tabela 5.** Variáveis tecnológicas [pol cana, pureza do caldo, fibra, açúcar redutor, açúcar teórico recuperável (ATR)], produtividade de açúcar (TPH) de cana-de-açúcar e probabilidade de F em função da inoculação e dos modos de aplicação de *Azospirillum brasilense*. Santa Maria da Serra, SP, 2016.

Modos de aplicação	Pol	Pureza	Fibra	AR	ATR	TPH
	-----%-----				kg t <sup>-1</sup>	t ha <sup>-1</sup>
Controle	14,5 a	87,3 a	12,7 a	0,54 a	142,8 a	12,2 b
Tolete	14,2 a	87,0 a	12,9 a	0,55 a	140,1a	13,8 a
Foliar	13,9 a	86,1 a	12,6 a	0,57a	138,1a	14,9 a
Média geral	14,2	86,8	12,7	0,55	140,4	13,7
CV (%)	3,88	1,96	1,88	8,73	3,53	9,39
<u>Probabilidade de F</u>	0,4541	0,6065	0,2041	0,5554	0,4536	0,0654

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste t (LSD) a 10% de probabilidade.

A produtividade de açúcar por hectare (TPH) aumentou com a inoculação, esse aumento foi de 15,3% comparado às plantas de cana-de-açúcar não inoculadas (Tabela 5). Os resultados deste experimento reforçam a hipótese de que a

inoculação não influencia as vias de síntese de açúcares, mas a TPH (SCHULTZ, 2012), em função da maior TCH.

## 7 CONCLUSÕES

A inoculação com *Azospirillum brasilense* não afeta os teores de macronutrientes, índice de clorofila das folhas, número de colmos, número de entrenós e a qualidade tecnológica da cana-de-açúcar.

A inoculação com *Azospirillum brasiliense* aumenta a altura dos colmos em razão do aumento no comprimento médio dos entrenós, refletindo em maior produtividade de colmos e de açúcar.

A inoculação *Azospirillum brasiliense* via foliar, foi o que obteve melhor resultado.

## 8 REFERÊNCIAS

AMBROSANO, E.J.; TANAKA, R.T.; MASCARENHAS, H.A.A.; RAIJ, B. van; QUAGGIO, J.A.; CANTARELLA, H. Leguminosas e oleaginosas. In: RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI A.M.C., eds. **Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. 2.ed. Campinas, Instituto Agrônômico/Fundação, 1997. p.189-203.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 549-579, 2005.

BALDANI, J. I.; TEIXEIRA, K. R. S.; SCHWAB, S.; OLIVARES, F.; HEMERLY, A.; URQUIAGA, S.; REIS, M. V.; NOGUEIRA, E. M.; SIMÕES-ARAÚJO J. L.; VINAGRE, F.; CARVALHO, T. L. G.; FERREIRA, P. C. G.; BODDEY, R. M.; Fixação Biológica de Nitrogênio em Plantas da Família *Poaceae* (antiga *gramineae*). In: RIBEIRO, M. R.; NASCIMENTO, C. W. A.; RIBEIRO FILHO, M. R.; CANTALICE, J. R. B. (Org.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. v. 6, p.203-272.

BARROS NETO, C. R. **Efeito do nitrogênio e da inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* no rendimento de grãos de milho**. Monografia de Graduação. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 28p, 2008.

BASHAN, Y.; de-BASHAN, L. E. Plant Growth-Promoting In: HILLEL, D., In **Encyclopedia of soils in the environment**. 1.ed, Oxford, 2005.v. 1, pp. 103-115.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relations physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.521-577, 2004.

BODDEY R. M.; DÖBEREINER J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals. In: **Current Developments**. In: SUBBA RAO, N. S., ed. Biological Nitrogen Fixation. New Delhi: Oxford, 1984, p. 277-313.

BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Research**, The Hague, v. 4, p. 1-10, 1995.

BODDEY, R. M.; POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Use of <sup>15</sup>N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N<sub>2</sub> fixation to sugar cane and others grasses. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.28, p.889-895, 2001.

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

CAMARGO JUNIOR, A.S.; TONETO, JUNIOR, R. Indicadores sócio-econômicos e a cana-de-açúcar no estado de São Paulo. **Informações econômicas**.v.39, p.57-67, 2009.

