

UFRRJ

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

TESE

**Fixação Biológica de Nitrogênio e Eficiência de Uso
de Nitrogênio em Duas Variedades de Cana-de-
Açúcar Inoculadas com Bactérias Diazotróficas**

Edevaldo de Castro Monteiro

2019



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

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E EFICIÊNCIA DE USO DE
NITROGÊNIO EM DUAS VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR
INOCULADAS COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS**

EDEVALDO DE CASTRO MONTEIRO

Sob a Orientação do Pesquisador
Segundo Sacramento Urquiaga Caballero

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2019

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

Ficha catalográfica elaborada
Com os dados fornecidos pelo(a) Autor(a)

M775f Monteiro, Edevaldo de Castro, 1991-
Fixação Biológica de Nitrogênio e Eficiência de Uso de Nitrogênio em Duas
Variedades de Cana-de-Açúcar Inoculadas com Bactérias Diazotróficas /
Edevaldo de Castro Monteiro.– Seropédica, 2019.
69f. : il.

Orientador: Segundo Sacramento Urquiaga Caballero.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, 2019.

1. Espectrometria de Massa - Isótopos. 2. FBN. 3. Produtividade de Cana-de-
Açúcar. 4. Eficiência de Uso de Nitrogênio. 5. Inoculação com Bactérias
Diazotróficas. I. Caballero, Segundo Sacramento Urquiaga, 1950-, orient. II.
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. III. Título.

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.**

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.

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

EDEVALDO DE CASTRO MONTEIRO

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

TESE APROVADA EM 27/02/2019.

Segundo Sacramento Urquiaga Caballero. Dr. Embrapa Agrobiologia
(Orientador)

Nivaldo Schultz. Dr. UFRRJ

Veronica Massena Reis. Dra. Embrapa Agrobiologia

Márcio Reis Martins. Dr. Embrapa Agrobiologia

Cláudia Pozzi Jantalia. Dra. Embrapa Agrobiologia

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciências do Solo – PPGA-CS.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, por meio do edital CAPES-EMBRAPA (2015).

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Agrobiologia).

Ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Ao orientador, pesquisador e professor Dr. Segundo Urquiaga e a Dra. Veronica Massena Reis pela dedicação, exemplo, experiência e comprometimento com a pesquisa brasileira.

Ao Dr. Nivaldo Schultz, Dra. Cláudia Pozzi Jantalia e Dr. Márcio dos Reis Martins pela disponibilidade, auxílio e contribuições para a tese.

A todos os pesquisadores e professores que contribuíram por mais uma etapa profissional.

Aos colegas do grupo de pesquisa de Ciclagem de Nutrientes da Embrapa Agrobiologia, agradeço pelo empenho e prontidão.

Agradeço meus pais João Batista Monteiro e Maria dos Anjos de Castro Monteiro pela educação, confiança, luta e superação: exemplos de vida.

Aos irmãos Valdeberto de Castro Monteiro e Josânea de Castro Monteiro pela jornada de vida, convivência, escolhas e momentos de superação.

Agradeço a minha namorada Erica Ap^a Hott, por ser uma pessoa maravilhosa, a qual mostrou paciência e discernimento para que os momentos aconteçam.

No geral agradeço a todas as instituições de educação, ensino e pesquisa pelo qual tenho feito parte.

Obrigado a todos!

RESUMO GERAL

MONTEIRO, Edevaldo de Castro. **Fixação biológica de nitrogênio e eficiência de uso de nitrogênio em duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas.** 2019. 69f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Um dos fatores responsáveis pela baixa produtividade da cana-de-açúcar no Brasil é o suprimento inadequado de nitrogênio (N). Nesse contexto, estudos com fixação biológica de nitrogênio (FBN) nessa cultura têm grande relevância. Os objetivos do presente trabalho foram: (i) Avaliar o acúmulo de massa seca, nitrogênio total e a eficiência do uso de N de duas variedades comerciais de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. (ii) Avaliar plantas de referência e a estratégia de amostragem de diferentes partes das plantas de cana-de-açúcar para quantificação da FBN por abundância natural de ^{15}N em variedades inoculadas ou não com bactérias diazotróficas. O experimento foi conduzido em condições de vasos com uso de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar em vasos contendo 100 kg de solo proveniente da camada de 0-40 cm de um Argissolo Vermelho-Amarelo. No primeiro capítulo, testou-se o efeito interativo da inoculação (com e sem) e da fertilização nitrogenada (0 e 45 kg N ha⁻¹, sulfato de amônio com 2% átomos ^{15}N em excesso) no acúmulo de N e na produtividade de duas variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579) colhidas aos 90, 180, 270 e 360 dias após transplante (DAT) e também foram determinados os valores de $\delta^{15}\text{N}$ nas raízes, folhas, palha e em três frações de colmos (inferior, médio e superior) na última colheita, aos (360 DAT) nos vasos sem fertilização nitrogenada. No segundo capítulo, determinou-se a % átomos de ^{15}N em excesso nas raízes, folhas, palha e em três frações de colmos (inferior, médio e superior) na última colheita da cana (360 DAT), e determinou-se a eficiência do uso de N (EUN), nas parcelas que receberam fertilização nitrogenada. Adição de N-fertilizante esporadicamente inibiu, ou até mesmo causou efeito antagônico da inoculação, em algumas variáveis de crescimento (diâmetro de colmo, massa seca de folha e palha, teor e acúmulo de N na folha), porém sem efeito significativo na produtividade de colmos. A FBN contribuiu, em média, com 48% do N acumulado na variedade RB92579 e com 46% na variedade RB867515. Não se verificou variação significativa de abundância natural de ^{15}N do N disponível do solo (7,8 $\delta^{15}\text{N}$) estimado pelas plantas de referência (sorgo, milho e braquiária). Por outro lado, houve variação nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ nas diferentes partes da planta de cana-de-açúcar, indicando que a estratégia amostral para quantificação de FBN pela técnica da abundância natural de ^{15}N deve considerar a planta inteira. No entanto, quando houve enriquecimento artificial da planta com ^{15}N proveniente do fertilizante para estudo da EUN, não se verificou variação significativa nos valores de átomos de ^{15}N em excesso nas diferentes partes da planta. Isso indica que, em estudos de recuperação de ^{15}N proveniente de fertilizante, pode-se amostrar apenas partes específicas da planta, representando significativa redução no tempo e no custo com amostragem e análise. A EUN foi de 60% para as duas variedades, sem influência da inoculação. Estudos com outras variedades e em diferentes condições de solo e clima devem ser feitos para definição de cenários com maior possibilidade de benefício da inoculação na cultura da cana-de-açúcar com bactérias diazotróficas.

Palavras-chave: Espectrometria de massas. FBN. Produtividade de cana. Fertilizante marcado. Isótopos. *Poaceae*. Inoculação com bactérias diazotróficas.

