

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**INTERAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E DOSES DE
N-FERTILIZANTE NA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR**

RODRIGO OLIVER

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

BOTUCATU-SP
Agosto – 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**INTERAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E DOSES DE
N-FERTILIZANTE NA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR**

RODRIGO OLIVER

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Almeida Silva

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

BOTUCATU-SP
Agosto – 2014

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

048i Oliver, Rodrigo, 1987-
Interação entre bactérias diazotróficas e doses de N-
fertilizante na cultura da cana-de-açúcar / Rodrigo Oliver.
- Botucatu : [s.n.], 2014
x, 61 f. : fots. color., grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2014
Orientador: Marcelo de Almeida Silva
Inclui bibliografia

1. Cana-de-açúcar - Inoculação. 2. Nitrogênio - Fixação.
3. Microorganismos fixadores de nitrogênio. I. Silva, Mar-
celo de Almeida. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de
Ciências Agrônômicas. III. Título.

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "INTERAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E DOSES DE N-
FERTILIZANTE NA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR"

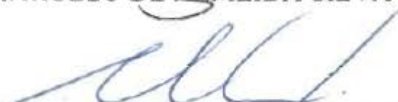
ALUNO: RODRIGO OLIVER

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO DE ALMEIDA SILVA

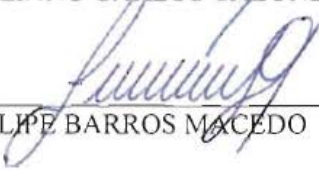
APROVADO PELA COMISSÃO EXAMINADORA:



PROF. DR. MARCELO DE ALMEIDA SILVA



PROF. DR. JULIANO CARLOS CALONEGO



PROF. DR. FELIPE BARROS MACEDO

Data da Realização: 04 de agosto de 2014.

À Deus pela força espiritual, para que eu conseguisse concluir este trabalho.

Aos meus pais, Atair Aparecido Oliver e Ida Genebra Martins Oliver, pelo apoio, amor e educação que me deram.

À Cecília Faioli Leda, pelo carinho, incentivo, companheirismo e paciência nos momentos difíceis.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Marcelo de Almeida Silva, pelo apoio, amizade e orientação.

Aos amigos: Renata Passos Pincelli, Marcel Tomás Arantes, Marcela Cristina Brunelli, Andressa Freitas de Lima Rhein, Lucas Almeida de Holanda e Breno Kennedy Lima Bezerra.

Ao estagiário Bruno Henrique Fernandes, pela amizade e grande apoio na instalação e condução deste estudo.

Ao Grupo Raízen – Unidade Barra, ao Técnico Agrícola Sebastião Santos Ribeiro, Adauto Aparecido Biega e aos auxiliares de campo pela cessão das áreas agrícolas, apoio e contribuição para o desenvolvimento deste estudo.

À Stoller do Brasil pelo apoio financeiro.

Ao CNPq, pela bolsa de estudo.

E a todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
1 RESUMO.....	01
2 SUMMARY.....	03
3 INTRODUÇÃO.....	05
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	07
4.1 A cultura da cana-de-açúcar.....	07
4.2 Adubação nitrogenada em cana-de-açúcar.....	08
4.3 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)	10
4.4 Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar.....	12
4.5 Inoculante para cana-de-açúcar.....	13
4.6 Interação adubação nitrogenada e FBN.....	15
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5.1 Localização e caracterização climática da área experimental.....	18
5.2 Caracterização do solo.....	19
5.3 Caracterização da variedade.....	20
5.4 Delineamento experimental e tratamentos.....	21
5.5 Aplicação do inoculante.....	22
5.6 Avaliações.....	23
5.6.1 Contagem de Falhas.....	23
5.6.2 Diagnose foliar.....	23
5.6.3 Avaliações fisiológicas.....	24
5.6.3.1 Estimativa do conteúdo de clorofila via índice SPAD.....	24
5.6.3.2 Conteúdo de clorofila.....	24
5.6.4 Número de colmos por metro.....	25
5.6.5 Biometria.....	25
5.6.6 Atributos tecnológicos.....	26
5.6.7 Produtividade de colmo e açúcar.....	26
5.6.8 Acúmulo de fitomassa seca.....	26
5.6.9 Acúmulo de nitrogênio.....	27
5.6.10 Eficiência de uso do N-fertilizante.....	27
5.6.11 Análise dos resultados.....	28

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
6.1 Avaliação de falhas.....	29
6.2 Índice SPAD, conteúdo de clorofila total e avaliação nutricional.....	29
6.3 Perfilhamento e biometria.....	32
6.4 Produtividade e acúmulo de fitomassa seca.....	33
6.5 Teor e acúmulo de nitrogênio.....	40
6.6 Atributos tecnológicos.....	43
6.7 Eficiência do uso de N-fertilizante (EUN)	44
7 CONCLUSÕES.....	47
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Características químicas e granulométricas do solo da área experimental. Fazenda Bosque – Grupo RAIZEN, Usina da Barra. Igaraçu do Tietê, SP, 2011.....	20
Tabela 2. Tratamentos, forma de aplicação e doses de aplicação do inoculante associado a doses de N, Igaraçu do Tietê – SP.....	21
Tabela 3. Análise de variância do teor de N, índice SPAD e conteúdo de clorofila total (CC total) da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igaraçu do Tietê, SP, 2011-2012.....	30
Tabela 4. Teor de N, índice SPAD e conteúdo de clorofila total (CC total) da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igaraçu do Tietê, SP, 2011-2012.....	31
Tabela 5. Análise de variância do número de perfilhos, comprimento e diâmetro do colmo da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igaraçu do Tietê, SP, 2011-2012.....	32
Tabela 6. Número de perfilhos, comprimento e diâmetro do colmo da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igaraçu do Tietê, SP, 2011-2012.....	33
Tabela 7. Análise de variância da produtividade de colmos, em megagrama de cana por hectare (MCH) e produtividade de açúcar, em megagrama de pol por hectare (MPH) da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igaraçu do Tietê, SP, 2011-2012.....	33

Tabela 8. Análise de variância do acúmulo de matéria seca por componente da parte aérea da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igaraçu do Tietê, SP, 2011-2012.....	37
Tabela 9. Acúmulo de matéria seca por componente da parte aérea da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igaraçu do Tietê, SP, 2011-2012.....	38
Tabela 10. Análise de variância do teor de nitrogênio por componente da parte aérea da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igaraçu do Tietê, SP, 2011-2012.....	40
Tabela 11. Análise de variância do acúmulo de nitrogênio por componente da parte aérea da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igaraçu do Tietê, SP, 2011-2012.....	41
Tabela 12. Acúmulo de nitrogênio por componente da parte aérea da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igaraçu do Tietê, SP, 2011-2012.....	41
Tabela 13. Açúcar teórico recuperável (ATR), pureza aparente do caldo (Pureza), teor de sólidos solúveis (Brix), teor de fibra industrial (Fibra) e o teor de sacarose (Pol cana) da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igaraçu do Tietê, SP, 2011-2012.....	44
Tabela 14. Fator parcial de produtividade (FPP), Eficiência agrônômica (EA), Eficiência de recuperação (ER) e a Eficiência fisiológica (EF) da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igaraçu do Tietê, SP, 2011-2012.....	45

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Precipitação (mm mês ⁻¹), temperaturas máxima e mínima (°C) e umidade relativa média (%) registrada na Estação Meteorológica da Fazenda Bosque, Igaraçu do Tietê (SP) entre novembro de 2011 a novembro de 2012.....	19
Figura 2. Implemento de aplicação de nematicida e inseticida utilizado na aplicação injetada do inoculante após o corte.....	23
Figura 3. Pulverizador costal utilizado na aplicação foliar 60 dias após início das brotações.....	23
Figura 4. Produtividade de colmos, em megagrama de cana por hectare (MCH) da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de nitrogênio associado ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igaraçu do Tietê, SP, 2011-2012.**: significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. R ² : coeficiente de regressão.....	36
Figura 5. Produtividade de açúcar, em megagrama de pol por hectare (MPH) da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igaraçu do Tietê, SP, 2011-2012.**: significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. R ² : coeficiente de regressão.....	36
Figura 6. Acúmulo de matéria seca no colmo da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igaraçu do Tietê, SP, 2011-2012. **: significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. R ² : coeficiente de regressão.....	39
Figura 7. Acúmulo de matéria seca total da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igaraçu do Tietê, SP, 2011-2012. *: significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. R ² : coeficiente de regressão.....	39
Figura 8. Acúmulo de nitrogênio no colmo da cana-de-açúcar, variedade	

RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igarapu do Tietê, SP, 2011-2012. **: significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. R^2 : coeficiente de regressão..... 42

Figura 9. Acúmulo de nitrogênio total da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igarapu do Tietê, SP, 2011-2012. **: significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. R^2 : coeficiente de regressão..... 43

1 RESUMO

A cana-de-açúcar é uma cultura altamente extrativa em nitrogênio. Além do alto custo dos fertilizantes nitrogenados, esses apresentam baixo aproveitamento agronômico causando grandes impactos ao ambiente. Uma alternativa econômica e ambientalmente vantajosa para reduzir o uso da adubação nitrogenada seria o aumento da fixação biológica do nitrogênio pela inoculação com bactérias diazotróficas. Diante desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito de inoculante, formado por bactérias diazotróficas, associado a diferentes doses de N-fertilizante, aplicados em duas maneiras, no aumento da eficiência de utilização de nitrogênio, com possível elevação da produtividade de cana-de-açúcar com redução de fonte de N mineral. O ensaio de campo foi desenvolvido na região do município de Igarapu do Tietê/SP durante o ano agrícola de 2011/2012. Foi utilizada a variedade RB92579, no ciclo de cana-soca de primeiro corte, em ambiente de produção classificado como A. Os tratamentos foram constituídos por diferentes doses de N (0, 60, 90 e 120 kg ha⁻¹) associadas ou não a uma mistura de cinco espécies de bactérias diazotróficas (inoculante) em dois métodos de

inoculação (aplicação injetada logo após o corte das touceiras e aplicação foliar após 60 dias do corte das touceiras). O inoculante utilizado foi uma mistura de estirpes de cinco espécies de bactérias isoladas da cana-de-açúcar (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*). As doses de nitrogênio foram aplicadas aos 60 dias após a brotação da cana-soca. O delineamento estatístico foi em blocos ao acaso, em esquema fatorial 4x3, constituindo-se dos fatores doses de nitrogênio (N) e manejos da inoculação (M) totalizando 12 tratamentos, com quatro repetições. Foram determinados aos 120 dias após início das brotações o número de falhas e o teor de nitrogênio nas folhas. Na ocasião da colheita foram realizadas avaliações fisiológicas (índice SPAD e conteúdo de clorofila), contagem de perfilhos, biometria (comprimento e diâmetro de colmos), análises tecnológicas (açúcar teórico recuperável, pureza aparente do caldo, teor de sólidos solúveis, teor de fibra industrial, teor de sacarose), produtividade de colmos e açúcar, acúmulo de fitomassa seca e nitrogênio e a eficiência do uso do N-fertilizante. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com comparações entre médias dos tratamentos pelo teste F seguido da aplicação do teste Tukey a 5% de probabilidade. O uso do Inoculante não afetou o teor de nitrogênio nas folhas, conteúdo de clorofila, número de perfilhos, diâmetro dos colmos e nenhum dos atributos tecnológicos avaliados. O uso do inoculante associado as doses de 60 e 90 kg N ha⁻¹ promoveu incrementos na produtividade de colmos, acúmulo de matéria seca e nitrogênio, porém a associação do inoculante a dose de 120 kg N ha⁻¹ provocou redução destes parâmetros. O inoculante aumentou a eficiência de utilização do N-fertilizante sob as doses de 60 e 90 kg ha⁻¹ de N, mas sob 120 kg N ha⁻¹ as formas de inoculação prejudicaram a eficiência do uso de Nitrogênio.

Palavras-Chave: *Saccharum* spp., fixação biológica, inoculante, nitrogênio.

INTERACTION BETWEEN DIAZOTROPHIC BACTERIA AND N-FERTILIZER DOSES ON THE SUGARCANE CROP. Botucatu, 2014. 61p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: RODRIGO OLIVER

Adviser: MARCELO DE ALMEIDA SILVA

2 SUMMARY

The sugarcane is a highly extractive culture in nitrogen. Besides the high cost of nitrogen fertilizers, these have low agronomic performance causing major environmental impacts. An economical alternative and environmentally advantageous to reduce the use of nitrogen fertilizer would be to increase biological nitrogen fixation by inoculation with diazotrophic bacteria. In this context, the present study aimed to verify the effect of inoculant formed by diazotrophic bacteria associated with different N-fertilizer doses applied in two ways, in increasing the efficiency of nitrogen use, with possible increase in productivity sugarcane with reduced mineral N source. The field experiment was conducted in the city of Igaraçu do Tietê/SP during the crop season 2011/2012. The variety RB92579 was used in the first ratoon cycle in a production environment classified as A. The treatments consisted of different N doses (0, 60, 90 and 120 kg ha⁻¹) associated or not with a mixed of five diazotrophic bacteria species (inoculant) in two inoculation methods (injected immediately after cutting the clumps and foliar application 60 days after cutting the clumps). The inoculum used was a strains mixed of five isolated bacteria species from sugarcane (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*). The Nitrogen doses were applied at 60 days after sprouting sugarcane ratoon. The experimental design was a randomized block in a 4x3 factorial scheme, constituted by nitrogen doses (N) and management of inoculation (M) totaling 12 treatments with four replicates. The number of failures and the nitrogen content in the leaves were determined at 120 days after initiation of shoots. At harvest physiological assessments (SPAD index and chlorophyll content), number of tillers, biometrics (length and diameter of stalk), technological analysis (theoretical recoverable sugar, apparent purity of juice, soluble solids content, industrial fiber content, sucrose content), productivity of stalk and sugar, accumulation dry matter and nitrogen and N-fertilizer use efficiency. The data were subjected to analysis of

variance in comparisons between treatment means using the F test followed by the application of the Tukey test application at 5 % probability. The inoculant use did not affect the nitrogen content in leaves, chlorophyll content, number of tillers, diameter of stalk and none of the technological attributes. The use of inoculum associated dose of 60 and 90 kg N ha⁻¹ improved the productivity of stalk, accumulation of dry matter and nitrogen, however the association of inoculum dose of 120 kg N ha⁻¹ caused a reduction of these parameters. The inoculant increased N-fertilizer use efficiency in doses of 60 and 90 kg ha⁻¹ N, but under 120 kg N ha⁻¹ inoculation ways decreased the N use efficiency.