CAMPO, R.J.; ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M. Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: Compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants. **Symbiosis**, 48:154-163, 2009

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L., eds. Fertilidade do solo. Viçosa, MG, **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 2007. p.375-470

CARDOSO, E. J. B. N.; NOGUUEIRA. M. A. A Rizosfera e seus Efeitos na Comunidade Microbiana e na Nutrição de Plantas. In: SILVEIRA, A.P.D., FREITAS, S.D.S. Bactérias Diazotróficas Associadas a Plantas Não-Leguminosas. In: **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**.1.ed. Campinas:Instituto Agrônômico, 2007. p.79-96.

CATÁLOGO NACIONAL DE VARIEDADES “RB” DE CANA-DE-AÇÚCAR. Disponível em<<http://canaufv.com.br/catalogo/catalogo-2010.pdf>>. **Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar**. Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. Curitiba, 2010. Acesso em 20 de julho de 2016.

CHAPOLA, R.G.; HOFFMANN, H.P.; BASSINELLO, A.L.; FERNANDES JUNIOR, A.R.; BRUGNARO, C.; ROSA, J.R.B.F.; VIEIRA, M.A.S.; SCHIAVINATO, S.R. Censo varietal de cana-de-açúcar de 2009 dos Estados de São Paulo, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. **Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil**, v. 28, n. 4, p. 34-37, 2010.

CREGAN, P.B., BERKUM, P. Genetics of nitrogen metabolism and physiological/biochemical selection for increased grain crop productivity.**Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.67, p.97-111, 1984.

COMBE, M.L.; PONS, J.L.; SESBOUE, R.; MARTIN, J.P. Electrophoretic transfer from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: a new method to characterize multilocus enzyme genotypes of *Klebsiella* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.26-30, 1994.

CONAB. V.2 - SAFRA 2016/17 - - N.2 - **Segundo levantamento** | Agosto 2016. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_08\\_18\\_12\\_03\\_30\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_2o\\_lev\\_-\\_16-17.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_08_18_12_03_30_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_16-17.pdf)> Acesso em 15 de setembro de 2016.

CONSECANA – Conselho dos Produtores de Cana-de-Açúcar, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo. **Manual de Instruções**. Piracicaba: CONSECANA, 1999. 92 p.

CONSECANA– Conselho dos Produtores de Cana-de-Açúcar, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo. Regulamento dos negócios de compra e venda de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo: **Manual de Instruções**. Piracicaba: 2006. 16p. Apostila.

CRUZ, S. C. S.; PEREIRA, F. R. S.; SANTOS, J. R.; ALBUQUERQUE, A. W. de; SILVA, E. T. da. Parcelamento da adubação nitrogenada na cultura do milho irrigado em sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 12, n. 4, p. 370-375, 2008

DÍAZ-ZORITA, M.; FERNANDEZ CANIGIA, M.V. Análisis de la producción de cereales inoculados com *Azospirillum brasilense* em la República Argentina. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) *Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.155-166.

DILLEWIJN, C. Van. Botany of sugar cane. Waltham: **Chronica Botanica**, 1952. 371p

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHS, A. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* an *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36, p. 284-297, 2002.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Review in Plant Sciences**, Boca Raton, v.22, n. 2, p.107-149, 2003.

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

DWYER, L.M., ANDERSON, A.M., MA, B.L., STEWART, D.W., TOLLENAR, M., GREGORICH, E., 1995. Quantifying the nonlinearity in chlorophyll content meter response to corn leaf nitrogen concentration. **Can. J. Plant Sci.** 75, 179–182

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA/CNPS, 2006. 306 p.

FERNANDES, A.C. **Cálculos na agroindústria da cana-de-açúcar**. Piracicaba: STAB, 2003. 240p.

FERREIRA, D.F. SISVAR: A program for statistical analysis and teaching. **Rev. Symposium** 6:36–41, 2008.

FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathológica**, Jaguariuna, SP, v. 20, n.1, p.68-74, 1994.

FRANCO A. A.; NEVES, M. C. P. Fatores limitantes à fixação biológica de nitrogênio. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (ed.). **Microbiologia do solo**. Campinas, 1992.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, n indole-acetic producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, v.154, p.145-150, 1993.

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

GALINDO, F. S. **Desempenho agrônômico do milho e do trigo em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* e doses e fontes de nitrogênio**. 2015. 150f. Dissertação (Mestrado em Sistemas de Produção) - UNESP – Câmpus de Ilha Solteira. Ilha Solteira, 2015.