GENERAL ABSTRACT

MONTEIRO, Edevaldo de Castro. **Biological nitrogen fixation and nitrogen use efficiency in two sugarcane varieties inoculated with diazotrophs**. 2019. 69.p. Thesis (Doctor in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

One of the factors responsible for the low levels of sugarcane yield in Brazil is the inadequate supply of N. In this context, studies about BNF in this crop have scientific relevance. The objectives of the current research were: (i) to evaluate the interactive effect of N fertilization and diazotrophic bacteria in the accumulation of N and the yield in two commercial varieties, (ii) to evaluate non-fixing plants and the strategy of sampling in different parts of sugarcane plants to estimate BNF using the ^{15}N natural abundance technique in sugarcane plant inoculated or not with diazotrophic bacteria. The experiment was carried out in vases conditions with sugarcane from pre-sprouted seedlings in pots containing 100 kg of soil from 0-40 cm layer of an Ultisol. In the first chapter, the tested effect of inoculation (with and without) and N (0 and 45 kg N ha⁻¹, ammonium sulphate with 2% excess of ^{15}N atoms) in the accumulation and in the yield of two sugarcane varieties (RB867515 e RB92579) harvested at 90, 180, 270 and 360 days after transplanting (DAT). In the second chapter, the $\delta^{15}\text{N}$ values were determined in roots, leaves, straw and in three stalk fractions (bottom, medium and upper) in the last sugarcane harvesting (360 DAT) in pots without N fertilization e the excess % of ^{15}N atoms was determined in the same sugarcane parts and harvesting, although only in the pots fertilized with N. The addition of N-fertilizer sporadically inhibited or even caused an antagonistic effect of inoculation in some growth variables (stalk diameter, leaf dry matter, straw dry matter, N content and accumulation in leaf), but with no significant effect on stalk yield. The BNF contributed, on average, with 48% of the N accumulated in the variety RB92579 and 46% in the variety RB867515. There was no significant variation in the ^{15}N natural abundance of available N in the soil estimated by different non-fixing plants. On the other hand, there was a significant variation in the values of $\delta^{15}\text{N}$ in different parts of sugarcane plant, indicating that the sampling strategy for BNF quantification by ^{15}N natural abundance technique should consider the whole plant. However, when there was enrichment of the plant with ^{15}N from the fertilizer to study the NUE, no significant variation in the values of excess ^{15}N atoms in the different parts of the plants was observed. This indicates that, in fertilizer ^{15}N recovery studies, only specific parts of the plant can be sampled, representing a significant reduction in the time and cost of sampling and analysis. The NUE was 60% for both varieties, with no significant effect of inoculation. Studies with other varieties and in different soil and climate conditions are still needed to define scenarios with greater possibility of positive effect of inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria.

Keywords: Mass spectrometry. BNF. Sugarcane productivity. Labeled fertilizer. Isotopes. Poaceae. Diazotrophic Bacteria Inoculation.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Climograma da região de Seropédica-RJ.....	18
Figura 2. a) Minitoletes no substrato para brotamento; b) e c) Germinação dos minitoletes; d) Mudanças crescidas; e) Mudanças com 1ª poda de formação; e f) Estágio no qual as mudas foram para transplantadas.	21
Figura 3. a) Aspecto das mudas pré-brotadas; b) Montagem do experimento no campo em setembro de 2015; c) Desenvolvimento das mudas de cana-de-açúcar aos trinta e dois dias após transplante nos vasos.....	21
Figura 4. a) Aspecto da cana-de-açúcar a campo aos setenta dias após o transplante; b) Vista geral da área do experimento; c) Caracterização da altura da cana-de-açúcar.	22
Figura 5. Representação dos tratamentos experimentais para avaliação do acúmulo de massa seca e nitrogênio total.	24

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Massa fresca de colmo, massa seca e acúmulo de n total das plantas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e fertilização nitrogenada, em duas variedades aos 360 dat.	25
Tabela 2. Efeito da inoculação e da fertilização nitrogenada na altura e diâmetro da planta de cana-de-açúcar (<i>saccharum</i> spp.) Em duas variedades e quatro épocas de colheita.	26
Tabela 3. Desdobramento do efeito da interação entre inoculação e fertilização nitrogenada no diâmetro de colmo na variedade rb867515, aos 270 dat.	27
Tabela 4. Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas e da fertilização nitrogenada na produção de massa seca de diferentes partes das plantas de cana-de-açúcar (<i>saccharum</i> spp.) Na variedade rb92579, em quatro épocas de colheita.	27
Tabela 5. Desdobramento do efeito da interação entre inoculante e fertilização nitrogenada quanto a massa seca de palha na variedade rb92579, aos 180 dat.	28
Tabela 6. Efeito da inoculação e da fertilização nitrogenada na produção de massa seca de diferentes partes das plantas de cana-de-açúcar (<i>saccharum</i> spp.) Na variedade rb867515, em quatro épocas de colheita.	29
Tabela 7. Desdobramento do efeito da interação entre inoculação e fertilização nitrogenada quanto a massa seca da folha e palha na variedade rb867515.	30
Tabela 8. Efeito da inoculação e da fertilização nitrogenada quanto ao acúmulo de n nas diferentes partes das plantas de cana-de-açúcar (<i>saccharum</i> spp.) Na variedade rb92579, em quatro épocas de colheita.	31
Tabela 9. Desdobramento do efeito da interação entre inoculação e fertilização nitrogenada no acúmulo de n na folha na variedade rb92579.	32
Tabela 10. Efeito da inoculação e da fertilização nitrogenada quanto ao acúmulo de n nas diferentes partes da cana-de-açúcar (<i>saccharum</i> spp.) Na variedade rb867515, em quatro épocas de colheita.	33
Tabela 11. Desdobramento do efeito da interação entre inoculação e fertilização nitrogenada quanto ao acúmulo de n na folha na variedade rb867515.	34
Tabela 12. Total de massa seca e acúmulo de n das plantas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e fertilização nitrogenada, em duas variedades aos 360 dat.	35
Tabela 13. Valores de % átomos ¹⁵ n excesso em plantas de cana-de-açúcar como efeito da adubação com ¹⁵ n-fertilizante, com e sem inoculação com bactérias diazotróficas, em duas variedades da cultura.	35
Tabela 14. Desdobramento do efeito da interação entre inoculação e parte da planta de cana-de-açúcar na variedade rb867515 quanto % átomos ¹⁵ n em excesso.	36
Tabela 15. Valores de n proveniente da planta derivado do fertilizante (nddf), quantidade de n derivado do fertilizante (qnddf) e eficiência de uso do n ou recuperação (eun) do ¹⁵ n-fertilizante pela planta, em duas variedades de cana-de-açúcar, com e sem inoculação com bactérias diazotróficas.	37
Tabela 16. Massa seca e acúmulo de n em duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas ou não com bactérias diazotróficas.	45
Tabela 17. N acumulado em diferentes partes da planta de cana-de-açúcar inoculada e não inoculada com bactérias diazotróficas em duas variedades aos 360 dat.	45
Tabela 18. Desdobramento da interação entre inoculação e parte da planta de cana-de-açúcar referente à quantidade de n acumulado (g/vaso) na variedade rb867515.	46

Tabela 19. Valores de $\delta^{15}\text{n}(\text{‰})$ de plantas controle cultivadas em casa de vegetação (copos) e no campo (vasos) e valores de $\delta^{15}\text{n}$ do n disponível no solo.	46
Tabela 20. Valores de $\delta^{15}\text{n}$ em duas variedades de cana-de-açúcar, inoculadas e não inoculadas com bactérias diazotróficas, cultivadas em vasos, aos 360 dat.	47
Tabela 21. Desdobramento da interação entre inoculação e partes da planta de cana-de-açúcar referente aos valores de $\delta^{15}\text{n}$ em duas variedades aos 360 dat.	48
Tabela 22. Estimativa de fbn na cultura de cana-de-açúcar em duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas e não inoculada com bactérias diazotróficas.	49
Tabela 23. Efeito da inoculação e da fertilização nitrogenada nos teores de n na planta de cana-de-açúcar (<i>saccharum</i> spp.) Na variedade rb92579, em quatro épocas de colheita.	67
Tabela 24. Desdobramento da interação entre inoculante e fertilizante nitrogenado quanto ao teor de n em diferentes partes da planta de cana-de-açúcar na variedade rb92579.	68
Tabela 25. Efeito da inoculação e da fertilização nitrogenada quanto ao teor de n na cana-de-açúcar (<i>saccharum</i> spp)na variedade rb867515, em quatro épocas de colheita.	68
Tabela 26. Desdobramento da interação entre inoculante e fertilização nitrogenada quato ao teor de n na raiz, colmo e folha na variedade rb867515.	69