Key words: *Saccharum* spp., biological fixation, inoculant, nitrogen.

3 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com área plantada em quase 9 milhões de hectares e estimativa de colheita de 659,85 milhões de megagramas na safra 2013/2014 (CONAB, 2013). Do total dessa produção cerca de 355,61 milhões de megagramas serão esmagadas para a produção de 27,66 bilhões de litros de etanol. No entanto, qualquer biocombustível para ter uma produção economicamente viável, necessita de tecnologias que garantam a sua produção com balanços energéticos positivos, isto é produzir pelo menos três vezes mais energia do que a gasta para a produção e processamento dos materiais vegetais a serem utilizados (CAVALCANTE et al., 2011).

A cana-de-açúcar é uma cultura altamente extrativa em nitrogênio. A cana-planta, com produtividade média de 100 Mg ha⁻¹ de colmos, acumula entre 150 a 200 kg ha⁻¹ de N, e no caso de cana soca este valor é de 120 a 160 kg ha⁻¹ de N (RESENDE, 2000; XAVIER, 2002). Além do alto custo dos fertilizantes nitrogenados, esses apresentam baixa eficiência de utilização (HUNGRIA, 2011 TRIVELIN; FRANCO, 2011).

Diante do alto custo da energia fóssil utilizada na produção dos fertilizantes nitrogenados e da necessidade de fertilizantes nitrogenados para a produção agrícola, uma alternativa para reduzir o custo com adubação nitrogenada seria o aumento da fixação biológica do nitrogênio (FBN) pela inoculação com bactérias diazotróficas. Bactérias diazotróficas podem associar-se à cana-de-açúcar naturalmente ou podem ser inoculadas para promover efeitos benéficos (SILVA et al., 2009). Estudos indicaram que a FBN pode contribuir em até 60% de todo o N acumulado pelas plantas (BODDEY et al., 2001; XAVIER, 2002). Segundo Reis et al. (2008), estima-se que a FBN associada ao cultivo da cana-de-açúcar no Brasil pode gerar economia de N-fertilizante equivalente a 735 milhões de reais. No entanto, a FBN em cana-de-açúcar é influenciada por vários fatores, entre eles o nível de N-fertilizante aplicado. O nitrogênio é o elemento que tem o maior efeito sobre a FBN, de modo que a fixação só ocorre em situações de deficiência de N, porém, é necessário que haja disponibilidade de N para o crescimento e desenvolvimento da planta, até o início da fixação de N_2 (FRANCO; NEVES, 1992).

A possibilidade de se substituir parte do fertilizante nitrogenado pela fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas deve ser considerada, pois esta é econômica e ambientalmente vantajosa (REIS JUNIOR et al., 2000b).

Diante desse contexto, o objetivo desta pesquisa foi verificar o efeito de inoculante, formado por bactérias diazotróficas, associado a doses de N-fertilizante, aplicado em duas maneiras, no aumento da eficiência de utilização de nitrogênio, com possível elevação da produtividade de cana-de-açúcar com redução de fonte de N mineral.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) tem sua origem principalmente nas regiões da Indonésia e Nova Guiné. É uma planta monocotiledônea, alógama e semi-perene, pertencente à família *Poaceae*, tribo *Andropogoneae* e gênero *Saccharum*. Atualmente, os plantios comerciais são constituídos por híbridos interespecíficos provenientes do cruzamento entre as espécies: *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. barberi*, *S. robustum* e *S. edule* (LANDELL et al., 2005; GUPTA et al., 2010).

Essa cultura é de grande importância econômica para o agronegócio brasileiro e vem sendo explorada desde a época do Brasil colônia, quando os portugueses trouxeram as primeiras mudas da Ilha da Madeira, ganhando terras brasileiras em 1502, fazendo parte da história nacional, onde a mão-de-obra escrava movimentava os engenhos da época (FIORAVANTI, 2000; MOZAMBANI et al., 2006).

Após a década de 70 (século XX), a crise do petróleo fez com que a produção de etanol de cana-de-açúcar no Brasil crescesse para a utilização direta em

motores a explosão (hidratado) ou em mistura com a gasolina (anidro). Desde então, a cana-de-açúcar destacou-se como matéria-prima, cuja fração principal destinava-se, anteriormente, à extração do açúcar (MOZAMBANI et al., 2006).

O mundo está mais consciente em relação à redução de impactos ambientais, e uma das alternativas de amenização deste problema é a utilização dos biocombustíveis e da implementação de etanol à gasolina que já vem sendo utilizado por vários países além do Brasil, fazendo com que as áreas de cultivo de cana-de-açúcar aumentassem de forma expressiva (BOA SORTE, 2009).

Atualmente a cana-de-açúcar é uma das principais culturas no panorama agrícola brasileiro (LIMA et al., 2011), sendo caracterizada como uma das melhores fontes de energia renovável, com perspectivas extremamente favoráveis tanto no mercado de biocombustíveis, produção de açúcar, como também na co-geração de energia (ARANTES, 2012). Essa atividade representa 2% do PIB nacional e fatura anualmente mais de US\$ 28,2 bilhões, gerando aproximadamente um milhão de empregos diretos (SOUZA; MACEDO, 2010).

O Brasil ocupa uma posição privilegiada, sendo atualmente o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com uma área plantada em quase 9 milhões de hectares, e uma estimativa da produção para a safra 2013/2014 de 659,85 milhões de megagramas. A produção total de açúcar está estimada em 38,81 milhões de toneladas, já o álcool os números indicam um volume de produção da ordem de 27,66 bilhões de litros. A média nacional de produtividade na safra 2013/14 ficara em torno de 74.891 kg ha⁻¹, um crescimento de 7,9% em relação a média geral da safra passada. Esse incremento na produtividade ocorreu principalmente na região Centro-Sul devido as boas condições climáticas neste ano safra, além do maior investimento em manutenção dos canaviais e aumento de área de renovação e expansão (CONAB, 2013).

4.2 Adubação nitrogenada em cana-de-açúcar

O nitrogênio é o macronutriente mais exigido pelas plantas, estando presente na molécula da clorofila, nos aminoácidos e ácidos nucléicos precursores das proteínas, participando direta ou indiretamente de diversos processos bioquímicos e enzimático, sendo assim fator determinante ao pleno desenvolvimento e produção das plantas (MALAVOLTA, 2006; CANTARELLA, 2007; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Em cana-de-açúcar a adubação nitrogenada está relacionada à brotação e perfilhamento do canavial, possuindo papel fundamental no desenvolvimento e potencial produtivo da cultura (CASAGRANDE, 1991; KORNDÖRFER; MARTINS, 1992). A carência desse elemento afeta todo o processo fotossintético e de assimilação de CO₂, tornando deficiente a produção de esqueletos carbônicos, resultando na redução do potencial produtivo e da longevidade do canavial (MALAVOLTA et al., 1997). Sob excesso de nitrogênio, há acúmulo desse elemento no colmo, consequentemente redução da qualidade do caldo, atrasando a maturação (CARNAÚBA, 1990).

A cana-de-açúcar é uma cultura altamente extrativa em nitrogênio (URQUIAGA et al., 2003). A cana-planta, com produtividade de 100 Mg ha⁻¹ de colmos, acumula entre 140 e 200 kg ha⁻¹ de N, e no caso da cana-soca este valor é de 120 a 180 kg ha⁻¹ de N (ORLANDO FILHO et al., 1980; RESENDE, 2000; XAVIER, 2002; SARTORI, 2010). Na maior parte das lavouras brasileiras as quantidades de fertilizantes nitrogenados adicionados anualmente ficam em torno de 30 a 60 kg ha⁻¹ em cana-planta e nas soqueiras esses valores dificilmente ultrapassam 100 kg ha⁻¹ (URQUIAGA et al., 2003; CANTARELLA et al., 2008; PRADO JUNIOR, 2008). Segundo Schultz et al. (2010), aproximadamente 70% da quantidade de N extraído pela parte aérea da cana-de-açúcar é exportado no colmo para as usinas.

Entretanto, a questão não esclarecida na cultura da cana-de-açúcar se refere à baixa resposta da cana-planta à adubação nitrogenada, apresentando respostas bem heterogêneas, e relativamente homogêneas para cana-soca (CARNAÚBA, 1990). Segundo AZEREDO et al. (1986), em 80% dos experimentos desenvolvidos em diferentes regiões canavieiras do Brasil não foram verificadas respostas a adubação nitrogenada em cana-planta.

Existem vários fatores para explicar a baixa resposta ao nitrogênio em cana-planta, como a mineralização da matéria orgânica do solo e dos restos culturais da cultura durante o revolvimento do solo na reforma do canavial (CANTARELLA et al., 2007) e o sistema radicular mais vigoroso comparado ao das soqueiras (TRIVELIN, 2000). Além dos fatores relacionados, nas últimas décadas, grande importância tem sido dada a fixação biológica do nitrogênio pela cana-de-açúcar (BODDEY et al., 2003; CANTARELLA, 2007).

A fabricação dos fertilizantes nitrogenados iniciou-se na primeira década do século XX, quando Fritz Haber e Carl Bosch descobriram o processo que

transforma N_2 atmosférico em amônia (HUNGRIA; STACEY, 1997). O custo econômico desse processo é elevado e, resultante principalmente, da necessidade de gasto de fontes de petróleo, ou seja, energia não renovável. Calcula-se que, para a síntese de uma tonelada de amônia, sejam necessários seis barris de petróleo (HUNGRIA et al., 2001). Além do alto custo da fabricação dos fertilizantes nitrogenados, o Brasil ainda é dependente das importações, que atualmente são responsáveis por 73% do N utilizado (HUNGRIA, 2011).

Outro agravante na utilização de fertilizantes nitrogenados reside na baixa eficiência de sua utilização pelas plantas, geralmente menor 50% (TRIVELIN; FRANCO, 2011), no caso da cana-de-açúcar a contribuição dos fertilizantes nitrogenados em relação ao N-total acumulado varia de 10% a 16% (GAVA et al., 2003; FRANCO et al., 2008). No entanto, sua utilização não deve ser desconsiderada por sua contribuição fundamental nos estádios iniciais de crescimento, tanto no ciclo agrícola de cana-planta como no de cana-soca (FRANCO et al. 2008). Segundo FRANCO et al. (2010), a contribuição do N proveniente do fertilizante nos estádios iniciais de crescimento da soqueira de cana-de-açúcar foi na ordem de 70% do N-total, decrescendo nos estádios posteriores da cultura. Por isso deve-se levar em consideração que o uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados resulta em poluição ambiental, pois a lixiviação do N e o escoamento desse nutriente pela superfície do solo resultam em acúmulo de formas nitrogenadas nas águas dos rios, lagos e lençóis de água subterrâneos, podendo atingir níveis tóxicos a peixes e ao homem (HUNGRIA et al., 2001).

4.3 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)

Alternativas oferecidas pela própria natureza apresentam potencial para aumento de produtividade de forma sustentável. Uma dessas alternativas é a aplicação de bactérias capazes de promover o crescimento vegetal através de mecanismos como a fixação biológica de nitrogênio (FBN) e a produção de fitohormônios, estimulando, por exemplo, o desenvolvimento de raízes, acúmulo de massa seca e a germinação de sementes (HUNGRIA, 2011; MOREIRA et al., 2010; PEREIRA, 2011). Porém, o mecanismo mais estudado é a fixação biológica de nitrogênio (BALDANI et al., 2002; BODDEY et al., 2003).

A FBN é um processo essencial para transformar o N_2 atmosférico, que não pode ser utilizada pela maioria dos microrganismos e pelas plantas, na forma

inorgânica combinada NH_3 (amônia), e a partir daí, em formas reativas orgânicas e inorgânicas vitais em sistemas biológicos (CANTARELLA, 2007). A reação de redução do N_2 a NH_3 é realizada por muitos grupos de bactérias e alguns organismos do grupo *Archaea* que possuem a enzima nitrogenase e são conhecidos com fixadores de N_2 ou diazotróficos (CANTARELLA, 2007; PERIN, 2007).

Esses organismos se associam a diversas espécies de plantas em diferentes graus de especificidade levando à classificação como bactérias diazotróficas: de vida livre, associativas e simbióticas (HUNGRIA et al., 2007; PERIN, 2007). O caso de maior eficiência é a simbiose de *Bradyrhizobium* com soja (*Glycine max* (L.) Merr.) (ARAÚJO, 2008). Neste processo são formadas estruturas especializadas, os nódulos, onde as bactérias possuem condições para expressar sua máxima eficiência, onde a simbiose ocorre pelo fornecimento de nutrientes pela planta, enquanto em troca a bactéria fornece o nitrogênio (MARIN et al., 1999; PERIN, 2007). Segundo Hungria et al. (2007), a soja dispensa totalmente a adubação nitrogenada, uma vez que, em condições normais de cultivo, a FBN é capaz de suprir as necessidades de N da cultura com taxas de fixação de N superiores a $300 \text{ kg de N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$. Estima-se que a contribuição de nitrogênio fixado biologicamente seja de 139 e 170 milhões de Mg de N ano^{-1} , enquanto que a fixação química contribui com 65 milhões de Mg de N ano^{-1} de modo que a substituição de fertilizantes químicos pela inoculação com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* na cultura da soja representa uma economia de cerca de R\$ 7,46 bilhões para agricultura brasileira (MOREIRA, 2008; CAVALCANTE et al., 2011).

Ao contrário dos organismos simbióticos, as bactérias associativas excretam somente uma parte do nitrogênio fixado diretamente para a planta associada; posteriormente, a mineralização das bactérias pode contribuir com aportes adicionais de nitrogênio para as plantas, contudo, é importante salientar que o processo de fixação biológica por essas bactérias consegue suprir apenas parcialmente as necessidades das plantas (HUNGRIA, 2011). Embora possam estabelecer associações com dicotiledôneas, às associações mais comuns ocorrem com plantas da família *Poaceae* (Gramíneas), entre elas a cana-de-açúcar (CANTARELLA, 2007). Em relação às bactérias diazotróficas de vida livre, somente há um caso, de que um diazotrofo de vida livre, *Azotobacter paspali*, contribua para a acumulação de nitrogênio na planta (MARIN et al., 1999).