GUIMARÃES. T.G.; FONTES, P.C.R.; PEREIRA, P.R.G.; ALVAREZ V., V.H.; MONNERAT, P.H. Teores de clorofila determinados por medidor portátil e sua relação com formas de nitrogênio em folhas de tomateiro cultivado em dois tipos de solo. **Bragantia**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 209-216, 1999

GUIMARÃES, S. L.; SILVA, E. M. B.; KROTH, B. E.; MOREIRA, J. C. F.; REZENDE, D.. Crescimento e desenvolvimento inicial de *Brachiaria decumbens* inoculada com *Azospirillum spp.* **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.7, N.13; 2011

GOODMAN, R. N.; KIRALY, A.; WOOD, K. E. **The biochemistry and physiology of plant disease**. Columbia: University of Missouri, 1986. 433 p.

GOMEZ-ALVAREZ, F., 1974. Correlacion entre algunos niveles de nutrientes em la hoja de la cana de azucar. **Rev. Fac. Agron.** 7(4): 5-12.

GOVINDARAJAN M.; BALANDREAU, J.; MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. **Plant and Soil**, v. 280, n. 1/2, p. 239-252, 2006.

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

JAMES, G. **Sugarcane**. 2.ed. Oxford: Blackwell, 2004. 216p.

JARRELL, W. M.; BEVERLY, R. B. The dilution effect in plant nutrition studies. **Adv. Agron.**, v. 34, p. 197-224, 1981.

KAKU, H. Histopathology of red stripe of rice. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, p. 1304-1309, 2004.

KAPPES, C.; ARF, O.; ARF, M. V.; FERREIRA, J. P.; DAL BEM, E. A.; PORTUGAL, J. R.; VILELA, R. G. Inoculação de sementes com bactéria diazotrófica e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 527-538, 2013.

LANA, M. do C.; DARTORA, J.; MARINI, D.; HANN, J. E. H. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, v.59, p.399-405, 2012.

LANA, M. C.; WOYTICHOSKI JÚNIOR, P. P.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A.; ÁVILA, M. R.; ALBRECHT, L. P. Arranjo espacial e adubação nitrogenada em cobertura na cultura do milho. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 3, p. 433-438, 2009.

LANDELL, M.G.A.; SILVA, M.A. Manual do experimentador: melhoramento da cana-de-açúcar. In: **Metodologia de Experimentação: ensaios de competição em cana-de-açúcar**. Pindorama: Instituto Agronômico, 1995. Não paginado. (Apostila de Treinamento Interno)

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

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.S.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, v. 331, n.1-2, p. 413-425, 2010. DOI: 10.1007/s11104-009-0262-0.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo – Londrina: **Embrapa Soja**, 2011. 36p. – (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n.325). Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/download/doc325.pdf>. Acessado em: Julho de 2016.

IRVINE, J. E. Relations of photosynthetic rates and leaf and canopy characters to sugar cane yield. **Crop Science**, California, v.15, p. 671-676, 1980.

MAE, T. Physiological nitrogen efficiency in rice: nitrogen utilization, photosynthesis and yield potential. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.196, p. 201-210, 1997.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 201p.



MARKWELL, J.; OSTERMAN, J.C.; MITCHELL, J.L. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. **Photosynthesis Research**, v. 46, p. 467-472, 1995.

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

MILANI, K. M. L.; MACHINESKI, O.; BALOTA, E. L. Ocorrência e isolamento de bactérias diazotróficas associadas à cana-de-açúcar. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.7, n.13; 2011 p.

MISHRA, J. S; KURCHANIA, S. P Nutrient content in mustard and associated weeds as influenced by nitrogen levels, planting geometry and weed control methods. **Indian J. Plant Physiol.**, v. 6, n. 4, p. 386-389, 2001.

MOREIRA, F.M.S; SILVA, K., NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae** 1(2): 74-99, 2010. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/896224/1/Bacteriasdiazotroficasassociativasdiversidadeecologiaepotencialdeaplicacoes.pdf>>. Acesso em 15 de março de 2016.

MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J.O. 2006. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2a ed. UFLA, Lavras, Brasil. 729 p.

MÜLLER, T.M.; BAZZANEZI, A.N.; VIDAL, V.; TUROK, J.D.N.; RODRIGUES, J.D.; SANDINI, I.E. Inoculação de *Azospirillum brasilense* no Tratamento de Sementes e Sulco de Semeadura na Cultura do Milho. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 29, Águas de Lindóia-SP. **Anais...** Campinas: IAC/ABMS, 2012. p.1665-1671.

MUTHUKUMARASAMY, R.; GOVINDARAJAN, M.; VADIVELU, M.; REVATHI, G. N fertilizer saving by inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. in micropropagated sugarcane plants. **Microbiological Research**, v. 161, n. 3, 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.