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL	3
2.1 A Cultura da Cana-de-Açúcar	3
2.2 Adubação Nitrogenada na Cultura da Cana-de-Açúcar	3
2.3 Microrganismos na Cultura da Cana-de-Açúcar	4
2.4 Contribuição da FBN na Cana-de-Açúcar	5
2.5 Uso de Inoculante na Cultura de Cana-de-Açúcar	7
2.6 Técnicas Isotópicas de ^{15}N na Cultura de Cana-de-Açúcar	10
2.6.1. Abundância natural de ^{15}N	10
2.6.2 Diluição isotópica de ^{15}N	11
2.7. Eficiência no Uso do N-fertilizante na Cultura da Cana-de-Açúcar	12
3. CAPÍTULO I ACÚMULO DE MASSA SECA, NITROGÊNIO TOTAL E EFICIÊNCIA DE USO DE ^{15}N EM CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADAS COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS	14
3.1 RESUMO	15
3.2 ABSTRACT	16
3.3 INTRODUÇÃO	17
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.4.1 Caracterização da área do experimento	18
3.4.2 Preparo do solo	18
3.4.3 Produção de mudas pré-brotadas (MPB)	19
3.4.4 Preparo do Inoculante e Inoculação	20
3.4.5 Avaliações agronômicas	22
3.4.6 Experimento de vaso - determinação do enriquecimento de ^{15}N nos tecidos vegetais (% átomos ^{15}N em excesso)	23
3.4.7 Determinação da eficiência de uso do ^{15}N -fertilizante	23
3.4.8 Delineamento experimental e análises estatísticas	24
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
3.6 CONCLUSÕES	38
4. CAPÍTULO II USO DA TÉCNICA DE ABUNDÂNCIA NATURAL DE ^{15}N PARA QUANTIFICAR A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NA CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADA COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS	39
4.1 RESUMO	40
4.2 ABSTRACT	41
4.3 INTRODUÇÃO	42
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.4.1 Experimento em vasos - estimativa da FBN pela técnica de abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$)	43
4.4.2 Determinação dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ em plantas de referência	43

4.4.3 Determinação da massa seca e acúmulo de N aos 360 DAT	44
4.4.4 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	44
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.6 CONCLUSÕES	50
5. CONCLUSÕES GERAIS	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
7. ANEXOS	67

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), é cultivada em quase todas as regiões agrícolas brasileiras, sendo o Brasil o maior produtor mundial. Estima-se que a área cultivada com a cana-de-açúcar no Brasil está em 8,66 milhões de hectares, com aproximadamente 635 milhões de toneladas (Safrá 2018/2019) e produtividade média de 73 Mg ha⁻¹ (CONAB, 2018).

Nos últimos anos têm sido grandes avanços em pesquisas sobre fixação biológica de nitrogênio (FBN) na cana-de-açúcar, entretanto, existe grande variabilidade dos resultados obtidos (URQUIAGA et al., 2012). Portanto, buscas por informações sobre a real contribuição da FBN na nutrição e no potencial produtivo da cultura são necessárias. As bactérias diazotróficas reconhecidas pela capacidade de fixar N₂ e disponibilizá-lo aos vegetais são comumente encontradas em associações com cultura da cana-de-açúcar, e podem ser isoladas e caracterizadas para compor inoculantes, aumentando assim seus efeitos benéficos à cultura.

Estudos indicam que a inoculação de bactérias diazotróficas traz benefícios ao crescimento e a produtividade de cana-de-açúcar, pois pode aumentar a contribuição da FBN e parcialmente reduzir a aplicação de N necessário ao seu desenvolvimento (MEDEIROS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2006). Além disso, por meio de mecanismos ligados à promoção de crescimento vegetal, essas bactérias podem promover aumento de produtividade (GÍRIO et al., 2015; SCHULTZ et al., 2018; PEREIRA et al., 2018).

No entanto, aumentar a eficiência do uso de N é um desafio e a utilização de bactérias diazotróficas, torna-se uma opção que contribui para redução de fertilizantes nitrogenados, agroquímicos e colabora com a produção sustentável na agricultura (JAMES e BALDANI, 2012; AHMED; KIBRET, 2014).

Muitos dos questionamentos feitos sobre o assunto dizem respeito aos métodos de avaliação da contribuição da FBN na cultura da cana-de-açúcar. Esta cultura não produz nenhuma estrutura específica que serviria como indicador adicional sobre a contribuição da FBN, tal como ocorre nos nódulos nas leguminosas. Além disso, estudo prévio sobre a quantificação da contribuição da FBN associadas à esta cultura foram empregadas como testemunhas diferentes espécies de plantas espontâneas que crescem nos canaviais. A hipótese foi de que o N extraído do solo por estas espécies apresenta a mesma marcação com ¹⁵N do N extraído do solo pela cana-de-açúcar (BODDEY et al., 2001; URQUIAGA et al., 2012).

Atualmente, foi lançada uma tecnologia que é o sistema de produção de mudas pré-brotadas (MPB) de cana-de-açúcar lançado pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), que visa à produção de mudas a partir de gemas individualizadas que permite a aplicação de técnicas sanitárias, o que garante melhor qualidade das mudas, além de redução do montante gasto com colmos e com a manutenção da do plantio desuniforme (LANDELL et al., 2012). No entanto, há uma grande demanda por insumos, dentre eles, N-fertilizantes, situação em que o uso de bactérias diazotróficas pode contribuir na redução de custos na obtenção das mudas e proporcionar a qualidade da mesma.

As hipóteses consideradas nesta tese foram: (i) A resposta agrônômica da cana-de-açúcar à inoculação de mudas pré-brotadas com bactérias diazotróficas é influenciada pela fertilização nitrogenada, podendo a inoculação além de promover a FBN, aumentar a eficiência da adubação nitrogenada; (ii) O valor de $\delta^{15}\text{N}$ varia em diferentes partes da planta de cana-de-açúcar exigindo uma estratégia adequada para uma estimativa acurada da FBN pela técnica de abundância natural de ¹⁵N; (iii) O valor de $\delta^{15}\text{N}$ do solo independe da espécie de referência usada; e (iv) que a inoculação de bactérias diazotróficas em mudas de cana-de-açúcar aumenta a FBN nesta cultura; e (v) a inoculação com bactérias diazotróficas influencia

a eficiência de uso de N na cultura de cana-de-açúcar e que a proporção de ^{15}N varia nas diferentes partes da planta.

A tese foi organizada em dois capítulos, sendo eles: Capítulo I-Acúmulo de massa seca, nitrogênio total e eficiência de uso de ^{15}N em cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e Capítulo II-Uso da técnica de abundância natural de ^{15}N para quantificar a fixação biológica de nitrogênio na cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas.

Os objetivos deste trabalho foram:

(i) Avaliar o acúmulo de massa seca, nitrogênio total e a eficiência do uso de N de duas variedades comerciais de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas em quatro épocas de colheita.