4.4 Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar

As evidências da fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar vêm do fato das lavouras brasileiras de cana-de-açúcar produzirem, em cultivos contínuos, grandes quantidades de colmo com adubações nitrogenadas relativamente pequenas sem ocorrer redução nos níveis de nitrogênio do solo, tão pouco da produtividade (CANTARELLA, 2007). A hipótese de FBN em cana-de-açúcar foi então embasada nos trabalhos pioneiros de Johanna Döbereine na década de 50, quando foi verificada a ocorrência de *Beijerinckia fluminensis* (atualmente renomeada para *Azorhizophilus paspali* e *Azotobacter paspali*) na rizosfera de plantas de cana-de-açúcar, em solos da Baixada Fluminense no Estado do Rio de Janeiro (DÖBEREINER; RUSCHEL, 1958). No fim da década de 80, em um dos primeiros trabalhos de quantificação de FBN, conduzido na Embrapa Agrobiologia, Urquiaga et al. (1992) relataram que várias cultivares de cana-de-açúcar são capazes de obter grandes contribuições de N derivado da FBN. Estudos recentes, indicam que a contribuição da FBN pode chegar até 60% de todo o N acumulado pelas plantas de cana-de-açúcar (BODDEY et al., 2001; XAVIER, 2002), dependendo do genótipo da planta e sua interação com os diversos gêneros de bactérias diazotróficas associativas (REIS et al., 2000; REIS JUNIOR et al., 2000b).

A FBN em cana-de-açúcar também é influenciada por alguns outros fatores como: a disponibilidade de água no solo para a FBN, associada tanto às leguminosas como às não leguminosas já é conhecida e apontada por diversos especialistas como primordial (BODDEY; DÖBEREINER, 1984); nutrição da planta, com destaque para o molibdênio que é essencial para a síntese da enzima nitrogenase (POLIDORO, 2001); idade da planta (FUENTES-RAMIREZ et al., 1993); inoculações realizadas em condições de laboratório ou de campo, (SEVILLA et al., 2001) e o nível de fertilizante nitrogenado aplicado (REIS JUNIOR et al., 2000a).

Desde os primeiros trabalhos de Johanna Döbereine, novas bactérias fixadoras de nitrogênio foram identificadas nas raízes, colmos e folhas das plantas de cana-de-açúcar: bactérias diazotróficas associativas (*Azospirillum amazonense*) e as endofíticas (*Herbaspirillum seropedicae*; *H. rubrisubalbicans*; *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia tropica*, *B. kururiensis*, *B. unamae* e *B. silvatlantica*) (BALDANI; BALDANI, 2005; MOREIRA et al., 2010). Segundo Dobbelaere et al. (2003), as diazotróficas endofíticas têm vantagens sobre as diazotróficas associativas de

raízes, uma vez que ocupam espaços mais intimamente ligados ao hospedeiro, com maior acesso às fontes de carbono. Além disso, elas colonizam nichos protegidos do oxigênio, os quais são necessários para a expressão e atividade da nitrogenase.

A associação entre bactérias diazotróficas e a cana-de-açúcar envolve diversos gêneros bacterianos e mecanismos que ainda não foram totalmente elucidados (JAMES, 2000). A infecção e colonização de plantas por bactérias caracterizam-se pela adesão e posterior penetração e multiplicação no interior das mesmas (REIS; OLIVARES, 2006). Bactérias diazotróficas endofíticas apresentam penetração passiva, infectando a planta hospedeira 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 (BALDANI et al., 2009). 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 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 kg N ha^{-1}), representaria uma 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),

4.5 Inoculante para cana-de-açúcar

O inoculante para a cana-de-açúcar é resultado de mais de vinte e cinco anos de pesquisas realizadas principalmente pelo Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia - Embrapa Agrobiologia (Seropédica/RJ) (REIS et al., 2009b). Após experimentação em laboratório e casa de vegetação, cinco espécies de bactérias diazotróficas foram selecionadas para a formulação do inoculante, sendo 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). Todas as estirpes foram descritas pela Embrapa Agrobiologia e apresentam como principais características a fixação biológica de N e a síntese de fitohormônios (REIS et al., 2009b). Oliveira et al. (2002) observaram que a alta contribuição da FBN observada em variedades de cana-de-açúcar não pode ser atribuída apenas a uma ou poucas espécies de bactérias, mas sim a diferentes espécies endofíticas atuando durante as diferentes fases de crescimento, ou a uma interação entre a planta hospedeira e uma complexa comunidade endofítica promovendo alta transferência de nitrogênio fixado, bem como os efeitos de crescimento vegetal.

O primeiro estudo com aplicação do inoculante em condições de campo foi realizado com inoculação em material propagativo das variedades SP70-1143 e SP81-3250 associado a doses de N, em três solos contrastantes quanto a fertilidade: Planossolo, Latossolo e Nitossolo (baixa, média e alta fertilidade). Os resultados destes ensaios mostraram que a eficiência do inoculante é dependente da fertilidade do solo, sendo os melhores resultados observados no Planossolo sem fertilização nitrogenada (OLIVEIRA et al., 2006).

Posteriormente, REIS et al. (2009b) estudaram o efeito do inoculante na variedade comercial RB867515, durante três safras agrícolas (cana-planta, 1º e 2º soqueira), em área de cultivos comerciais nas usinas Santa Cruz S.A (Cambissolo Flúvico) e Sapucaia S.A (Argissolo Amarelo), região de Campos dos Goytacazes, norte do Estado do Rio de Janeiro, realizando a inoculação por imersão na ocasião do plantio e nas rebrotas por pulverização no momento do corte, na linha de cana-de-açúcar. Os autores verificaram que o inoculante promoveu incrementos na produtividade de colmos de forma similar à adubação com 120 kg ha⁻¹ de N, nos ciclos de cana-planta, primeira e segunda socas. Foi observado no ensaio implantado na Usina Santa Cruz incremento na produtividade advindo da inoculação de 7,6% na cana-planta (em comparação com o controle), 48% na cana da primeira soca e 68% na segunda soca; e no ensaio na Usina Sapucaia os ganhos foram na ordem de 37% na cana-planta e 19% na segunda soca, não apresentando diferenças no segundo ano de cultivo.

No ensaio de campo realizado por Schultz et al. (2012), com as variedades RB72454 e RB867515 em um Cambissolo flúvico, foram realizadas duas aplicações do inoculante, uma na fase do viveiro nas plântulas micropropagadas e outra por

imersão das gemas na ocasião do plantio. Os resultados da inoculação do coquetel de bactérias foram satisfatórios apenas para a variedade RB867515 no ciclo de cana-planta e segunda soqueira, com incremento na produtividade similar ao tratamento com 120 kg ha^{-1} de N fertilizante. No entanto, Pereira et al. (2013) estudaram o efeito do inoculante e três estirpes individuais de bactérias em cana-planta por imersão dos toletes em seis variedades de cana-açúcar e concluíram que a inoculação promove ganhos de biomassa, sendo a contribuição diferente entre variedades e estirpes, sugerindo uma interação entre esses fatores.

Os trabalhos relacionados sugerem que o inoculante para cana-de-açúcar é uma tecnologia promissora, que vai de encontro aos novos conceitos de agricultura sustentável, podendo proporcionar a eliminação, redução ou melhoria e eficiência de utilização do N fertilizante aplicado na cultura, embora estes resultados não sejam constantes para todas as variedades e ciclos de cultivo (SCHULTZ, 2012).

4.6 Interação adubação nitrogenada e FBN

Dos nutrientes minerais, o nitrogênio é o que tem o maior efeito sobre a FBN, de modo que a fixação só ocorre em situações de deficiência de N, pois a abundância de nitrogênio mineral reduz ou mesmo suprime a FBN (FRANCO; NEVES, 1992). Vários trabalhos demonstram que a adubação em cana-de-açúcar com fertilizantes nitrogenados pode diminuir a população de organismos diazotróficos com capacidade de fixar o N atmosférico (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1999; MUTHUKUMARASAMY et al., 1999; REIS JUNIOR et al., 2000a).

O grau de inibição pode variar de acordo com a fonte de nitrogênio aplicada, porém, é necessário que haja disponibilidade de N para o crescimento e desenvolvimento da planta, até o início da fixação de N_2 (FRANCO; NEVES, 1992). Diversos autores têm demonstrado que a aplicação de uma dose de N sub-ótima para a máxima produção, tem proporcionado os maiores ganhos em termos de FBN em plantas de arroz (SABINO, 2003; GUIMARÃES, 2006). Guimarães (2006) demonstrou que a cultivar IR42 pode obter um aumento de 48% na produção de grãos quando foi inoculada com bactérias diazotróficas e recebeu uma adubação de 50 kg N ha^{-1} . Pesquisas realizadas com a cultura de trigo indicam que a inoculação de bactérias diazotróficas não substitui os

fertilizantes nitrogenados, porém promove melhor absorção e utilização do N disponível no solo (SAUBIDET et al., 2002; ROESCH et al., 2005).

Nesse contexto, Suman et al. (2008) mostraram que variedades de cana-de-açúcar, com maior número de bactérias diazotróficas, não somente apresentaram maior potencial de FBN, porém, quando submetidas à metade da dose recomendada (50 kg ha⁻¹) de fertilizante nitrogenado, atingiram níveis de produtividade similares aos de plantas com a dose completa, além do aumento na eficiência de utilização do N-fertilizante. O mesmo estudo também mostrou que a população de *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi maior na metade da dose recomendada em comparação com a dose completa e sem adubação, enquanto a população de *Herbaspirillum* aumentou do tratamento sem adubação para o tratamento com a dose completa (SUMAN et al, 2008). A bactéria *Herbaspirillum* spp. é considerada mais resistente a doses maiores de nitrogênio (MUTHUKUMARASAMY et al., 1999), enquanto que o número de *Gluconacetobacter diazotrophicus* é mínimo comparado com outras bactérias em altas aplicações de nitrogênio (REIS JUNIOR et al., 2000a). Segundo MUTHUKUMARASAMY et al. (1999), o efeito negativo do N não é uma relação direta entre a presença das bactérias diazotróficas e altas doses de N, uma vez que estas bactérias continuam a fixar o nitrogênio mesmo em altas concentrações de nitrato, sendo mais provável que a fisiologia da planta seja alterada em presença de altas doses de N e, posteriormente, afeta a associação com estes microrganismos.

Pereira (2011), trabalhando com a variedade SP80-3280 em área de cultivo na usina Diamante, localizada no município de Jaú/SP (Latossolo Vermelho), utilizando o inoculante composto por bactérias diazotróficas (*Azospirillum amazonense*; *Herbaspirillum seropedicae*; *Herbaspirillum rubrisubalbicans*; *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Burkholderia tropica*) aplicado diretamente no rebolo da soqueira 28 dias após o corte sob diferentes níveis de nitrogênio (0, 50, 100 e 150 kg ha⁻¹), constatou que a inoculação associada a dose de 50 kg de N ha⁻¹ promoveu efeito significativo quando comparado com as demais doses. Entretanto, a inoculação associada a dose de 150 kg de N ha⁻¹ promoveu efeito negativo com redução da produtividade de colmos, no ciclo de terceira soca. Esse resultado corrobora com aquele encontrado por Oliveira et al. (2006), no qual uma mistura de três estirpes bacterianas associadas a dose de 100 kg ha⁻¹ de N em primeira soca, da variedade SP70-1143, promoveu significativo decréscimo na

produtividade de colmos quando comparado com o tratamento não inoculado e adubado com a mesma dose de N.

Na Índia, Suman et al. (2005) estudaram o efeito da inoculação de seis estirpes de *G. diazotrophicus* associadas a três doses de nitrogênio (0, 75 e 150 kg ha⁻¹) na variedade CoSe 92423, observaram efeito significativo das estirpes sobre o número de perfilhos e altura de plantas. No menor nível de nitrogênio a inoculação por todos os sete isolados apresentaram efeito positivo significativo, mas no maior nível de N, apenas três isolados aumentaram significativamente a matéria seca total da cana-de-açúcar, concluindo que além da interação planta-bactéria, a dose do nitrogênio aplicada afeta a resposta a inoculação. Também na Índia, Suman et al. (2013) avaliaram em condições de campo o efeito do inoculante formado por três estirpes de bactérias diazotróficas associado a doses de nitrogênio (0, 75 e 150 kg ha⁻¹). Esses autores verificaram que o inoculante aumentou a produção de colmos e a eficiência de utilização do fertilizante em todos os níveis de adubação, mas os melhores resultados foram observados na dose de 75 kg de N ha⁻¹ comparado à dose de 150 kg de N ha⁻¹. Assim, pode-se inferir que a FBN associada a plantas da família *Poaceae*, como a cana-de-açúcar, funciona de forma complementar a disponibilidade de N do solo, sendo similar ao que ocorre com leguminosas, mas essa interação ainda precisa ser mais bem compreendida.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Localização e caracterização climática da área experimental

O experimento de campo foi instalado no ano agrícola de 2011/2012, na Fazenda Bosque, situada no município de Igarapu do Tietê, Estado de São Paulo, pertencente ao GRUPO RAIZEN – Unidade Barra, cujas coordenadas geográficas são latitude 22° 33' 35''S, longitude 48° 33' 17''O e altitude de 537 m.

O clima predominante da região é o Aw (Köppen), com clima seco definido, temperatura média anual de 21,6°C, umidade relativa média de 70%, com extremos de 77% em fevereiro e 59% em agosto. A média pluviométrica é próxima de 1.344mm.

Os dados mensais referentes às temperaturas máxima, mínima, precipitação pluvial e a velocidade do vento durante o ano de condução do experimento, coletados na Estação Meteorológica da Fazenda Bosque estão contidos na Figura 1.