MUTTON, M.J.R. **Efeitos da queima, manejo e armazenamento sobre as características tecnológicas dos colmos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 1984. 95f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Colonização do tecido vascular por *Herbaspirillum* spp. em sorgo e cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26., 1993, Aracaju. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 18, p. 313, 1993. Resumo. Suplemento.

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

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.284, n.1-2, p.23-32, 2006.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.242, p.205–215, 2002.

OLIVER, R. Interação entre bactérias diazotróficas e doses de n-fertilizante na cultura da cana-de-açúcar. 2014. 61f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração em Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

ORTOLANI FILHO, J. **Nutrição e adubação de cana-de-açúcar no Brasil**. Piracicaba: Instituto do Açúcar e Alcool/PLANALSUCAR, 1983. 389 p.

PEREIRA, W.; HIPÓLITO, G. S.; SANTOS, C. L. R.; ANTÔNIO, C. S.; MOREIRA, L. L.Q.; CARNEIRO, J. B.; REIS, V. M. Acúmulo de biomassa em plantas de cana-de-açúcar variedade RB7245 inoculadas bactérias diazotróficas. In: FERTIBIO 2008. **Anais...** Londrina: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo; Embrapa Soja; Universidade Estadual de Londrina, 2008. CD ROM.

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 Agrônômica**, v. 44, n. 2, p. 363-370, abr-jun, 2013.

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

PERIN, L. **Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica***. 2007. 103 f. Tese (Doutorado em Agronomia Ciência do Solo) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2007.

PIÑERO, D.; MARTÍNEZ, E.; SELANDER, R.K. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.2825-2832, 1988.

POLIDORO, J. C. **O molibdênio na Nutrição Nitrogenada e na Fixação Biológica de Nitrogênio Atmosférico Associada à cultura de cana de açúcar**. 2001. 184f. Tese

(Doutorado em Agronomia Ciência do solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.

PORTUGAL, J.R.; ARF, O.; LONGUI, W.V. et al. Inoculação com *Azospirillum brasilense* Via Foliar Associada à Doses de Nitrogênio em Cobertura na Cultura do Milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 29, 2012, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2012. p. 1413-1419

QUADROS, P. D. **Inoculação de *Azospirillum* spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul.** 2009. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais.** Campinas Instituto Agrônomo, 2001. 285p.

REIHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasse: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 139-144, 1998.

REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; PEREIRA, W.; SILVA, M. F. da; HIPÓLITO, G.; OLIVEIRA, R. P.; MORAES, R. F. de; SCHULTZ, J. M.; N.; BAPTISTA, R. B. **Eficiência agrônômica do inoculante de cana-de-açúcar aplicado em três ensaios conduzidos no Estado do Rio de Janeiro durante o primeiro ano de cultivo.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 22 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 45).

REIS JUNIOR, F. B. dos; MACHADO, C. T. de T.; MACHADO, A. T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 32, n. 3, p. 1139-1146, 2008.

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

REIS JÚNIOR, F. B., SILVA, L. G. da, REIS, V. M., DÖBEREINER, J., Ocorrência de Bactérias Diazotróficas em diferentes Genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.5, p. 985-994, 2000b.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; URQUIAGA, S. **Fixação Biológica de nitrogênio associativa: um futuro promissor para cana-de-açúcar e outras gramíneas.** Boletim Informativo da SBCS, 2009a.p. 28-29.

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, 2009b. 4p. (Circular Técnica 30).

REIS, V. M.; TEIXEIRA, R. dos S. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. cap. 6, p. 153-174.

REIS, M. R. Inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio para aplicação em gramíneas. In: Reunião Brasileira De Fertilidade Do Solo e Nutrição De Plantas, 27., Reunião Brasileira Sobre Micorrizas, 11., Simpósio Brasileiro De Microbiologia Do Solo, 9., Reunião Brasileira de Biologia do Solo, 6., 2006, Bonito, MS. **A busca das raízes. anais...** Bonito: SBM; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. 1 CD ROM. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 82).

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L. Vias de penetração e infecção de plantas por bactérias. EMBRAPA Agrobiologia, 2006. 34 p. (Embrapa Agrobiologia Documentos, 216).

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; SILVA, M. F.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M. AND URQUIAGA, S. Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture. In: CHIMPHANGO, S. B. M.; VALENTINE, A. J.; ELMERICH, C.; NEWTON, W. E. (Eds.). **Proceedings of the 15th International Nitrogen Fixation Congress and the 12<sup>th</sup> International Conference of the African Association for Biological Nitrogen Fixation**. Series: Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture , Vol. 42, 394 p. Dakora, F.D.; 2008.

REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S. Fixação biológica de nitrogênio - estado de arte. In: AQUINO, A.M.; ASSIS, R.L. **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2005. p. 151- 180.