(ii) Avaliar plantas de referência e a estratégia de amostragem de diferentes partes das plantas de cana-de-açúcar para quantificação da FBN pela técnica de abundância natural de ^{15}N em duas variedades inoculadas ou não com bactérias diazotróficas.

2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL

2.1 A Cultura da Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é pertencente à família Poaceae originária do sudeste da Ásia sendo cultivada em quase todas as regiões agrícolas brasileiras. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e líder em exportação. O atual cenário da cana-de-açúcar na safra 2018/2019 é de produtividade média estimada de 73 Mg ha⁻¹ considerando uma área de 8,66 milhões de hectares e produção total de 635 milhões de toneladas (CONAB, 2018).

Atualmente o setor conta com 432 usinas em funcionamento, englobando aproximadamente 70 mil fornecedores de matéria prima para a indústria sucroenergética, gerando 1,28 milhões de empregos diretos e um Produto Interno Bruto de 28 bilhões de dólares, o que evidencia e torna o setor canavieiro o mais importante do agronegócio brasileiro, levando em conta o valor de produção. Aliado a este fato é também uma cultura estratégica para o Brasil, considerando a conversão da cana-de-açúcar em açúcar, etanol e bioeletricidade, possibilitando a utilização total de seus resíduos, tendo seus derivados contribuindo com a oferta interna de energia (ÚNICA, 2018; EPE, 2011; NEVES; TROMBIN, 2014).

Em estudos realizados foi determinado que a baixa resposta à aplicação de fertilizantes nitrogenados na cultura da cana-de-açúcar ocorre durante o primeiro ano de cultivo. Isso se deve ao N oriundo da mineralização da matéria orgânica do solo (BASANTA et al., 2003), da palhada, acumulado nos toletes e no sistema radicular (TRIVELIN et al., 2002) e da contribuição da FBN por bactérias associadas a cultura (BODDEY et al., 2001, 2003, URQUIAGA et al., 1992; 2012). A FBN é um dos principais fatores responsáveis por tornar a cana-de-açúcar brasileira uma das culturas mais eficientes culturas na produção energética do mundo (BALDANI et al., 2009).

2.2 Adubação Nitrogenada na Cultura da Cana-de-Açúcar

O N está entre os nutrientes mais exigidos pela cultura da cana-de-açúcar, pois faz parte dos aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, participando direta ou indiretamente de processos bioquímicos e na energia necessária à produção de carboidratos e esqueletos carbônicos (MALAVOLTA et al., 1997).

A cultura da cana-de-açúcar acumula elevada quantidade de N, chegando aproximadamente a 200 kg N ha⁻¹ no ciclo de cana-planta e de 120 a 180 kg N ha⁻¹ nas soqueiras (ORLANDO FILHO et al., 1980; URQUIAGA et al., 1992). Segundo Cantarella e Rosseto (2010), a exigência em N é de aproximadamente 2,1 a 2,4 kg por tonelada de colmo. Importante ressaltar, que o Brasil tem uma forte dependência das importações de fertilizantes nitrogenados (ANDA, 2018).

O N acumulado na parte aérea da cana-de-açúcar é exportado nos colmos destinados à indústria, representando 70 % aproximadamente (SCHULTZ et al., 2010). No Brasil as doses de N aplicadas no cultivo de cana-de-açúcar são de 30 kg N ha⁻¹ na cana-planta e 70 kg N ha⁻¹ nas soqueiras (RESENDE et al., 2006), e que ao longo do tempo há de ocorrer a depleção de N do solo e redução de produtividade, haja vista que a deficiência do N limita o potencial produtivo das plantas (URQUIAGA et al., 1992). Estudos estimaram que a cultura da cana-de-açúcar a elevada capacidade de acumular N mesmo em condições restritas de N no solo, reforçou a evidência de que a cana-de-açúcar possuía elevada contribuição do processo de FBN (BODDEY et al., 2001; URQUIAGA et al., 2012).

2.3 Microrganismos na Cultura da Cana-de-Açúcar

Os microrganismos da rizosfera são estudados devido aos seus efeitos benéficos na sanidade, crescimento e desenvolvimento das plantas. Estes são: bactérias fixadoras de N₂, fungos micorrízicos, bactérias promotoras de crescimento vegetal, organismos de controle biológico, fungos micoparasíticos e protozoários (MENDES et al., 2013). Os microrganismos são componentes-chaves de toda a vida multicelular devido ao seu papel crucial no ciclo de nutrientes e no metabolismo vegetal (AINSWORTH et al., 2010; THOMPSON et al., 2014). Por muitas décadas, os microrganismos isolados naturalmente associados às plantas têm demonstrado desempenhar papéis fundamentais no crescimento, desenvolvimento e saúde das plantas (MENDES et al., 2011).

O uso dos microrganismos na agricultura pode maximizar o crescimento vegetal, auxiliar na absorção de nutrientes e conferir resistência a estresse abiótico (CUMMINGS, 2009). Interações na região rizosférica entre planta e microrganismos são mediadas de forma direta ou indiretamente por exsudados liberados pelas raízes da planta (BADRI et al., 2013; CHAPARRO et al., 2013; HUANG et al., 2014), podendo ser benéficos, nocivos ou neutros, de acordo com os seus efeitos sobre o desenvolvimento das plantas (DOBBELAERE et al., 2003). Os microrganismos associam a diferentes espécies de plantas e graus de especificidade podendo ser classificadas como: de vida livre, associativas e simbióticas (MOREIRA et al., 2010).

As bactérias diazotróficas são organismos procariotos que têm a capacidade de fixar o N atmosférico tornando-o disponível à planta na forma de amônio (NH₄⁺) (MOREIRA et al., 2010; BULGARELLI et al., 2013). Estes organismos podem ser de vida livre no solo ou se associar às raízes de espécies vegetais. Quando associados, podem estabelecer simbioses ou colonizar endofiticamente os tecidos vegetais (BHATTACHARJEE et al., 2008; JOHNSTON-MONJE e RAIZADA, 2011). As bactérias diazotróficas rizosféricas são aquelas que colonizam o solo próximo às raízes; as bactérias diazotróficas epifíticas colonizam a superfície dos tecidos vegetais; enquanto que as endofíticas são aquelas capazes de colonizar internamente os tecidos vegetais sem causar sintomas de doenças (DOBEREINER, 1992; BALDANI et al., 1997; JOHNSTONE-MONJE e RAIZADA, 2011).

Estimam-se que existem 2 milhões de espécies de microrganismos, sendo que apenas entre 0,1 a 10% existentes foram caracterizados e descritos, apesar da importância do mesmo na manutenção da biosfera (ROSSELÓ-MORA; AMANN, 2001). Muitas destas microrganismos estão associadas à planta de cana-de-açúcar, estima-se mais de 35.500 unidades taxonômicas operacionais, entre fungos e bactérias (SOUZA et al., 2016). Novos estudos apresentam métodos para o isolamento e cultivo de coleções de diferentes populações de microrganismo para pesquisar as funções que os mesmos desempenham nas plantas (ROUWS et al., 2014; ARMANHI et al., 2016).

A diversidade de microrganismos na cultura da cana-de-açúcar influencia a absorção de nutrientes, especialmente o N, que é um dos nutrientes mais exigidos pelas plantas (SOUZA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016). Estes microrganismos associam-se às plantas e estimula o seu desenvolvimento, fato este que tornou importante o isolamento de bactérias que tenham a capacidade de promover o crescimento vegetal, contribuindo assim para um manejo sustentável da cana-de-açúcar (LIRA-CADETE et al., 2012).