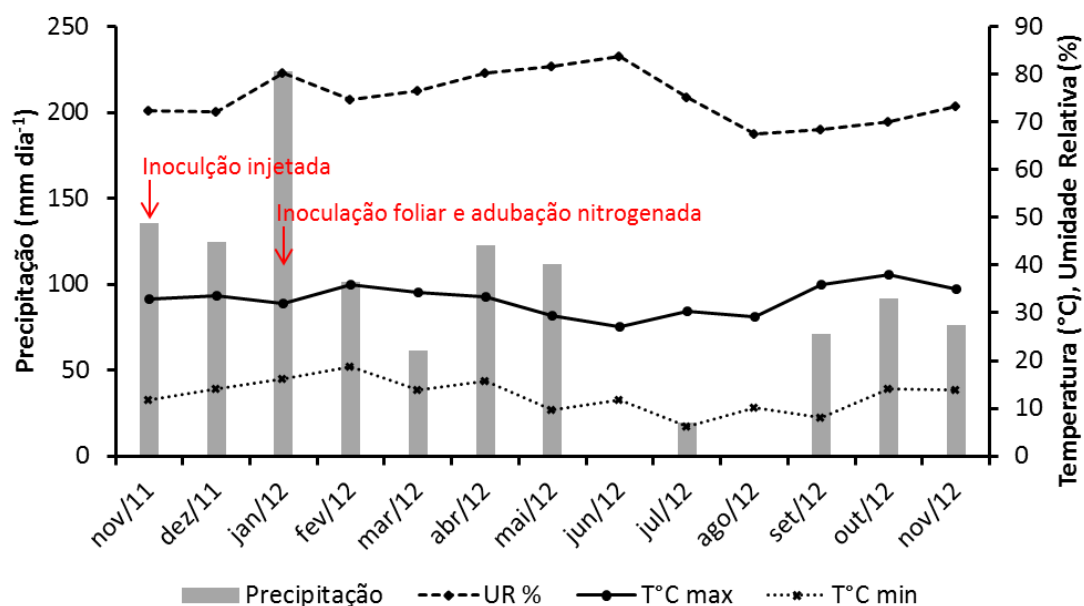


Figura 1. Precipitação (mm mês⁻¹), temperaturas máxima e mínima (°C) e umidade relativa média (%) registrada na Estação Meteorológica da Fazenda Bosque, Igarapu do Tietê (SP) entre novembro de 2011 a novembro de 2012.

5.2 Caracterização do solo

O solo da área experimental atualmente é classificado como Latossolo vermelho eutrófico, textura argilosa (Embrapa, 2013) com ambiente de produção classificado como A (PRADO, 2008).

Em novembro de 2011, antes da instalação do experimento, foram coletadas amostras de solo das camadas de 0-20 e 20-40 cm e submetidas a análises química e granulométrica no Laboratório de Fertilidade do Solo do Departamento de Solos e Recursos Ambientais, da FCA-UNESP/Botucatu-SP. Os resultados das análises estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Características químicas e granulométricas do solo da área experimental. Fazenda Bosque – Grupo RAIZEN, Usina da Barra. Igarapu do Tietê, SP, 2011.

Análise Química											
Prof. cm	pH CaCl ₂	M.O. g/dm ⁻³	P _{resina} g/dm ⁻³	Al ³⁺	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V
					-----	g/dm ⁻³	-----				%
0-20	5,1	28	20	0	45	1.7	40	15	57	102	56
20-40	5,1	32	162	0	41	0.7	38	11	50	92	55
Prof. cm	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn			N		
	-----mg/dm ⁻³ -----						mg/kg				
0-20	2	0,27	35,6	32	191,4	21,4			1591,06		
20-40	2	0,36	34,8	30	193,1	20,2			1462,07		
Análise Granulométrica											
Prof. cm	Areia			Argila	Silte	Textura do Solo					
	Grossa	Fina	Total								
	----- g/kg ⁻¹ -----										
0-20	10	57	67	584	349	Argilosa					
20-40	10	65	75	594	331	Argilosa					

5.3 Caracterização da variedade

A variedade RB92579 foi desenvolvida pelo Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar-PMGCA, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas. Esta cultivar tem como principais características: excelente produtividade agrícola, ótimo perfilhamento, bom fechamento da entrelinha, ótima brotação das soqueiras, garantindo longevidade dos canaviais; porte semi-ereto, com ótima colheabilidade; boa recuperação após períodos de seca; altamente responsiva à irrigação e muito eficiente no uso da água; alta eficiência no uso dos principais nutrientes; ótimo teor de sacarose, maturação média com PUI longo e médio teor de fibra (SOCICANA, 2010).

Recomendada para colheita do meio para o final de safra; florescimento baixo; tolerante em relação ao ataque da broca comum, resistente a ferrugem marrom e escaldadura das folhas e moderadamente resistente ao carvão. Não apresenta restrição a ambiente de produção (SIMÕES NETO et al., 2005; SOCICANA, 2010). Segundo o censo varietal realizado em 2013 pela RIDESA (Rede Interuniversitária para o

Desenvolvimento do Setor Sucroenergético) da UFSCAR, a RB92579 ocupa 4,3% das áreas de cultivo de cana-de-açúcar dos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul.

5.4 Delineamento experimental e tratamentos

O estudo foi realizado em cana-soca com plantio realizado em sistema de cana-de-ano na data de 26 de outubro de 2010. Cada parcela foi composta por quatro linhas com espaçamento combinado de 1,60 x 0,90 m por 15 m de comprimento. Os tratamentos foram aplicados após o primeiro corte, que ocorreu em 11 de novembro de 2011.

Tabela 2. Tratamentos, forma de aplicação e doses de aplicação do inoculante associado a doses de N, Igarau do Tietê – SP.

Tratamento	Forma de aplicação do inoculante	Doses (kg N ha⁻¹ + L bactéria ha⁻¹)
Test. Absoluta	---	0 + 0
Inoculante	Pulverização injetada	0 + 0,1
Inoculante	Pulverização foliar	0 + 0,1
N	---	60 + 0
N + inoculante	Pulverização injetada	60 + 0,1
N + inoculante	Pulverização foliar	60 + 0,1
N	---	90 + 0
N + inoculante	Pulverização injetada	90 + 0,1
N + inoculante	Pulverização foliar	90 + 0,1
N	---	120 + 0
N + inoculante	Pulverização injetada	120 + 0,1
N + inoculante	Pulverização foliar	120 + 0,1

Os tratamentos foram constituídos por diferentes doses de N (0, 60, 90 e 120 kg ha⁻¹) e três tipos de manejo de inoculação (sem inoculação, inoculante aplicado via injetada logo após o corte das touceiras e inoculante aplicado via foliar após 60 dias do corte das touceiras).

O inoculante utilizado foi uma mistura de estirpes de cinco espécies de bactérias isoladas da cana-de-açúcar (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*), inicialmente testadas e selecionadas por Oliveira et al. (2002, 2006). Para cada uma das bactérias foi utilizada a dose de 0,1 L ha⁻¹ do inoculante, totalizando a dose aplicada em 0,5 L ha⁻¹. A aplicação da mistura de inoculante ocorreu de duas maneiras: injetada logo após o corte (25/novembro/2011) e foliar, 60 dias após o início das brotações (25/janeiro/2012).

O fertilizante nitrogenado utilizado foi o nitrato de amônio (NH₄NO₃), o qual foi aplicado manualmente em 25 de janeiro de 2012 ao lado da linha da soqueira de cana-de-açúcar, conforme a dosagem para cada tratamento.

O delineamento estatístico foi em blocos ao acaso, em esquema fatorial 4x3, constituindo-se dos fatores doses de nitrogênio (N) e manejos da inoculação (M) totalizando 12 tratamentos, com quatro repetições, conforme apresentado na Tabela 2.

5.5 Aplicação do inoculante

As cinco estirpes de bactérias diazotróficas foram previamente misturadas para cada maneira de aplicação. Em ambas as maneiras de aplicação do inoculante utilizou-se vazão de 200 L ha⁻¹. A pulverização injetada foi feita com implemento de aplicação de nematicidas e inseticida fornecido pela empresa ConsultiAgro, o qual possui quatro discos de corte que abriam um sulco de pequena espessura sobre a soqueira permitindo aplicar o produto inoculante diretamente nos rebolos das soqueiras ocasionando uma porta de entrada para as bactérias (Figura 2). Na aplicação foliar foi utilizado um pulverizador costal constituído por uma bomba de 20 L com jato dirigido sobre a linha da soqueira (Figura 3). Durante o dia da pulverização do inoculante via injetada as condições ambientais eram temperatura média de 25,3°C e umidade relativa de 59,9%, enquanto no dia da pulverização do inoculante via foliar eram temperatura média de 24,4°C e umidade relativa de 84,0%.



Figura 2. Implemento de aplicação de nematicida e inseticida utilizado na aplicação injetada do inoculante após o corte.



Figura 3. Pulverizador costal utilizado na aplicação foliar 60 dias após início das brotações.

5.6 Avaliações

5.6.1 Contagem de falhas

Aos 120 dias após início das brotações foram realizadas a contagem de falhas. A quantidade de falhas foi estabelecida segundo metodologia descrita por Stolf (1986) que define falha como a projeção entre duas canas consecutivas ao longo da linha de cana, sendo consideradas somente falhas maiores que 0,5m.

5.6.2 Diagnose foliar

Aos 120 dias após início das brotações (DAB) e na colheita do experimento (379 DAB) foram coletadas, aleatoriamente, em cada parcela experimental o terço médio de cinco folhas +1, de acordo com a numeração sugerida por Kuijper

(Dillewijn, 1952), excluía a nervura central, as quais constituíram uma amostra composta. As amostras foram secas em estufa com circulação forçada de ar á temperatura de 65° por 72 horas e posteriormente moídas em moinho de facas tipo Wiley, e analisadas quanto ao teor de nitrogênio na folha, segundo Malavolta et al. (1997).

5.6.3 Avaliações fisiológicas

As avaliações fisiológicas ocorreram previamente à colheita.

5.6.3.1 Estimativa do conteúdo de clorofila via índice SPAD

A estimativa do conteúdo de clorofila foi determinada usando um clorofilômetro SPAD-502 (Minolta Corp., Ramsey, NJ, EUA). O aparelho possui duas LEDs (díodo emissor de luz), posicionadas na ponta do medidor, que emitem luz em sequência, quando o medidor está fechado, na faixa do 600-700 nm (pico em 650 nm - vermelho) na qual a absorbância pela clorofila é alta e na faixa de 860 a 1060 (pico em 940 nm - infravermelho) onde absorbância é baixa, funcionando como um fator de correção em função da espessura da folha (GODOY, 2005). A luz que passa através da amostra da folha atinge um receptor (fotodiodo de silicone) que converte a luz transmitida em sinais elétricos analógicos. Esses sinais são convertidos em sinais digitais por meio do conversor A/D e são usados por um microprocessador para calcular os valores SPAD (*Soil Plant Analysis Development*), que são mostrados num visor (MINOLTA, 1989). A leitura instantânea obtida mensura a intensidade de cor verde do limbo foliar, a qual se correlaciona aos teores de clorofilas e à concentração de nitrogênio na folha (PÔRTO et al., 2011).

Foram realizadas 5 leituras nas folhas +1 de diferentes perfilhos por parcela amostrada de cada tratamento assim constituindo-se a média dessa parcela.

5.6.3.2 Conteúdo de clorofila

Para a quantificação do conteúdo de clorofila total foram coletadas amostras de folhas +1 de cada parcela e em seguida, no próprio campo, foram extraídos da lâmina foliar dois discos foliares (0,69 cm² cada), entre a borda e a nervura central da

folha. Imediatamente após a coleta, os discos foliares foram imersos a 2 mL de Dimetil - formamida (DMF) em frascos de vidro durante 24h para extração dos pigmentos fotossintéticos, e armazenados em caixa térmica de forma que os efeitos da luz e temperatura sobre a degradação da clorofila fossem minimizados.

Após este período foi extraído 1 mL do material sobrenadante e adicionado ao sobrenadante 1 mL de água deionizada. A solução obtida foi submetida às leituras de absorbância nos comprimentos de onda 647 e 664 nm, que correspondem ao pico de maior absorção dos pigmentos clorofila *b* e clorofila *a*, respectivamente, utilizando-se, para tanto, o espectrofotômetro, modelo Cintra 40 (GBC) do Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM) da FCA/UNESP/Botucatu-SP. Posteriormente, a quantificação dos pigmentos foi realizada mediante as equações de Porra et al. (1989).

5.6.4 Número de colmos por metro

A contagem do número de perfilhos foi realizada de maneira direta, na linha central da parcela, em cada uma das repetições, no próprio campo na ocasião da colheita.

5.6.5 Biometria

Previamente à colheita do ensaio foram coletadas, aleatoriamente, 10 plantas de cada parcela, compondo uma amostra composta, que foram levadas para o Laboratório de Bebidas do Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial da FCA/UNESP/Botucatu-SP, onde foram determinados os atributos biométricos comprimento e diâmetro de colmos.

O comprimento do colmo foi determinado por meio de medição, com régua graduada em centímetros, da distância entre o início do colmo até a região auricular da folha +1 (Dillewijn, 1952).

Por meio de paquímetro digital realizou-se a determinação do diâmetro do colmo, medindo-se o centro do internódio localizado na região do primeiro terço do colmo acima do solo nas mesmas plantas utilizadas para a avaliação da altura.

5.6.6 Atributos tecnológicos

A análise tecnológica foi realizada no laboratório do Grupo RAIZEN – Unidade Barra, conforme metodologia Consecana (2006), em 10 colmos colhidos, aleatoriamente, de cada parcela experimental. Os atributos tecnológicos avaliados foram: açúcar teórico recuperável (ATR), pureza aparente do caldo (Pureza), teor de sólidos solúveis (Brix), teor de fibra industrial (Fibra), teor de sacarose (Pol cana).

5.6.7 Produtividade de colmo e açúcar

O ensaio foi colhido mecanicamente dia 23 de novembro de 2012. A produtividade de colmos industrializáveis, em megagrama de colmos ha^{-1} (MCH), foi determinada no momento da colheita do ensaio, obtendo-se o peso de cada parcela com balança tipo célula de carga e considerando-se o plantio de 8.000 (espaçamento de 1,60 x 0,90 m) metros lineares de cana-de-açúcar em um hectare. A produtividade de açúcar, em megagrama de pol ha^{-1} (MPH), foi obtida por meio do produto entre MCH e o teor de sacarose (Pol cana).