REPKE, R. A.; CRUZ, S. J. S.; SILVA, C. J.; FIGUEIREDO, P. G.; BICUDO, S. J. Eficiência da *Azospirillum brasilense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 12, n. 3, p. 214-226, 2013.

SAMPAIO, E. V. S. B.; SALCEDO, I. H.; BETTANY, J. Dinâmica de nutrientes em cana-de-açúcar. I – Eficiência na utilização de uréia (15N) em aplicação única ou parcelada. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 19, n. 8, p. 943-949, 1984.

SCHULTZ, N. **Fixação Biológica de nitrogênio associada à cultura de cana de açúcar: eficiência e contribuição da inoculação com bactérias diazotróficas**. 2012. 119f. Tese (Doutorado em Agronomia Ciência do solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

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

SEVILLA, M.; OLIVEIRA, A. de; BALDANI, I.; KENNEDY, C. Contributions of the bacterial endophyte *Acetobacter diazotrophicus* to sugarcane nutrition: A preliminary study. **Symbiosis**, v. 25, n. 1/3, p. 181-191, 1998.

SILVA, L.L.G.G, ALVES, G.C., RIBEIRO, J.R.A., URQUIAGA, S., SOUTO, S.M., FIGUEIREDO, M.V.B., BURITY, H.A. Fixação biológica de nitrogênio em pastagens com diferentes intensidades de corte. **Arch. Zootec.**v.59, p. 21-30. 2010

SPIRONELLO, A.; RAIJ, B.van; PENATTI, C.P.; CANTARELLA, H.; MORELLI, J.L.; ORLANDO FILHO, J.; LANDELL, M.G.A.; ROSSETTO, R. Cana-de-açúcar. In: RAIJ, B.van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C., eds. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. . 2.ed. Campinas, Instituto Agrônomo/Fundação IAC, 1996. p.237-239. (**Boletim Técnico**, 100)

SOBRAL, A.F.; WEBER, H. Nutrição mineral de cana-de-açúcar (micronutrientes). In: ORLANDO FILHO, J. (Ed.). **Nutrição e adubação da cana-de-açúcar no Brasil**.Piracicaba: IAA/PLANALSUCAR, P. 103-122, 1983

SOUZA, A. P.; GASPAR, M.; SILVA, E. A.; ULIAN, E. C.; WACLAWOSKY, A. J.; NISHIYAMA JR., M. Y.; SANTOS, R. V.; TEIXEIRA, M. M.; SOUZA, G. M.; BUCKERIDGE, M. S. Elevated CO<sub>2</sub> increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. **Plant, Cell & Environment**, v.31, p.1116-1127, 2008.

STANCHEVA, I.; DIMITROV, I.; KALOYANOVA, N.; DIMITRINOVA, A.; ANGELOV, M. Effects of inoculations with *Azospirillum brasilense* on photosynthetic enzyme activities and grain yield in maize. **Agronomie**, v.12,p.319-324, 1992.

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

TOKESHI, H. Cana-de-açúcar. In: FERREIRA, M. E.; Cruz, M. C. P. **Simpósio sobre Micronutrientes na Agricultura**, 1., POTAFOS/CNPq, p. 485-499, 1991.

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

URQUIAGA, S.; JANTALIA, C. P.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Contribuição da FBN na produtividade dos sistemas agrícolas na América Latina. Em: Processo Biológicos no sistema Solo-Planta. AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. (Ed), **Embrapa Agrobiologia**, Brasília, DF, 2005. 368p.

VITORINO,R;VITORINO, R. ; GARCIA, J. C.; AZANIA, C. A. ; SILVA, D. M.; BELUCI, L. R. Inoculação de bactérias diazotróficas no desenvolvimento inicial de cana-de-açúcar, variedade RB867515. 6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, 2012, Jaguariúna, SP. **Anais...** Disponível

em:<[http://www.cnpma.embrapa.br/eventos/2012/ciic/cd\\_anais/Artigos/RE12115.pdf](http://www.cnpma.embrapa.br/eventos/2012/ciic/cd_anais/Artigos/RE12115.pdf)>.  
Acesso em 20 de maio de 2016.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. FAQ. Disponível em:  
<<http://www.unica.com.br/faq/>>. Acesso em: mar. 2016.

ZILLI, J.E.; RIBEIRO, K.G.; CAMPO, R.J.; HUNGRIA, M. Influence of fungicide seed treatment on soybean nodulation and grain yield. R. **Bras. Ci. Solo**, 33:917-923, 2009.