Os microrganismos do solo presentes na rizosfera na cultura da cana-de-açúcar desempenham funções essenciais na ciclagem de nutrientes e uma ampla diversidade genética. As bactérias endofíticas são microrganismos que se caracterizam pela interação com as plantas hospedeiras, despertando grande interesse agrônomo. Na cana-de-açúcar vários

estudos têm demonstrado a presença de diferentes espécies de bactérias no interior das raízes, colmos e folhas (OLIVARES et al., 1996; DÖBEREINER et al., 1993; REIS et al., 1994).

A literatura aborda diversas pesquisas com gêneros de microorganismos presentes e interagindo com a cultura da cana-de-açúcar, como por exemplo: *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* (LIMA, 2012; TAULÉ et al., 2012), *Paraburkholderia*, *Bacillus*, *Erwinia* (INUI, 2009; LIMA, 2012), *Xanthomonas*, *Acinetobacter*, *Rhanella*, *Shinella*, *Agrobacterium* e *Achromobacter* (TAULÉ et al., 2012), *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Paraburkholderia* e *Nitrospirillum* (SANTOS et al., 2018; SHULTZ et al., 2017; PEREIRA et al., 2018). Outros grupos microbianos também têm sido relatados em diversos trabalhos como predominantes na cultura de cana-de-açúcar (DINI-ANDREOTE et al., 2010; PISA et al., 2011; PHILIPPOT et al., 2013; COSTA et al., 2014).

Outros gêneros foram identificados por Antonio et al. (2016) quando avaliou a diversidade e variabilidade de comunidade bacteriana diazotrófica associada a 10 variedades de cana-de-açúcar cultivada no Nordeste do Brasil (Pernambuco e Alagoas). Estes gêneros identificados foram *Klebsiella*, *Stenotrophomonas* e *Kosakonia*. Estirpes de *Beijerinckia*, *Enterobacter* e *Klebsiella* isoladas da rizosfera e do interior de tecidos radiculares da cana-de-açúcar foram capazes de sintetizar e disponibilizar aminoácidos no meio (OLIVEIRA et al., 2011; DE SANTI FERRARA et al., 2012; SILVA et al., 2016).

Estudos realizados por Silva et al. (2016) os autores verificaram que bactérias dos gêneros *Pantoea* sp., *Paraburkholderia* sp., *Enterobacter* sp., e *Klebsiella* sp. A comunidade bacteriana que interagiu com a planta de cana-de-açúcar estava associada mais próxima à região das raízes do que nas folhas, apresentando potencial para solubilizar fosfato e fixar N₂.

Estudos de ensaio de redução de acetileno mostrou a atividade de nitrogenase in vitro para alguns isolados de *Bradyrhizobium* spp. Recentemente foram relatados isolados do gênero *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* obtidos de tecido de raízes de cana-de-açúcar (THAWENUT et al., 2011; BURBANO et al., 2011; FISCHER et al., 2011; BENEDUZI et al., 2013; ROUWS et al., 2014), e que uma nova espécie de bactéria nodulante de leguminosas foi isolada das raízes da cana-de-açúcar na qual foi nomeada de *Bradyrhizobium sacchari* sp. nov. (DE MATOS et al., 2017). Estes autores sugeriram que essas bactérias não requerem um ambiente de nódulo para FBN. Portanto, esse estudo traz evidências de que *Bradyrhizobium* spp., pode contribuir para FBN na cana-de-açúcar em condições de campo.

A principal característica destes gêneros de microorganismos abordados é a de favorecer o desenvolvimento vegetal por intermédio de mecanismos, como exemplos tem-se destacado: a FBN (URQUIAGA et al., 2012; SCHULTZ et al., 2016; SILVA et al., 2016); síntese de substâncias promotora de crescimento vegetal, como o ácido indol acético (CHAVES et al., 2015; FERRARA et al., 2011; BHATTACHARYYA e JHA, 2012) solubilização de fósforo e zinco (MURUMKAR et al., 2017; ESTRADA et al., 2013; DE SANTI FERRARA et al., 2012; SANTOS et al., 2012; COMPANT et al., 2010), produção de sideróforos, biocontrole de doenças e indução de resistência sistema em plantas (MENDES et al., 2013), fungos micorrízicos arbusculares (ABREU et al., 2016; TRISTÃO et al., 2016).

2.4 Contribuição da FBN na Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar acumula elevada quantidade de N, aproximadamente 200 kg N ha⁻¹ no ciclo de cana-planta e de 120 a 180 kg N ha⁻¹ nas soqueiras quando o rendimento atinge 120 Mg ha⁻¹ de colmo (ORLANDO FILHO et al., 1980; URQUIAGA et al., 1992). Se a saída de N do sistema solo-planta é maior que a restituição, este fato indica que a cultura possui um sistema natural de reposição de N (URQUIAGA et al., 1992). Estudos realizados

estimaram que uma parte do N repostado é proveniente do processo de FBN (LIMA et al., 1987; URQUIAGA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2006; SCHULTZ et al., 2014).

Trabalhos pioneiros de FBN em cana-de-açúcar desenvolvidos por Döbereiner (1953) verificou a ocorrência de *Azotobacterchroococcum* em solos ácidos na região da Baixada Fluminense - RJ, e nos anos seguintes a presença de *Beijerinckiafluminensis* associada à rizosfera de cana-de-açúcar (DÖBEREINER e RUSCHEL, 1958).

Considerando o benefício com a redução de fertilizantes nitrogenados na cana-de-açúcar proporcionada pelas bactérias diazotróficas por intermédio do processo de FBN, pesquisas buscam melhores benefícios, o que é de grande interesse para desenvolver tecnologias que aprimorem e ou aumentem a contribuição deste processo.

Desde os primeiros trabalhos de Johanna Döbereiner, novas bactérias fixadoras de nitrogênio foram identificadas nas raízes, colmos e folhas das plantas de cana-de-açúcar: bactérias diazotróficas associativas (*Nitrospirillum amazonense*) e as endofíticas (*Herbaspirillum seropedicae*; *H. rubrisubalbicans*; *Gluconacetobacter diazotrophicuse* *Paraburkholderia tropica*) (BALDANI e BALDANI, 2005). Segundo Dobbelaere et al. (2003), bactérias 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.

Pesquisas realizadas por Lima et al. (1987), Boddey et al. (1991) e Urquiaga et al. (1992) estimaram que FBN em variedades de cana-de-açúcar podiam suprir até 60% do N total requerido pela cultura. Estes autores conduziram experimento e utilizaram o método de diluição isotópica de ^{15}N balanço de N do solo-planta. Utilizando a técnica de abundância natural de ^{15}N , Boddey et al. (2001) verificaram que em onze experimentos avaliados nove apresentaram de 25 a 60% do N assimilado pela planta era proveniente da FBN.

Outras pesquisas utilizando a técnica do ^{15}N no Brasil, Filipinas e Japão demonstraram que a contribuição da fixação de N_2 para o N total nas plantas variou de 0 a 72% (média de 30%) (YONEYAMA et al., 1997) e de 0 a 60% no Brasil (média de 32%) (POLIDORO et al., 2001). O efeito da inoculação de misturas bacterianas em material micropropagado das variedades SP701143 e SP813250 foi verificado por Oliveira et al. (2006), na qual houve uma estimativa de FBN de 30% do N acumulado.

Avaliando a FBN em sete variedades comerciais de cana-de-açúcar e duas variedades selvagens em um solo com baixa fertilidade, baixos teores de N disponível (0,07% N total), sem fertilização nitrogenada e empregando milho e sorgo como plantas referências, determinou que a contribuição da FBN nas variedades comerciais oscilou entre 24 a 43% (XAVIER, 2006).