5.6.8 Acúmulo de fitomassa seca

Após a determinação dos atributos biométricos, as amostras foram separadas em ponteiros, folhas e colmos, sendo o ponteiro constituído do cartucho e da folha +1 (primeiro colarinho visível); para a componente folha (folha + bainha), consideraram-se as folhas secas e verdes a partir da folha +1; e, após a retirada do ponteiro e das folhas, o restante foi considerado colmo.

Os ponteiros, folhas e colmos, depois de separados, foram pesados, determinando-se a massa de matéria fresca. As amostras de material vegetal fresco foram trituradas em forrageira industrial e, em seguida, coletadas subamostras úmidas. Das subamostras foram obtidas as massas e submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar a 65°C durante 72 horas e obtidas as massas de matéria seca para determinação da umidade do material. Os resultados foram calculados para Mg ha^{-1} considerando o plantio de 8.000 (espaçamento de 1,60 x 0,90 m) metros lineares de cana-de-açúcar em um hectare.

5.6.9 Acúmulo de nitrogênio

Após obtenção da massa de matéria seca, as subamostras de ponteiros, folhas e colmos foram trituradas em moinho tipo Willey para em seguida se determinar a concentração de nitrogênio em cada compartimento. As determinações de N-total foram realizadas por digestão sulfúrica e posterior destilação em destilador de arraste de vapor, conforme procedimentos descritos em Malavolta et al. (1997). Com os resultados de acúmulo de massa seca de ponteiros, folhas e colmos e com as concentrações de nitrogênio correspondente obteve-se a extração de nitrogênio pela parte aérea.

5.6.10 Eficiência de uso do N-fertilizante

A eficiência de uso do N-fertilizante em interação com o inoculante pela cana-de-açúcar foi calculada segundo metodologia de Cassman et al. (1998), onde:

- Fator parcial de produtividade (FPP) do nutriente aplicado é a relação entre a produtividade (kg ha^{-1}) com a quantidade de N aplicado (kg ha^{-1}).

$$\text{FPP} = P_n / D_n, \quad (1)$$

Em que:

FPP=Fator parcial de produtividade.

P_n =Produtividade da parcela tratada.

D_n = Dose de N aplicad na parcela tratada.

- Eficiência agronômica (EA) do nutriente aplicado é a relação entre o incremento da produtividade (kg ha^{-1}) com a quantidade de N aplicado (kg ha^{-1}).

$$\text{EA} = (P_n - P_0) / D_n, \quad (2)$$

Em que:

EA=Eficiência agronômica.

P_n =Produtividade da parcela tratada.

P_0 =Produtividade da parcela testemunha.

D_n = Dose de N aplicado na parcela tratada.

- Eficiência aparente de recuperação (ER) do nutriente aplicado é a relação entre o incremento da absorção de N (kg ha^{-1}) com a quantidade de N aplicado (kg ha^{-1}).

$$ER = (N_n - N_0) / D_n, \quad (3)$$

Em que:

ER=Eficiência de recuperação.

N_n =Acúmulo de nitrogênio da parcela tratada.

N_0 =Acúmulo de nitrogênio da parcela testemunha.

D_n = Dose de N aplicado na parcela tratada.

- Eficiência fisiológica (EF) do N aplicado é a relação entre o incremento na produtividade (kg ha^{-1}) com o incremento da absorção de N aplicado (kg ha^{-1}).

$$EF = (P_n - P_0) / (N_n - N_0), \quad (4)$$

Em que:

EF=Eficiência fisiológica.

P_n =Produtividade da parcela tratada.

P_0 =Produtividade da parcela testemunha.

N_n =Acúmulo de nitrogênio da parcela tratada.

N_0 =Acúmulo de nitrogênio da parcela testemunha.

5.6.11 Análise dos resultados

Os resultados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o teste de F, considerando significativo a 5%. Foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparar o efeito dos tratamentos e análise de regressão para as variáveis que apresentaram diferenças significativas entre os níveis de N.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Avaliação de falhas

Não foi observado efeitos dos tratamentos na contagem de falhas. A porcentagem de falhas (F%) média de cada tratamento está apresentada no anexo.

6.2 Índice SPAD, conteúdo de clorofila total e avaliação nutricional

Os resultados revelaram que as doses de N promoveram efeitos significativos para os atributos teor de N aos 120 dias após início das brotações ($p < 0,05$), índice SPAD ($p < 0,01$) e conteúdo de clorofila total ($p < 0,01$). Já o fator manejo da inoculação promoveu efeito somente para o índice SPAD a 1% de probabilidade (Tabela 3).

Verificou-se que o aumento dos níveis de N proporcionou aumento nos teores foliares de N aos 120 dias após início das brotações, estando os valores dentro da faixa considerada adequada de acordo com Raij e Cantarella (1997) (Tabela 4). Entre a

maior dose de N, 120 kg ha⁻¹, e a menor, 0 kg ha⁻¹, houve diferença significativa nos teores de N nas folhas. Entretanto, a magnitude dos teores de N na folha e as diferenças significativas não se mantiveram até a colheita quando os mesmos estavam abaixo do sugerido pela literatura (RAIJ; CANTARELLA, 1997). Isso pode ser atribuído ao efeito diluição, já que a concentração dos nutrientes é diluída com o maior crescimento da planta, principalmente nos tratamentos que recebem altas doses de fertilizantes nitrogenados (JARRELL; BEVERLY, 1981). Essa observação está de acordo com Raij e Cantarella (1997) e Orlando Filho et al. (2001), que afirmam que, para cana-de-açúcar, a técnica de determinação nutricional da cultura, por meio de análises foliares, ainda é um desafio e nem sempre a análise da folha diagnóstico representa o potencial de absorção do nutriente ao longo do ciclo da cultura. Ainda, sabe-se que a concentração dos nutrientes nas folhas também é afetada pela idade da cultura (GOMEZ-ALVAREZ, 1974).

Tabela 3. Análise de variância do teor de N, índice SPAD e conteúdo de clorofila total (CC total) da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igarapu do Tietê, SP, 2011-2012.

Causas da variação	Quadrados Médios			
	Teor de N		Índice SPAD	CC total
	120 dias após início das brotações	Colheita		
Bloco	0,61ns	2,38ns	0,24ns	16,98ns
Doses de N (D)	6,54*	5,65ns	13,23**	78,12**
Manejo da inoculação (M)	2,94ns	0,26ns	12,20**	10,35ns
D x M	2,80ns	1,66ns	2,62ns	8,74ns
Erro	1,88	2,63	1,10	11,50
CV%	6,86	9,90	2,78	11,31

ns, *, **: não significativo, significativo a 5% e a 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; CV: coeficiente de variação.

Verificou-se que as doses de N também promoveram aumento no índice SPAD e no CC total na colheita (Tabela 4). A leitura instantânea obtida pelo medidor portátil de clorofila mensura a intensidade de cor verde do limbo foliar, a qual se correlaciona aos teores de clorofila extraível e à concentração de N na folha (PÔRTO et al., 2011), no entanto nesse trabalho só foi observada relação entre o índice SPAD e o CC total. Segundo Amaral e Molin (2011), são necessárias mais pesquisas sobre a folha, a

posição e o número de mensurações necessárias para a correta mensuração do teor de clorofila, por meio de clorofilômetro na planta de cana-de-açúcar.

O incremento do CC total observado mediante ao aumento das doses de nitrogênio pode ser evidenciado pelo fato de que esse elemento participa da constituição das moléculas de clorofilas, que atuam na captação de energia luminosa pelos fotossistemas I e II da fase fotoquímica da fotossíntese, utilizada para a conversão em energia química necessária à incorporação e produção de esqueletos carbônicos (PEDÓ et al., 2012).

Tabela 4. Teor de N, índice SPAD e conteúdo de clorofila total (CC total) da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igarapu do Tietê, SP, 2011-2012.

	Teor de N		Índice SPAD	CC total
	120 DAB	Colheita		
	g kg ⁻¹			
Doses de N (kg ha ⁻¹)				µg cm ⁻²
0	19,27 b	15,58	36,31 b	26,72 b
60	19,50 ab	16,60	38,19 a	29,23 ab
90	20,45 ab	16,20	38,62 a	32,13 a
120	20,81 a	17,22	38,33 a	31,90 a
Manejo da inoculação				
Sem inoculação	19,57	16,38	37,07 b	30,05
Injetada	20,02	16,53	37,73 b	30,77
Foliar	20,43	16,28	38,80 a	29,16

Médias seguidas de letra diferente na vertical, dentro de cada atributo (doses de N e Manejo da inoculação), diferem estatisticamente, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Verificou-se que a maneira de inoculação não afetou o teor de N na folha nem o CC total, entretanto a inoculação foliar promoveu aumento no índice SPAD, demonstrando que essa ferramenta não se mostrou eficiente em prever o teor foliar de N na colheita da cana-de-açúcar. Desse modo, o resultado do CC total não demonstra o relatado por Schubert (1986) e Cojho et al. (1993) que afirmam que as bactérias fixadoras de N liberam para a planta hospedeira N na forma de amônio, ou seja, quanto mais amônio liberado, maior a disponibilidade de N e, conseqüentemente, mais clorofila na folha.

6.3 Perfilhamento e biometria

Os resultados revelaram que os níveis de adubação não influenciaram significativamente os atributos número de perfilhos por metro, comprimento e diâmetro de colmos (Tabela 5). Já o manejo da inoculação promoveu efeito significativo no comprimento de colmo ($p < 0,05$).

Tabela 5. Análise de variância do número de perfilhos, comprimento e diâmetro do colmo da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igarapu do Tietê, SP, 2011-2012.

Causas da variação	Quadrados Médios		
	Perfilhos	Comprimento	Diâmetro
Bloco	5,68ns	77,07ns	0,06ns
Doses de N (D)	0,82ns	372,00ns	0,05ns
Manejo da inoculação (M)	1,11ns	1434,89*	0,01ns
D x M	1,99ns	131,52ns	0,03ns
Erro	3,06	386,35	0,04
CV%	12,29	7,10	8,09

ns e *: não significativo e significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; CV: coeficiente de variação.

Observou-se que a inoculação via injetada e via foliar, independentemente do nível de adubação, promoveu incremento no comprimento do colmo, porém somente a inoculação via foliar se diferiu significativamente da testemunha sem inoculação (Tabela 6). As bactérias diazotróficas, além de fixar o N_2 , podem estimular o crescimento vegetal através da produção de hormônios como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e uma série de outras moléculas; solubilização de fosfatos; e por atuarem como agente de controle biológico de patógenos (OLIVARES, 2009). Em geral, acredita-se que essas bactérias beneficiam o crescimento das plantas por uma combinação de todos esses mecanismos (Dobbelaere et al., 2003).

Entre os atributos biométricos estudados, Landell e Silva (1995) relataram que o diâmetro de colmos é o que apresenta a menor variação, e que depende das características do genótipo, do número de perfilhos, do espaçamento entre linhas, da área foliar e das condições ambientais. De acordo com Cesnik e Miocque (2004), o tamanho médio do diâmetro de colmo em cana-de-açúcar é de 2,5 cm, valor similar ao encontrado neste estudo (Tabela 6).

Tabela 6. Número de perfilhos, comprimento e diâmetro do colmo da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igarapu do Tietê, SP, 2011-2012.

	Perfilhos	Comprimento	Diâmetro
	Nº perf. m⁻¹	cm	
Doses de N (kg ha⁻¹)			
0	14,06	269,05	2,74
60	14,51	278,25	2,59
90	13,96	282,35	2,64
120	14,40	276,95	2,70
Manejo da inoculação			
Sem inoculação	14,37	266,71 b	2,64
Injetada	14,40	277,68 ab	2,66
Foliar	13,93	285,56 a	2,69

Médias seguidas de letra diferente na vertical, dentro de cada atributo (doses de N e Manejo da inoculação), diferem estatisticamente, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

6.4 Produtividade e acúmulo de fitomassa seca

Os resultados revelaram efeito significativo a 1% de probabilidade das doses de N, manejo da inoculação e da interação (doses de N x Manejo da inoculação) para os atributos MCH e MPH (Tabela 7).

Tabela 7. Análise de variância da produtividade de colmos, em megagrama de cana por hectare (MCH) e produtividade de açúcar, em megagrama de pol por hectare (MPH) da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igarapu do Tietê, SP, 2011-2012.

Causas da variação	Quadrados Médios	
	MCH	MPH
Bloco	14,68ns	0,85ns
Doses de N (D)	552,6**	12,88**
Manejo da inoculação (M)	454,18**	9,93**
D x M	512,08**	13,37**
Erro	46,84	1,49
CV%	7,38	8,47

ns e **: não significativo a 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; CV: coeficiente de variação.

Conforme já relatado, a interação (doses de N x Manejo da inoculação) promoveu efeito significativo para a MCH (Tabela 7). De acordo com os desdobramentos dessa interação (Figura 4), constatou-se que o inoculante associado ao N-

fertilizante aumentou a produtividade de colmos, no entanto, no tratamento com 120 kg N ha⁻¹ associado ao inoculante houve redução da MCH. Resultado semelhante foi observado por Oliveira et al. (2006) que verificaram, em condições de campo, que uma mistura de três estirpes bacterianas associadas a dose de 100 kg ha⁻¹ de N em primeira soca da variedade SP70-1143 promoveu significativo decréscimo na produtividade de colmos quando comparado com o tratamento adubado com a mesma dose de N sem inoculação. Segundo Muthukumarasamy et al. (1999), o efeito negativo do N não é uma relação direta entre a presença das bactérias diazotróficas e altas doses de N, uma vez que estas bactérias continuam a fixar o nitrogênio mesmo em altas concentrações de nitrato, sendo mais provável que a fisiologia da planta seja alterada em presença de altas doses de N e posteriormente afeta a associação com estes microrganismos.

Schultz (2012) constatou que o inoculante composto de cinco espécies de bactérias diazotróficas (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*), teve efeito negativo sobre a produtividade da variedade CTC 2 no ciclo de cana-planta e na segunda soqueira, mas a inoculação não estava associada a adubação nitrogenada. Neste caso o autor ressalta que um dos fatores que pode ter contribuído para esse efeito negativo do inoculante pode ser o reduzido volume de chuvas logo após o plantio da cana-planta e o corte da primeira soca associado a influência do genótipo.