Pesquisas nos últimos anos tem demonstrando que a contribuição das bactérias diazotróficas nativas em diferentes cultivares de cana-de-açúcar é de aproximadamente 40 a 64 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N, através processo de FBN, o que representa na média, 20% do N total assimilado pela planta (URQUIAGA et al., 2012). Evidências da ocorrência de FBN em cana-de-açúcar foram também observadas no México (casa de vegetação) (MUÑOZ-ROJAS; CABALLERO-MELLADO, 2003) e na Índia (em casa de vegetação e campo) (MUTHUKUMARASAMY et al., 2005; GOSAL et al., 2012). Um dos primeiros estudos realizado na região norte do Uruguai por Taulé et al. (2012) utilizando técnica de diluição isotópica de ^{15}N aplicado em três variedades de cana-de-açúcar em condições controladas e em vasos com solos esterilizados mostrou que as plantas poderiam obter uma contribuição da FBN de 35 a 59 % em relação as testemunhas (sorgo e milho).

2.5 Uso de Inoculante na Cultura de Cana-de-Açúcar

Inoculante no Brasil é definido como produto contendo microrganismos vivos estabilizados em populações elevadas (acima de 10^9 células g^{-1} ou mL^{-1} do produto), que favorece o crescimento vegetal de forma direta ou indireta, por meio de diferentes mecanismos, sendo denominados mundialmente como biofertilizantes (REIS, 2007). O inoculante pode conter bactérias que, além de possuírem a característica de fixar biologicamente o N_2 da atmosfera, também podem induzir a síntese de substâncias promotoras de crescimento vegetal, favorecendo o crescimento e desenvolvimento do sistema radicular, que conseqüentemente proporcionar melhor absorção de nutrientes e água disponíveis do solo, resultando em aumento de produtividade de colmos (REIS et al., 2009). A utilização de inoculantes contendo bactérias diazotróficas selecionadas para a cultura de cana-de-açúcar foi avaliado por diferentes autores no Brasil (GIRIO et al., 2015; SCHULTZ et al., 2018; PEREIRA et al., 2018).

O inoculante selecionado pela pesquisa no Brasil para a cultura da cana-de-açúcar é resultado de anos de pesquisas realizadas pela EMBRAPA Agrobiologia (Seropédica/RJ) sendo primeiramente testado por Oliveira et al. (2003; 2006) e recomendado posteriormente por Reiset al. (2009), no qual possui estirpes de cinco espécies de bactérias diazotróficas, sendo elas: *Nitrospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Paraburkhlodeia tropica*, todas isoladas de tecidos de diferentes variedades de cana-de-açúcar.

Nos últimos anos, são observados avanços no uso inoculante na cana-de-açúcar em termos de identificação da contribuição da FBN e as respostas benéficas da inoculação sobre o crescimento vegetal. Pesquisas avaliaram este inoculante na cana-de-açúcar e observaram que a fisiologia pode ser alterada e proporcionar aumento nas variáveis de crescimento, fisiológicas e de produção como: produtividade (REIS et al., 2009; BENEDUZI et al., 2013; SCHULTZ et al., 2012; 2014; PEDULA et al., 2016); matéria seca da parte aérea e da raiz (CHAVES et al., 2015; GÍRIO et al., 2015; conteúdo de N na parte aérea das plantas (SCHULTZ et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2016; PEDULA et al., 2016); número de perfilhos, número de folhas, altura da planta (GÍRIO et al., 2015; OLIVEIRA e SIMÕES, 2016); velocidade de brotação (GÍRIO et al., 2015; CHAVES et al. (2015) e promovem o desenvolvimento e influenciam no metabolismo de N em mudas de cana-de-açúcar (SANTOS et al., 2017).

O inoculante para a cana-de-açúcar foi resultado de anos de pesquisas realizadas pela EMBRAPA Agrobiologia (Seropédica-RJ) (REIS et al., 2009), que inicialmente selecionou estirpes de cinco espécies de bactérias diazotróficas, com potencial. Foram as estirpes de: *Nitrospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Paraburkhlodeia tropica*, todas isoladas de tecidos de diferentes variedades de cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2003; BALDANI et al., 2009).

Na Índia, Suman et al. (2013) avaliaram em condições de campo o efeito do inoculante formado por três estirpes de bactérias diazotróficas (*G. diazotrophicus*, *A. chroococcum* e *A. brasilense*) associadas a doses de N (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, porém os melhores resultados foram observados na dose de 75 $kg\ de\ N\ ha^{-1}$ comparado à dose de 150 $kg\ de\ N\ ha^{-1}$ e inoculante a base de *G. diazotrophicus* provou ser mais eficiente. Assim, relata-se que a FBN associada cultura de cana-de-açúcar, atua de forma complementar a disponibilidade de N do solo.

Reis et al. (2009) estudaram o efeito do inoculante com estas cinco estirpes na variedade comercial RB867515, durante três safras agrícolas (cana-planta, 1° e 2° soqueira),

em área de cultivos comerciais de duas usinas, em Argissolo amarelo, na 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. 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 soca. Foi observado incremento na produtividade advindo da inoculação de 7 % na cana-planta (em comparação com o controle), 48% na cana da primeira soca e 68% na segunda soca em uma área; e na outra os ganhos foram na ordem de 37% na cana-planta e 19% na segunda soca, não apresentando diferenças no segundo ano de cultivo.

Estudos com adição de inoculante a campo foram feitos com as variedades de cana-de-açúcar SP70-1143 e SP81-3250 associado a doses de N, em três solos: Planossolo, Latossolo e Nitossolo (baixa, média e alta fertilidade), contrastantes quanto à fertilidade. Os resultados mostram os melhores resultados em área de Planossolo com baixa fertilidade, concluindo que a eficiência do inoculante foi dependente da fertilidade do solo (OLIVEIRA et al., 2006).

Em trabalhos com a variedade SP80-3280 em área da usina Diamante, localizada no município de Jaú-SP (Latosolo Vermelho), Pereira (2011) utilizou o inoculante (aplicando diretamente no rebolo da soqueira com 28 dias após o corte sob diferentes doses de N (0, 50, 100 e 150 kg ha^{-1}) e observou que a inoculação associada à dose de $50 \text{ kg de N ha}^{-1}$ promoveu efeito significativo. Entretanto, a inoculação associada à dose de $150 \text{ kg de N ha}^{-1}$ promoveu redução da produtividade de colmos, no ciclo de terceira soca. Esse resultado corrobora com 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 decréscimo na produtividade de colmos quando comparado com o tratamento não inoculado e adubado com a mesma dose de N.

Em pesquisas realizadas por Schultz et al. (2012), com as variedades RB72454 e RB867515 em um Cambissolo Flúvico, onde foram realizadas duas aplicações do inoculante, uma na fase do viveiro nas plântulas micropropagadas e outra por imersão das gemas na ocasião do plantio. Apenas a variedade RB867515 no ciclo de cana-planta e segunda soqueira foram satisfatórios, com incremento na produtividade similar ao tratamento com 120 kg ha^{-1} de N. 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 (RB 72454, RB 867515, RB 92579, RB 918639, RB 92606 e RB 855536) cultivadas em um Planossolo Háplico distrófico e conclui que a inoculação promove ganhos de biomassa, com diferentes contribuições entre estirpes e variedades, sugerindo uma interação entre esses fatores. Os mesmos observaram que o teor de N para o ponteiro, nas variedades RB92579 e RB867515 não diferem entre os tratamentos inoculados e nem quando comparados com a testemunha absoluta e com a testemunha nitrogenada. Para avaliar a resposta das variedades RB867515 e RB72454 de cana-de-açúcar à inoculação na promoção de crescimento, desempenho agrônomo e FBN ao longo de três anos, Schultz et al. (2014), verificaram acúmulo no conteúdo de N nos tratamentos inoculados e iguais ao tratamento nitrogenado em ambas variedades.