Estudos realizados em laboratórios mostram que o estado nutricional das plantas, que é dependente do genótipo e das condições ambientes, com destaque para a adequada disponibilidade de água no solo, pode resultar em efeitos negativos da interação planta-bactéria no desenvolvimento e rendimento da cultura (OLIVEIRA et al., 2002; CANUTO et al., 2003). No presente trabalho as inoculações (via injetada ou foliar) foram realizadas no período de grande pluviosidade, onde foram registrados 585,4 mm de chuva durante novembro/2011 a fevereiro/2012 (Figura 1). Segundo Oliveira (2003), a disponibilidade de água nos estágios iniciais após a inoculação favorece a colonização e sobrevivência das bactérias diazotróficas.

Como já observado anteriormente a inoculação promoveu incremento no comprimento de colmos, refletindo em aumento da MCH (Figura 4). De fato, segundo Landell e Silva (2004), os componentes de produção determinantes para o potencial agrícola do canavial são número de perfilhos, comprimento e diâmetro de colmo.

O tratamento sob a dose de 60 kg N ha⁻¹ em associação com o inoculante promoveu maiores ganhos na produção comparados aos tratamentos com 90 e 120 kg N ha⁻¹ com inoculação (Figura 4). Na Índia, Suman et al. (2008) mostraram que variedades de cana-de-açúcar, com grande número de bactérias diazotróficas, quando submetidas à metade da dose recomendada de fertilizante nitrogenado (50 kg ha⁻¹), atingiram níveis de produtividade similares aos de plantas com a dose completa. Os mesmos autores haviam observados anteriormente maior população de *Gluconacetobacter diazotrophicus* sob 75 kg N ha⁻¹ comparado aos tratamentos sem adubação e sob 150 kg N ha⁻¹ (SUMAN et al., 2005).

Fuentes-Ramirez et al. (1993) observaram que a percentagem de isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* a partir de plantas sem adubação nitrogenada ou com baixas aplicações de N, era muito maior do que em plantas adubadas com altas doses deste nutriente (300 kg N ha⁻¹). Alguns anos mais tarde, os mesmos autores confirmaram a observação anterior e também observaram que a capacidade de colonização de *G. diazotrophicus* foi reduzida em altos níveis de adubação nitrogenada e a colonização interna de tecido vegetal de cana-de-açúcar só ocorreu no menor nível de N-fertilizante (Fuentes-Ramirez et al., 1999). Muthukumarasamy et al. (1999) obtiveram resultados semelhantes na Índia para *G. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. Segundo Baldani et al. (2002), o N é provavelmente o fator chave para a associação de bactérias diazotróficas com a planta de cana-de-açúcar.

Foi observado comportamento quadrático para o fator quantitativo doses de N sem inoculação ($R^2 = 0,72$) e associado ao inoculante via aplicação injetada ($R^2 = 0,35$) para a produtividade de colmos na variedade RB92579 (Figura 4). Em relação às diferenças significativas entre os tratamentos, a diferença na produtividade do tratamento sob 120 kg N ha⁻¹ sem inoculação em relação a testemunha sem inoculação foi de 41,74 Mg ha⁻¹, enquanto que o tratamento sob 60 kg N ha⁻¹ inoculado via aplicação injetada promoveu incremento de 14,56 Mg ha⁻¹ em relação a testemunha inoculada via aplicação injetada.

Por ser produto entre MCH e pol% cana, os resultados para MPH foram bem semelhantes aos de MCH em termos de tendência de resposta (Figura 5). Foi observado comportamento quadrático para os níveis de adubação sem inoculação ($R^2 = 0,70$) para a produtividade de açúcar na variedade RB92579. A dose de 120 kg N ha⁻¹

promoveu aumento de produtividade de açúcar de 6,72 Mg ha⁻¹ comparada a testemunha absoluta.

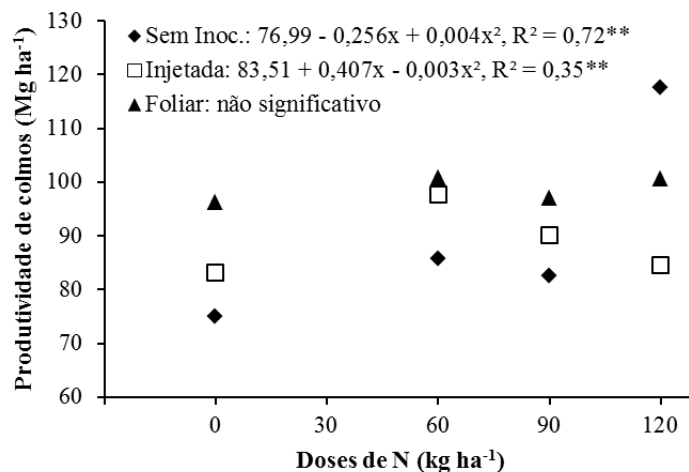


Figura 4. Produtividade de colmos, em megagrama de cana por hectare (MCH) da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de nitrogênio associado ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igarapu do Tietê, SP, 2011-2012. **: significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. R^2 : coeficiente de regressão.

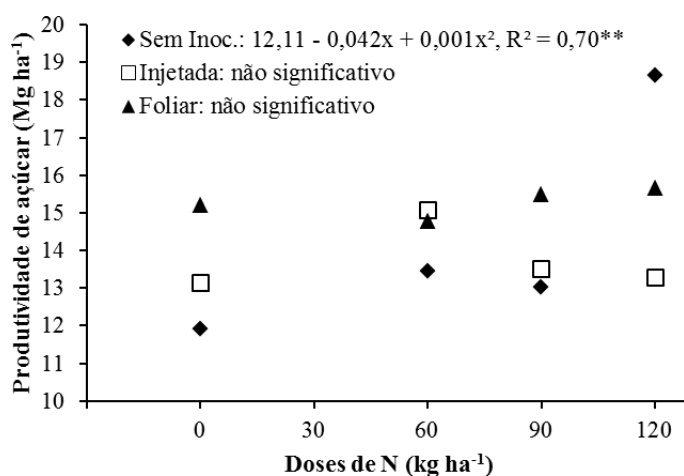


Figura 5. Produtividade de açúcar, em megagrama de pol por hectare (MPH) da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igarapu do Tietê, SP, 2011-2012. **: significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. R^2 : coeficiente de regressão.

Os resultados revelaram efeito significativo a 1% de probabilidade das doses de N para os componentes colmo e ponteiro e parte aérea (acúmulo de matéria seca total), já o manejo da inoculação promoveu efeito significativo para o acúmulo de matéria seca no colmo ($p < 0,01$), ponteiro ($p < 0,05$) e na parte aérea total ($p < 0,05$). A

interação (doses de N X Manejo da inoculação) promoveu efeito significativo a 1% de probabilidade no componente colmo e na parte aérea total (Tabela 8).

Tabela 8. Análise de variância do acúmulo de matéria seca por componente da parte aérea da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igaraçu do Tietê, SP, 2011-2012.

Causas da variação	Quadrados Médios			
	Acúmulo de matéria seca			
	Colmo	Ponteiro	Folha	Total
Bloco	1,97ns	0,44ns	4,09ns	8,44ns
Doses de N (D)	24,10**	3,78**	4,31ns	74,13**
Manejo da inoculação (M)	29,26**	3,02*	8,73ns	53,19*
D x I	48,16**	1,48ns	6,11ns	64,22**
Erro	5,37	0,83	4,20	10,16
CV%	11,54	23,48	35,97	10,74

ns, *, **: não significativo, significativo a 5% e a 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; CV: coeficiente de variação.

Verificou-se que os tratamentos foliares provocaram maior acúmulo de matéria seca no ponteiro em relação aos tratamentos sem inoculação (Tabela 9).

Conforme já constatado na Tabela 8, a interação (doses de N x Manejos da inoculação) promoveu efeito sobre o acúmulo de matéria seca no colmo. De acordo com os desdobramentos dessa interação (Figura 6), constatou-se que a inoculação associada à dose de 120 kg N ha⁻¹ prejudicou o acúmulo de matéria seca no colmo. A inoculação via aplicação foliar sem adubação e associado a 90 kg N ha⁻¹ promoveu incremento significativo de matéria seca no colmo em relação as testemunhas dos respectivos níveis de adubação (0 e 90 kg N ha⁻¹). Já os tratamentos sob 60 kg N ha⁻¹ com e sem inoculação não apresentaram diferença significativa entre si, porém os tratamentos inoculados foram superiores ao sem inoculação em números absolutos.

Interessante observar que os tratamentos com 60, 90 e 120 kg N ha⁻¹ associados ao inoculante acumularam menos matéria seca no colmo, em relação aos tratamentos com os mesmos níveis de adubação sem inoculação, ou seja, a inoculação promoveu maior acúmulo de matéria seca no ponteiro já que não foram observadas diferenças nos valores médios de acúmulo de matéria seca na palhada (Folha). A dose de 60 kg N ha⁻¹ associada ao inoculante via aplicação injetada e via foliar acumulou 6 e 3% a menos de matéria seca no colmo, respectivamente, que o tratamento com a mesma dose de

N sem inoculação, já a dose com 90 kg N ha⁻¹ acumulou 8 e 2% a menos de matéria seca no colmo, e o maior nível de N acumulou 13 e 7% a menos de matéria seca no colmo que os tratamentos adubados sem inoculação. Resultado semelhante foi encontrado por Gonzaga (2012) que verificou que a aplicação do inoculante, por imersão de toletes, provocou menor acúmulo de matéria seca dos colmos comparado ao tratamento sem inoculação. Segundo Oliveira et al. (2009), esse efeito é atribuído à uma interação específica entre hospedeiro e alguns genótipos de cana-de-açúcar, que é causado pela troca de fotoassimilados e nutrientes entre o hospedeiro e a planta.

Tabela 9. Acúmulo de matéria seca por componente da parte aérea da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igarapu do Tietê, SP, 2011-2012.

	Acúmulo de matéria seca	
	Ponteiro	Folha
	Mg ha ⁻¹	
Doses de N (kg ha⁻¹)		
0	3,16 b	5,35
60	4,14 ab	5,99
90	3,75 ab	5,06
120	4,47 a	6,38
Manejo da inoculação		
Sem inoculação	3,59 b	4,85
Injetada	3,68 ab	6,17
Foliar	4,38 a	6,08

Médias seguidas de letra diferente na vertical, dentro de cada atributo (doses de N e Manejo da inoculação), diferem estatisticamente, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Foi observado comportamento quadrático da adubação nitrogenada sem inoculação ($R^2 = 0,70$) para o acúmulo de matéria seca no colmo (Figura 6). O tratamento sob a dose de 120 kg N ha⁻¹ promoveu aumento no acúmulo de matéria seca no colmo de 11,44 Mg ha⁻¹ comparado a testemunha absoluta.

Conforme já constatado na Tabela 8, a interação (doses de N x Manejo da inoculação) promoveu efeito sobre o acúmulo de matéria seca total. De acordo com os desdobramentos dessa interação (Figura 7), constatou-se que apesar da inoculação associada a dose de 120 kg N ha⁻¹ ter prejudicado o acúmulo de matéria seca total, apenas a aplicação do inoculante via injetada obteve diferença significativa em relação ao tratamento com 120 kg N ha⁻¹ sem inoculação.

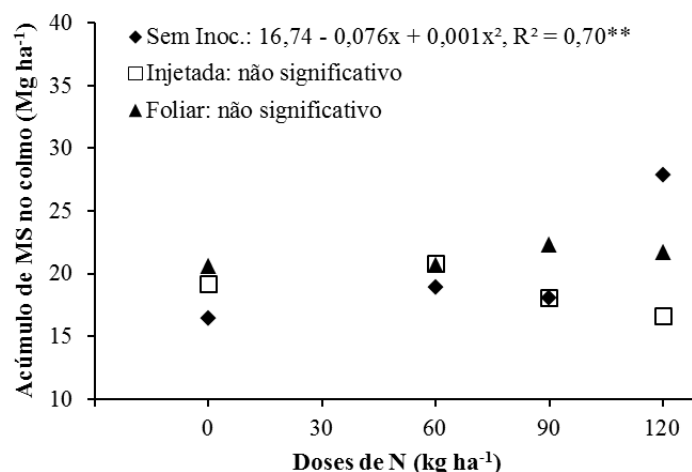


Figura 6. Acúmulo de matéria seca no colmo da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igarapu do Tietê, SP, 2011-2012. **: significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. R^2 : coeficiente de regressão.

De acordo com a análise de regressão (Figura 7), o acúmulo de matéria seca total na variedade RB92579 apresentou comportamento quadrático para a adubação nitrogenada sem inoculação ($R^2 = 0,61$) e associada ao inoculante via aplicação injetada ($R^2 = 0,24$). A diferença no acúmulo de matéria seca total do tratamento sob 120 kg N ha⁻¹ sem inoculação em relação à testemunha sem inoculação foi de 13,95 Mg ha⁻¹, enquanto que o tratamento sob 60 kg N ha⁻¹ com inoculação via injetada promoveu incremento de 6,81 Mg ha⁻¹ em relação à testemunha inoculada via aplicação injetada.

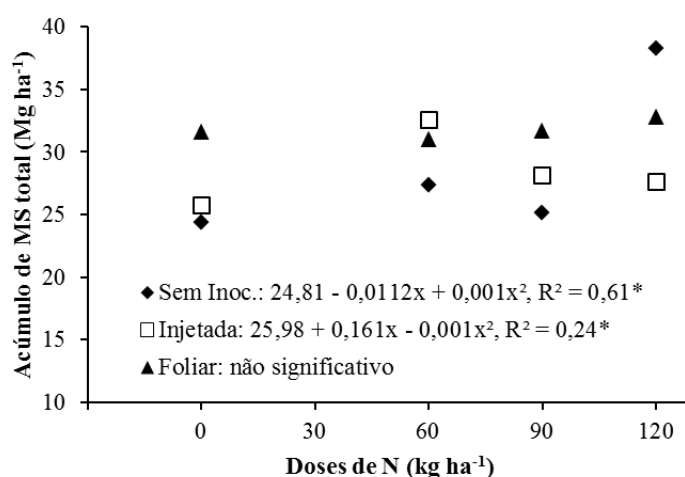


Figura 7. Acúmulo de matéria seca total da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igarapu do Tietê, SP, 2011-2012. *: significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. R^2 : coeficiente de regressão.