Estudo conduzido por Gírio et al. (2015) avaliou o uso do inoculante contendo as cinco estirpes de bactérias em plantas de cana-de-açúcar na variedade RB867515, constataram que o tratamento inoculado aumentou o diâmetro do colmo, altura das plantas, perfilhamento e produção da matéria seca, aumentando linearmente ao longo do período experimental, evidenciando que o inoculante tem efeito fisiológico benéfico sobre o crescimento de plantas de cana-de-açúcar. Respostas positivas semelhantes foram identificadas por Garcia et al. (2013) no desenvolvimento inicial, até os 120 dias, na variedade de cana-de-açúcar

RB867515, cultivadas em Neossolo Quartzarênico em vasos plásticos de 12 litros e inoculadas por imersão e pulverização, quando comparadas a testemunha nitrogenada.

Com perspectiva de avaliar a produção de ácido indol acético (AIA) de cinco estirpes de bactérias diazotróficas e o efeito da inoculação dessas na brotação das variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e IACSP95-5000), Chaves et al. (2015) concluiu que as cinco estirpes que constituem o inoculante de cana-de-açúcar foram capazes de produzir AIA, valores que varia de 10 a 50 µg mL. Maiores quantidades foram produzidas pelas estirpes *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*. Nesse trabalho, cada estirpe foi testada individualmente e a inoculação de *Herbaspirillumseropedicae*, *Nitrospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica* aumentaram o índice de velocidade de brotação nas variedades RB867515 e IACSP95-5000.

Experimento de campo realizado por Pedula et al. (2016) em um solo Podzólico Vermelho-Amarelo em Seropédica, RJ, inocularam a planta de cana-de-açúcar com objetivo de avaliar o crescimento e acúmulo de nutrientes na variedade RB92579, com os seguintes tratamentos sem N; 50 kg N ha⁻¹; inoculado mais 50 kg N ha⁻¹ e um controle absoluto. Os autores concluíram que a inoculação, em combinação com fertilizantes nitrogenados ou não, aumenta o acúmulo de matéria seca e o índice de área foliar, durante o primeiro ano e o inoculante pode ser utilizado para aumentar o acúmulo de nutrientes na cana-de-açúcar em particular de N, P e K.

Pesquisa realizada por Schultz et al. (2016) com objetivo de avaliar a influência do inoculante na produtividade e na diluição isotópica ¹⁵N na cultura da cana-de-açúcar, bem como diluição isotópica ¹⁵N naturalmente associada à cultura nos ciclos de cana-planta (variedade RB72454 e RB867515), primeira soca e segunda soca no Estado de Pernambuco e São Paulo em um Planossolo Háptico distrófico textura média e Argissolo Vermelho eutrófico textura argilosa. No entanto a inoculação com bactérias diazotróficas não influenciou nos valores de abundância natural de ¹⁵N nas folhas-bandeira da cana-de-açúcar e as variedades apresentaram baixos índices de respostas à adubação nitrogenada e à inoculação. Porém a abundância natural de ¹⁵N nas folhas-bandeira diminui ao longo das colheitas, o que indica que FBN, naturalmente associada à cultura, aumenta na medida em que o N disponível no solo exaure-se com o cultivo.

Estudos sobre biomassa, acúmulo de nutrientes e atividade de nitrato redutase na variedade RB966928 de mudas pré-brotada de cana-de-açúcar foi realizado por Santos et al. (2017), com objetivo de avaliar o efeito da inoculação com as estirpes de forma individual e com as cinco estirpes de bactérias diazotróficas. O experimento foi realizado em três etapas em estufa, sendo elas: brotação (10 dias); planta em tubos de plástico (30) dias e em sistema hidropônico (39 dias). A inoculação com as estirpes *Herbaspirillumseropedicae* *Paraburkholderia tropica*(Pt) e a mistura das cinco estirpes levou a uma maior produção de biomassa das mudas de cana-de-açúcar após cultivo em tubos, seguido de inoculação com a estirpe *Herbaspirillumrubrisubalbicans* (Hr). Na etapa de hidroponia, a mistura e a estirpe *Herbaspirillumrubrisubalbicans* tiveram o maior efeito na promoção do crescimento. Em relação à atividade do nitrato redutase a mesma foi influenciada pela inoculação apenas sob condições de baixo fornecimento de N, com efeito nas folhas com a mistura e a estirpe Hr, e nas raízes o efeito foi quando inoculou a estirpe Pt e a mistura. Após o cultivo em solução nutritiva, as plantas inoculadas com a mistura e a estirpe Hr apresentaram maior biomassa e acúmulo de nutrientes. No entanto, apenas a mistura das cinco estirpes de bactérias diazotróficas promoveu aumento da área foliar, biomassa e acúmulo de nutrientes nos colmos.

Pesquisas realizadas identificaram diversos gêneros de bactérias nestes últimos anos interagindo a cultura de cana-de-açúcar é que estão sendo utilizadas como inoculante

(TAULÉ et al., 2012; ROUWS et al., 2014; ANTONIO et al., 2016; DE MATOS et al., 2017; LIMA et al., 2018).

Estudos realizado por Lima et al. (2018) propôs realizar inoculação de bactérias dos gêneros bacterianos de *Burkholderia*, *Pantoea* e o *Stenotrophomonas*. Estes gêneros foram avaliados com intuito de verificar variáveis fisiológicas, assim como a nutrição nitrogenada, produtividade e FBN ao longo do ciclo da cultura de cana-de-açúcar inoculando-os de forma individual, bem como a mistura. Os gêneros *Stenotrophomonas* e *Pantoea* foram tolerantes à salinidade, altas doses de pesticidas a diferentes fontes de carbono em meio ácido e produziram moléculas que regulam densidade populacional (*quorum sensing*), mas não obteve aumento na produção de matéria seca na cana-de-açúcar. Já os gêneros *Burkholderia* sp., e o *Enterobacter* sp., foram mais sensíveis à salinidade e ao controle de pragas, porém foram mais eficazes na promoção do crescimento das plantas. Segundo Lima et al. (2018), a tolerância das bactérias às condições ambientais adversas interferiu negativamente na capacidade das bactérias promoverem o crescimento das plantas.

A viabilidade da aplicação do inoculante na cana-de-açúcar encontra respaldo em muitos trabalhos científicos, que apontam diversos benefícios para essa cultura. A variação quanto à produtividade da cultura pode estar relacionada com o genótipo da planta e com as condições da fertilidade do solo. Porém, por se tratar de uma cultura que abrange milhões de hectares, o suprimento de cerca de 30% da demanda de N pela FBN acarretará grandes benefícios econômicos e ambientais para a cultura da cana-de-açúcar (SCHULTZ et al., 2012; 2014; PEREIRA et al., 2013).