6.5 Teor e acúmulo de nitrogênio

Os resultados revelaram que os níveis de adubação e a inoculação não influenciaram significativamente os teores de N nos diferentes componentes da parte aérea da cana-de-açúcar (Tabela 10). O aumento nos teores de N devido a aplicação de N-fertilizante parece esta mais ligada a época de avaliação do material vegetal, que vai esta intimamente ligada com a exigência nutricional da cultura em um dado momento (GAVA et al., 2001).

Tabela 10. Análise de variância do teor de nitrogênio por componente da parte aérea da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igarapu do Tietê, SP, 2011-2012.

Causas da variação	Quadrados Médios		
	Teor de nitrogênio		
	Colmo	Ponteiro	Folhas
Bloco	0,42ns	1,34ns	6,22ns
Doses de N (D)	0,42ns	0,18ns	3,43ns
Manejo da inoculação (M)	0,44ns	4,47ns	1,85ns
D x M	0,31ns	1,18ns	0,82ns
Erro	0,47	1,90	1,43
CV%	18,85	11,29	25,14

ns: não significativo. CV: coeficiente de variação.

Verificou-se que os níveis de adubação influenciaram significativamente no acúmulo de N no colmo ($p < 0,05$), ponteiro ($p < 0,05$) e parte aérea ($p < 0,01$), já o fator manejo da inoculação, promoveu efeito significativo somente para o componente ponteiro ($p < 0,05$). A interação desses dois fatores promoveu efeito significativo a 1 e 5% de probabilidade no acúmulo de N no colmo e na parte aérea, respectivamente (Tabela 11).

O aumento dos níveis de N proporcionou resultado equivalente para o acúmulo de N no ponteiro (Tabela 12). Em relação às maneiras de inoculação, independentemente do nível de adubação, verificou-se que a aplicação do inoculante via foliar promoveu incremento significativo no acúmulo de N no ponteiro.

Tabela 11. Análise de variância do acúmulo de nitrogênio por componente da parte aérea da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igarapu do Tietê, SP, 2011-2012.

Causas da variação	Quadrados Médios			
	Acúmulo de nitrogênio			
	Colmo	Ponteiro	Folhas	Total
Bloco	366,73ns	93,06ns	224,00ns	315,05ns
Doses de N (D)	724,01*	518,04*	396,77ns	4574,55**
Manejo da inoculação (M)	926,33ns	582,59*	381,37ns	1250,48ns
D x M	1017,17**	243,46ns	103,81ns	1453,20*
Erro	277,19	139,25	145,50	551,81
CV%	23,83	24,90	45,27	16,32

ns, *, **: não significativo, significativo a 5% e a 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; CV: coeficiente de variação.

Conforme já discutido, a interação (doses de N X Manejo da inoculação) promoveu efeito significativo para o acúmulo de N no colmo (Tabela 11). De acordo com os desdobramentos dessa interação, apresentado na figura 8, constatou-se que a inoculação associada à dose de 120 kg N ha⁻¹ prejudicou o acúmulo de N no colmo. A inoculação via foliar associada a dose de 90 kg N ha⁻¹ foi superior a inoculação via injetada sob o mesmo nível de fertilizante nitrogenado.

Tabela 12. Acúmulo de nitrogênio por componente da parte aérea da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igarapu do Tietê, SP, 2011-2012.

	Acúmulo de nitrogênio	
	Ponteiro	Folhas
	kg ha ⁻¹	
Doses de N (kg ha⁻¹)		
0	38,57 b	21,01
60	50,86 ab	27,71
90	46,50 ab	23,63
120	53,63 a	34,21
Manejo da inoculação		
Sem inoculação	41,85 b	21,91
Injetada	46,50 ab	31,66
Foliar	53,82 a	26,34

Médias seguidas de letra diferente na vertical, dentro de cada atributo (doses de N e Manejo da inoculação), diferem estatisticamente, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na análise de regressão foi observado comportamento linear positivo da adubação nitrogenada sem inoculação ($R^2 = 0,45$) para o acúmulo de N no colmo (Figura 8). A diferença do N acumulado no colmo pela dose de 120 kg N ha⁻¹ sem inoculação em relação a testemunha sem inoculação foi de 57,54 kg de N.

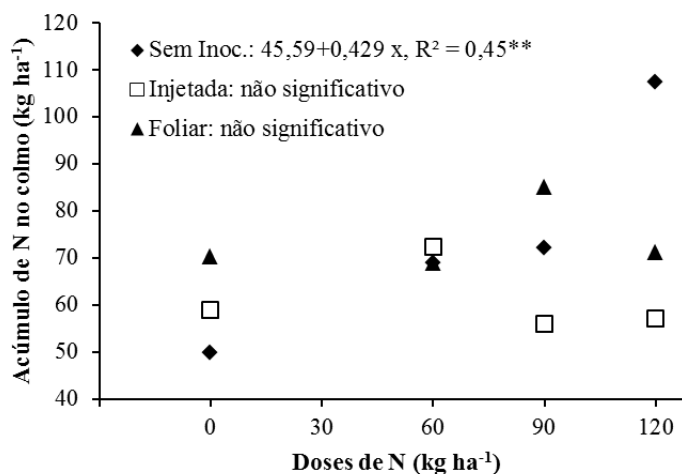


Figura 8. Acúmulo de nitrogênio no colmo da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igarapu do Tietê, SP, 2011-2012. **: significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. R^2 : coeficiente de regressão.

Conforme já constatado, a interação (doses de N X Manejo da inoculação) promoveu efeito significativo para o acúmulo de N total (Tabela 11). De acordo com os desdobramentos dessa interação (Figura 9), constatou-se que o inoculante associado a 120 kg N ha⁻¹ prejudicou o acúmulo de N, porém somente a inoculação via injetada promoveu redução significativa no acúmulo de N total em relação ao tratamento sem inoculação.

No restante dos níveis de adubação (0, 60 e 90 kg N ha⁻¹), o inoculante promoveu incrementos não significativos no acúmulo de N na parte aérea da cana-de-açúcar, inclusive nos tratamentos sem adubação, mostrando que o inoculante foi capaz de contribuir na nutrição nitrogenada da cana-de-açúcar. Corroborando com esses resultados, Silva et al. (2009) observaram incrementos não significativos no acúmulo de N na parte aérea de cana-de-açúcar inoculadas com o inoculante composto de 5 espécies de bactérias diazotróficas (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*) na ausência de adubação nitrogenada.

A extração de N em todas as doses de N aplicadas ultrapassou as quantidades fornecidas via adubação. Esses resultados indicam que outras fontes contribuem na nutrição nitrogenada da cultura, podendo-se destacar o N mineralizado da matéria orgânica do solo e, possivelmente a fixação biológica do N₂ atmosférico (URQUIAGA et al.,1992).

De acordo com a análise de regressão (Figura 9), o acúmulo de N total na variedade RB92579 apresentou comportamento linear positivo para a adubação nitrogenada sem inoculação ($R^2 = 0,48$), enquanto que a adubação nitrogenada associada ao inoculante via aplicação injetada apresentou comportamento quadrático ($R^2 = 0,49$). A diferença do N-total acumulado pela maior dose de N sem inoculação em relação a testemunha sem inoculação foi de 86,46 kg de N, já a dose de 60 kg N ha⁻¹ com inoculação via injetada acumulou 47,27 kg de N em relação a testemunha com inoculação via injetada.

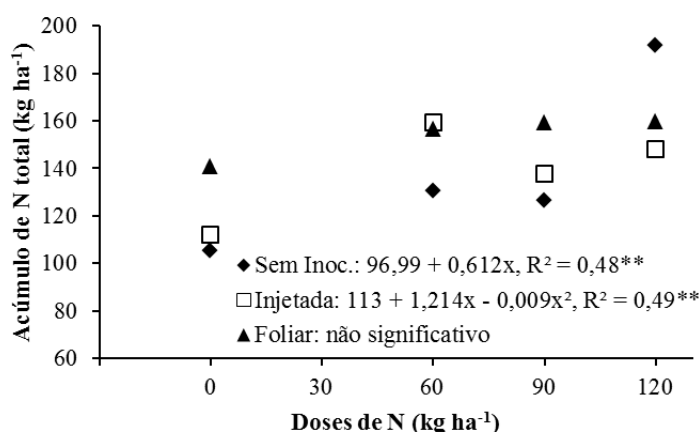


Figura 9. Acúmulo de nitrogênio total da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igarapu do Tietê, SP, 2011-2012. **: significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. R^2 : coeficiente de regressão.

6.6 Atributos tecnológicos

Verificou-se que nenhum dos fatores promoveu efeitos nos atributos tecnológicos estudados (Tabela 13).

No caso da adubação de N, sabe-se que tanto o excesso quanto a deficiência tem influencia nos atributos tecnológicos dos colmos. Na deficiência de N, decresce o teor de umidade da planta, diminuindo a qualidade do caldo, aumenta o teor de fibra, diminui a concentração de sacarose, ocorre acúmulo de sacarose nas folhas e

aumenta a relação folha: colmo. Sob excesso de N, ocorre seu acúmulo no colmo, piora a qualidade do caldo e atrasa a maturação (CARNAÚBA, 1990), entretanto, neste trabalho não foi verificado influência da adubação nitrogenada sobre os atributos tecnológicos da cana-de-açúcar. Segundo KORNDÖRFER e MARTINS (1992), a adubação nitrogenada está normalmente associada ao maior crescimento vegetativo, o que determina, invariavelmente, plantas com maior teor de umidade e maior produtividade. Oliveira (2012) verificou que a aplicação de doses de até 120 kg N ha⁻¹ não influenciou o Brix, Pol e ATR da cana de açúcar.

Tabela 13. Açúcar teórico recuperável (ATR), pureza aparente do caldo (Pureza), teor de sólidos solúveis (Brix), teor de fibra industrial (Fibra) e o teor de sacarose (Pol cana) da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igarapu do Tietê, SP, 2011-2012.

Causas da variação	Quadrados Médios				
	ATR	Pureza	Brix	Fibra	Pol cana
Bloco	23,08ns	1,80ns	0,53ns	0,24ns	0,26ns
Doses de N (D)	38,16ns	3,94ns	0,69ns	0,05ns	0,60ns
Manejo da inoculação (I)	24,95ns	3,58ns	0,57ns	0,06ns	0,39ns
D x M	30,73ns	7,63ns	0,53ns	0,20ns	0,63ns
Erro	23,72	4,7	0,46	0,24	0,40
CV%	3,11	2,52	3,21	4,21	4,10

ns: não significativo. CV: coeficiente de variação.

A inoculação com bactérias fixadoras de N não interferiu no acúmulo de sacarose e nenhum outro parâmetro tecnológico. Os resultados deste ensaio reforçam a hipótese de que a inoculação não influencia as vias de síntese de açúcares SCHULTZ (2012).

6.7 Eficiência do uso de N-fertilizante (EUN)

A eficiência do uso de N-fertilizante variou de acordo com o tratamento (Tabela 14). O inoculante aumentou a eficiência do uso de N-fertilizante sob as doses de 60 e 90 kg N ha⁻¹ como indicado pelo Fator de Produtividade Parcial (FPP), Eficiência Agrônômica (EA), Eficiência de Recuperação (ER) e Eficiência Fisiológica (EF), mas sob 120 kg N ha⁻¹ as maneiras de inoculação prejudicaram a EUN.

Conforme o índice FPP, os melhores resultados foram encontrados sob a dose de 60 kg N ha⁻¹ associado ao inoculante, com destaque para a inoculação via foliar que obteve incremento de 17% na FPP em relação ao tratamento de 60 kg N ha⁻¹ sem inoculação. Em relação à EA os melhores resultados foram observados sob a dose de 60 kg N ha⁻¹ associado ao inoculante aplicado via injetada e via foliar, apresentando valores superiores ao tratamento com 120 kg N ha⁻¹ sem inoculação.

De acordo com ER, que é a relação entre o incremento da absorção de N e quantidade de N aplicado, os melhores resultados foram encontrados sob a dose de 60 kg N ha⁻¹ associado ao inoculante aplicado via injetada e foliar. Já na EF, que é a relação entre o incremento da produção e o incremento da absorção de N aplicado, o maior valor observado foi sob a dose de 60 kg N ha⁻¹ com inoculação via foliar, seguido do tratamento sob a dose de 120 kg N ha⁻¹ sem inoculação.

Tabela 14. Fator parcial de produtividade (FPP), Eficiência agrônômica (EA), Eficiência de recuperação (ER) e a Eficiência fisiológica (EF) da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas maneiras de aplicação. Igarapu do Tietê, SP, 2011-2012.

Dose N kg ha⁻¹	Manejo da inoculação	FPP	EA	ER	EF
0	Sem inoculação	-	-	-	-
	Injetada	-	-	-	-
	Foliar	-	-	-	-
60	Sem inoculação	1427,92	164,58	0,422	389,98
	Injetada	1629,03	365,69	0,901	405,90
	Foliar	1682,22	418,89	0,856	489,34
90	Sem inoculação	916,48	74,26	0,235	315,59
	Injetada	1001,39	159,17	0,364	436,29
	Foliar	1078,52	236,30	0,603	391,28
120	Sem inoculação	979,51	347,85	0,720	482,83
	Injetada	705,21	73,54	0,357	205,61
	Foliar	839,72	208,06	0,454	457,77
Doses de N (kg ha⁻¹)					
0		-	-	-	-
60		1579,72	316,38	0,726	428,40
90		998,7	156,57	0,400	381,05
120		841,48	209,81	0,510	382,07
Manejo da inoculação					
	Sem inoculação	1107,97	195,56	0,459	396,13
	Injetada	1111,87	199,46	0,540	349,26
	Foliar	1200,15	287,75	0,637	446,13

Em relação às médias de cada nível de adubação, independente da associação ou não com o inoculante, os melhores resultados foram encontrados sob a dose de 60 kg N ha⁻¹ em todos os índices estudados (Tabela 14).

Com base no fator parcial de produtividade (FPP) e na eficiência agronômica (EA) a melhor combinação a ser usada foi a aplicação do inoculante via foliar associado a 60 ha⁻¹ de N fertilizante com melhor relação de produção de colmos por kg de N aplicado. Na Índia, Suman et al. (2013) verificaram que o inoculante composto de cinco espécies de bactérias diazotróficas (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*) associado a doses de nitrogênio (0, 75 e 150 kg ha⁻¹), promoveu incremento na produção de colmos e melhorou a eficiência de utilização do N-fertilizante em todos os níveis de adubação, mas o melhor resultado foi observado na dose de 75 kg de N ha⁻¹ associado ao inoculante.

Segundo TRIVELIN e FRANCO (2011), esses índices somente são de valor relativo e de utilidade, quando se pretende comparar diferentes formas de manejo de adubos nitrogenados para uma dose fixa de N. Esses índices não conseguem avaliar o real aproveitamento do N-fertilizante pelas culturas, ou seja, quanto do N-fertilizante é extraído pelas plantas. O real aproveitamento do N-fertilizante pelas culturas somente pode ser avaliado com uso de técnica isotópica com ¹⁵N.

7 CONCLUSÕES

O uso do Inoculante não afeta o teor de nitrogênio nas folhas, conteúdo de clorofila, número de perfilhos, diâmetro dos colmos e nenhum dos atributos tecnológicos avaliados.

O uso do inoculante associado às doses de 60 e 90 kg N ha⁻¹ promove incrementos na produtividade de colmos, acúmulo de matéria seca e nitrogênio, porém a associação do inoculante à dose de 120 kg N ha⁻¹ reduz estas variáveis.

O inoculante aumenta a eficiência de utilização do N-fertilizante sob as doses de 60 e 90 kg ha⁻¹ de N, mas sob 120 kg N ha⁻¹ as maneiras de inoculação prejudicaram a eficiência do uso de Nitrogênio.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, L. R.; MOLIN, J. P. Sensor óptico no auxílio à recomendação de adubação nitrogenada em cana-de-açúcar. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 46, n.12, p. 1633-1642, 2011.

ARAÚJO, S. C. **Realidade e perspectivas para o uso de *Azospirillum* na cultura do milho**. Informações Agronômicas, Piracicaba, n.122, p.4-6, 2008.

ARANTES, M. T. **Potencial produtivo de cultivares de cana-de-açúcar sob os manejos irrigado e sequeiro**. 2012. 65f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração em Agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

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

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

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.3 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.

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.; POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Use of ^{15}N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N_2 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.

BOA SORTE, P. M. F. **Uso da técnica de DGGE para monitorar o estabelecimento de bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas em duas variedades de cana-de-açúcar**. 2009. 56 f. Dissertação (Mestrado/Ciência do Solo) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 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.

CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; VITTI, A. C. Nitrogênio e Enxofre na cultura da cana-de-açúcar. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S.; VITTI, G. C. (Ed.). **Nitrogênio e Enxofre na Agricultura Brasileira**. Piracicaba: IPNI Brasil, 2007, p.355-392.

CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; CONTIN, T. L. M.; DIAS, F. L. F.; ROSSETO, R.; COIMBRA, R. B.; QUAGGIO, J. A. Ammonia volatilisation from urease inhibitor-treated urea applied to sugarcane trash blankets. **Scientia Agricola**, v. 65, p. 397-401, 2008.

CANUTO, E. L.; SALLES, J. F.; OLIVEIRA, A. L. M.; PERIN, L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Respostas de plantas micropropagadas de cana de açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. **Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 67-72, 2003.

CARNAÚBA, B. A. A. O nitrogênio e a cana-de-açúcar. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 8, n. 3, p. 24-41, 1990.

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

CASSMAN, K.G.; PENG, S.; OLKS, D.C.; LADHA, J.K.; REICHARDT, W.; DOBERMANN, A.; SINGH, U. Opportunities for increased nitrogen-use efficiency from improved resource management in irrigated rice systems. **Field Crops Research**, v. 56, p. 7-39, 1998.

CAVALCANTE, R.; KOZUSNY, D. I.; ANDREANI, R.; DA FONSECA, L. Caracterização Fenotípica de Bactérias Diazotróficas Endofíticas Isoladas de Cana de Açúcar. **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, Medellín, v. 64, p. 5803-5813, 2011.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da Cana-de-açúcar**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004 , 307 p.

COJHO, E. H.; REIS, V. M.; SCHENBREG, A. C. G.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture. **FEMS Microbiology Letters**, v.106, p. 341-346, 1993.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar: terceiro levantamento**, dezembro de 2013. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013. 15 p.

DILLEWIJN, C. van. **Botany of Sugar Cane**. Waltham: Chronica Botanica, 1952. 371p.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 22, p.107-149, 2003.

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

FIORAVANTI, C. Os arquitetos da nova cana. **Pesquisa Fapesp**, São Paulo, n. 59, p.29-35, 2000.

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.

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**, v.32, p.2763-2770, 2008.

FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. O.; FARONI, C. E.; OTTO, R.; VITTI, A. C.; OLIVEIRA, E.C.A Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 27., Vera Cruz, 2010. **Proceedings...**Vera Cruz, 2010. p.1-12. v.27.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, Dordrecht, 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.

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

GAVA, G. J. C.; TRIVELI, P. C. O.; VITTI, A. C.; OLIVEIRA, M. W. Recuperação do nitrogênio (15N) da uréia e da palhada por soqueira de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 27, p. 621-630, 2003.

GODOY, L. J. G. **Adubação nitrogenada para produção de tapete de Grama santo agostinho e esmeralda**. 2005. 105f. Tese (Doutorado em Agronomia – Área de Concentração em Agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

GOMEZ-ALVAREZ, F. Correlacion entre algunos niveles de nutrientes el cana de azucar. **Revista de La Facultad de Agronomia**, Maracay, v. 7, p. 5-12, 1974.

GONZAGA, G. B. M. **Avaliação do crescimento inicial da cana-de-açúcar, variedade RB 867515, sob efeito de bactérias endofíticas**. 2012. 53 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal), UFAL – Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, 2012.

GUPTA, V. et al. The water-deficit stress- and red-rot-related genes in sugarcane. **Functional and Integrative Genomics**, Berlin, v. 10, n. 2, p. 207-214, 2010.

GUIMARÃES, S. L. **Aplicação de inoculante turfoso com bactérias diazotróficas e molibdênio em cultivares de arroz adubadas com nitrogênio mineral**. Seropédica, UFRRJ, 2006. Tese de Doutorado. 88p.

HUNGRIA, M.; STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.19, p.819-830, 1997.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.; CHUEIRE, L.; GRANGE, L.; MEGÍAS, M. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brasil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.33, n.5, p.387-394, 2001.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283). (ISSN 1516-781X; N 283).

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: EMBRAPA-SOJA, 2011. 38p. (Documentos EMBRAPA-SOJA, ISSN 2176-2937, n.325).

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

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

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

LANDELL, M. G. A.; PINTO, L. R.; CRESTE, S.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A.; VASCONCELOS, A. C. M.; BIDÓIA, M. A. P.; SILVA, D. N.; SILVA, M. A. **Seleção de novas variedades de cana-de-açúcar e seu manejo de produção**. 2005. 18-24p. (Encarte do Informações Agronômicas Nº 110 – Junho/2005). Disponível em: <[http://www.ipni.org.br/ppiweb/brazil.nsf/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/7759ddc6878ca7eb83256d05004c6dd1/\\$FILE/Enc18-24-110.pdf](http://www.ipni.org.br/ppiweb/brazil.nsf/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/7759ddc6878ca7eb83256d05004c6dd1/$FILE/Enc18-24-110.pdf)> Acesso em: 05 mar. 2014.

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.

LANDELL, M. G. A.; SILVA, M. A. As estratégias de seleção da cana em desenvolvimento no Brasil. **Visão agrícola**. Piracicaba: USP - Esalq, jan.-jun., p. 18-23, 2004.

LIMA, R. C.; ANDREANI, D. I. K.; JUNIOR, R. A.; FONSECA, L. Caracterização Fenotípica de Bactérias Diazotróficas Endofíticas Isoladas de Cana de Açúcar. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, Bogota, v. 64, n. 1, p. 5803-5813, 2011.

MARIN, V. A.; BALDANI V. D.; TEIXEIRA, K. S.; BALDANI, J. **Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical**. Embrapa, 1999.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997. 319 p.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MINOLTA. **Manual for chlorophyll meter SPAD-502**. Minolta Radiometric Instruments iv., Osaka, Japan, 1989, 22p.

MOREIRA, F. M. S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: UFLA, 2008. 768 p.; p.13-42.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.2, p.74-99, 2010.

MOZAMBANI, A. E.; PINTO, A. S.; SEGATO, S. V. E MATTIUZ, C. F. M. História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E. E NÓBREGA, J. C. M. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Ed. Prol, Piracicaba. p. 11-19, 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.

OLIVARES, F. Bactérias promotoras de crescimento vegetal. In: **Boletim Informativo da SBCS**, janeiro – abril, p. 33-35, 2009.

OLIVEIRA, A. C. **Interação da adubação nitrogenada e molíbdica em cana-de-açúcar**. 2012. 96 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciência do Solo), UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2012.

OLIVEIRA, A. L. M. **Inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em duas variedades de cana-de-açúcar sob condições de campo**. 2003. 123 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciência do Solo), UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 2003.

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

OLIVEIRA, A. L. M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 106-113, 2009.

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

ORLANDO-FILHO, J.; HAAG, H. P.; ZAMBELLO, E. JR. **Crescimento e absorção de macronutrientes pela cana-de-açúcar, variedade CB 41-76 em função de idade em solos do Estado de São Paulo**. Bol. Técnico no 2, 128 p., Planalsucar, Piracicaba, SP, 1980.

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

PEDÓ, T.; BORELLA, J.; AUMONDE, T. Z.; AMARANTE, L.; MORAES, D. M.; MORSELLI, T. B. G. A.; MAUCH, C. R. Crescimento de mudas de repolho e teores de pigmentos fotossintéticos sob influências de fontes de nitrogênio. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.6, n.1, p.23-27, 2012.

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.

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

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, abr-jun, 2013.

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.

PORRA R. J.; THOMPSON W A.; KRIEDMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 975, p. 384-394, 1989.

PÔRTO, M. L.; PUIATTI, M.; FONTES, P. C. R.; CECON, P. R.; ALVES, J. C.; ARRUDA, J. A. Índice SPAD para o diagnóstico do estado de nitrogênio na cultura da abobrinha. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 29, n. 3, p. 311-315, 2011.

PRADO, H. Pedologia fácil aplicações na agricultura. 2. ed. Piracicaba: 2008. 145p.

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

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H. Outras culturas industriais. In: RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2.ed. Campinas: IAC, 1997. p.189-203. (IAC. Boletim técnico, 100).

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 JUNIOR, 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.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Reton, v.19, p.227-247, 2000.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L. **Vias de penetração e infecção de plantas por bactérias.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 34p. (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 12th 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.; 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).

RESENDE, A. S. **A fixação biológica de nitrogênio (FBN) como suporte da fertilidade nitrogenada dos solos e da produtividade da cultura de cana-de-açúcar: uso de adubos verdes**. 2000. 101 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2000.

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

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.

SARTORI, R. H. **Eficiência de uso de nitrogênio e enxofre pela cana-de-açúcar (primeira e segunda rebrota) em sistema conservacionista (sem queima)**. 2010. 112 p. Tese (Doutorado em Ciências – Área de Concentração em Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear da Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SABINO, D. C. C. **Metabolismo de nitrogênio em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) em associação com bactérias diazotróficas endofíticas**. 2003. 50 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2003.

SCHUBERT, K. R. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.37, p.539-574, 1986.

SCHULTZ, N.; PEREIRA, M. G; ZONTA, E; LIMA, E. Efeito residual da adubação na cana planta e da adubação nitrogenada e potássica na cana-soca colhidas com e sem a queima da palhada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, p.811-820, 2010.

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.

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

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

SILVA, M. F.; OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R; RUMJANEK, N. G; REIS, V. M. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 11, p. 1437-1443, 2009.

SIMIÕES NETO, D. E.; MELO, L. J.O. T. **Lançamentos de novas variedades RB de cana-de-açúcar**. Recife:UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. 28p.

SOCICANA. Associação dos Fornecedores de Cana de Guariba. **Características Agrônômicas das Variedades SP**. 2010. Disponível em: <<http://www.socicana.com.br/variedadescana/2012-10-31-11-22-CatalogodeVariedadesRB.pdf> Acesso em: 11 fev. 2014.>

SOUZA, E. L. L; MACEDO, I. **Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética**. UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar São Paulo: 2010, 314 p.

STOLF, R. Metodologia de avaliação de falhas nas linhas de cana-de-açúcar. **STAB**, Piracicaba, v.4, n.6, p.22-36,1986.

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

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

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p

TRIVELIN, P. C. O. **Utilização do nitrogênio pela cana-de-açúcar: três casos estudados com uso do traçador ¹⁵N**. 2000. 143p. Livre docência, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

TRIVELIN, P. C. O.; FRANCO, H. C. J. **Adubação Nitrogenada e a Sustentabilidade de Agrossistemas**. In: FILHO, O. K.; MAFRA, A. L.; GATIBONI, L. C. (Org.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2011. v. 7, p.193-219.

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, n.1, p.105-114, 1992.

URQUIAGA, S.; LIMA, R. de M.; XAVIER, R. P.; RESENDE, A. S. de; ALVES, B. J. R. BODDEY, R. Avaliação da eficiência do processo de fixação biológica de nitrogênio em diferentes variedades de cana-de-açúcar. **Agronomia**, v.37, p. 55 - 58, 2003.

XAVIER, R. P. **Adubação verde em cana-de- açúcar: influência na nutrição nitrogenada e na decomposição dos resíduos da colheita**. 2002. 78f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2002.

VITTI, A. C.; CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; ROSSETO, R. Nitrogênio. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.) **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 2008. Parte 5, cap. 10, p. 239-270.

9 ANEXOS

Tabela 1. Porcentagem de falhas (F%) da cana-de-açúcar, variedade RB92579, sob aplicação de doses de nitrogênio associadas ou não a bactérias diazotróficas em duas épocas e maneiras de aplicação. Igaraçu do Tietê, SP, 2011-2012.

Tratamento	F%
Test. absoluta	31,67
Injetada	19,58
Foliar	29,58
60 N	20,21
60 N + Injetada	23,54
60 N + Foliar	30,00
90 N	22,08
90 N + Injetada	28,13
90 N + Foliar	20,00
120 N	21,88
120 N + Injetada	32,29
120 N + Foliar	17,50