2.6 Técnicas Isotópicas de ^{15}N na Cultura de Cana-de-Açúcar

2.6.1. Abundância natural de ^{15}N

Para avaliar com precisão a contribuição da FBN na cultura da cana-de-açúcar é necessário o uso de técnicas específicas. Quanto aos estudos de fixação de N_2 , os isótopos de N servem para identificar a fonte de N na planta: o N_2 é fixado a partir da atmosfera ou N é assimilado a partir do solo. Técnicas isotópicas de quantificação da fixação de N_2 baseiam-se no princípio de que, se a abundância de ^{15}N no N disponível do solo e no N_2 atmosférico é conhecida, é possível analisar a porcentagem de N na planta derivado da atmosfera por meio da análise de ^{15}N na planta. De um modo geral, o N mineral do solo é ligeiramente enriquecido em ^{15}N em comparação com o ambiente (LOPES et al., 2016).

A composição do ar atmosférico mostra cerca de 78% de N na forma elementar (N_2) e disponível indiretamente para as plantas (UNKOVICH et al., 2008). Este N presente no ar atmosférico é composto por diferentes isótopos, sendo os principais e mais estáveis, com abundância constante, o isótopo ^{14}N com 99,6337% de átomos e o isótopo ^{15}N com 0,3663% (MARIOTTI, 1983; UNKOVICH et al., 2008). Esses dois isótopos estáveis (^{14}N e ^{15}N) possuem pesos atômicos diferentes, possibilitando a discriminação isotópica durante as transformações envolvidas na dinâmica do N no sistema solo-planta, o que torna o solo levemente enriquecido com o isótopo ^{15}N em relação à abundância natural dos dois isótopos no ar, assim como os tecidos dos vegetais que utilizam o N do solo (SHEARER e KOHL, 1986).

Destaca-se que este enriquecimento decorre de valores extremamente pequenos, sendo então convencionalmente chamado de delta ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$), o que representa o resultado da divisão da abundância natural do isótopo ^{15}N (0,3663) por mil (1000), ou seja, 0,0003663 átomos % de ^{15}N em excesso (UNKOVICH et al., 2008).

Desta forma, as espécies vegetais capazes de suprir a sua demanda por N com o N₂ do ar atmosférico, ou seja, espécies que se beneficiam da FBN, apresentarão valores de δ¹⁵N próximos de zero, visto que a abundância natural do isótopo ¹⁵N presente no tecido destas plantas vai ser próxima de 0,3663%. As espécies que não são fixadoras ou ainda as que apresentam baixa eficiência na FBN, apresentarão valores de δ¹⁵N próximos aos do solo, o qual será a principal fonte de N suprir a necessidade deste vegetal (URQUIAGA et al., 1992, 2012).

A técnica da abundância natural de ¹⁵N visa quantificar o N derivado do processo de FBN, partindo do ponto em que as plantas fixadoras e não fixadoras absorvam N do solo nas mesmas condições no tempo e em profundidade (SHEARER e KOHL, 1986).

O N derivado da FBN é calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Ndfa} = \frac{(\delta^{15}\text{N PTNF} - \delta^{15}\text{N PTF})}{(\delta^{15}\text{N PTNF} - B)} \times 100$$

δ¹⁵N PTNF – Valor de δ¹⁵N do solo obtido das plantas controle não fixadoras, utilizadas como referência.

δ¹⁵N PTF - Valor de δ¹⁵N da planta teste fixadora de N₂ (cana-de-açúcar).

B – Valor da discriminação isotópica de ¹⁵N realizado pelas plantas no processo de FBN, no caso de plantas não leguminosas é considerado igual à zero. Pelo fato destas plantas não terem uma estrutura formada para a fixação do N₂ como é o caso do nódulo nas raízes das plantas leguminosas, resulta em valores muito pequenos de discriminação entre os isótopos ¹⁴N e ¹⁵N, podendo ser adotado como zero (BODDEY et al., 2001).

2.6.2 Diluição isotópica de ¹⁵N

A técnica da diluição isotópica de ¹⁵N baseia-se na alteração da proporção natural entre os isótopos ¹⁵N e ¹⁴N artificialmente no solo em proporções conhecidas através do uso de fertilizantes enriquecidos com ¹⁵N (átomos % ¹⁵N >0,3663), também chamados de fertilizantes marcados com ¹⁵N. As plantas obtendo somente o N do solo marcado possuirão um enriquecimento em ¹⁵N semelhante à marcação do N disponível do solo. Por outro lado, plantas que obtenham N₂(não marcado) sofrem uma diluição no seu enriquecimento em ¹⁵N. Assim, quanto maior for a amplitude da diluição, maior a quantidade de N₂ incorporado e, assim, maior a contribuição da FBN (BODDEY et al., 1987).

Para aplicação da técnica de diluição isotópica de ¹⁵N, o ideal seria que a marcação do N disponível não variasse no tempo e no espaço. Em solo com enriquecimento de ¹⁵N, uniforme na área e na profundidade explorada pelas raízes e estável com tempo, pode-se garantir que qualquer planta, seja teste ou testemunha, retirará N do solo com o mesmo enriquecimento de ¹⁵N. De fato, é muito difícil ter satisfeitas as três condições, sendo, portanto, de grande importância a seleção de uma planta-controle adequada (BODDEY et al., 1995).

A quantificação percentual da FBN através da técnica de diluição isotópica de ¹⁵N é feita usando a equação abaixo, seguindo método proposto por Unkovich et al. (2008).

$$\% \text{ Ndfa} = \left(1 - \left(\frac{\text{átomos \% de } ^{15}\text{N em excesso na planta teste}}{\text{átomos \% de } ^{15}\text{N em excesso na planta testemunha}} \right) \right) \times 100$$

Onde: átomos % ^{15}N em excesso = átomos % ^{15}N total - 0,3663 %.

Está técnica foi muito utilizada nos anos de 1970 a 1990, quando a espectrometria de massas apresentava uma baixa precisão. Com a precisão dos espectrômetros de massa, a diluição isotópica deixou de ser a principal técnica de quantificação de FBN, devido ao elevado custo com enriquecimento artificial com ^{15}N do solo.

2.7. Eficiência no Uso do N-fertilizante na Cultura da Cana-de-Açúcar

A eficiência no uso do nitrogênio (EUN) é a porcentagem de N aplicado que é aproveitado/absorvido/recuperado pela planta (IAEA, 2001). A eficiência de utilização de N tem sido pouco abordada em planta de cana-de-açúcar, levando em consideração a importância que a cultura representa no país. A determinação da EUN em sistemas agrícolas é de grande interesse para avaliar a aplicação de N fertilizantes e seu papel na produtividade das culturas (FAGERIA; BALIGAR, 2005).

A definição e a determinação da EUN são descritas na literatura de formas distintas (MOLL et al., 1982; DOBERMANN, 2007; BELL et al., 2015). Entre os parâmetros de eficiência de fertilizantes usados: eficiência agrônômica (EA_N), eficiência aparente de recuperação (EAR_N), eficiência fisiológica (EF_N) e o fator de parcial de produtividade do N aplicado (FPP_N) (XU; FAN; MILLER, 2012; IAEA, 2001). Com alterações, esses índices são aplicados na área agrônômica para avaliar a eficiência do N-fertilizante adicionado. Em estudos de campo estes índices são calculados a partir da diferença de produção da cultura e no total de N absorvido na biomassa da parte aérea, em parcelas fertilizadas e não fertilizadas (método da diferença), ou, de forma mais precisa usando fertilizante com marcação com o isótopo ^{15}N para determinar a recuperação do N aplicado (DOBERMANN et al., 2007; TRIVELIN et al., 1994).

O uso de isótopo estável ^{15}N permite monitorar as transformações do N no solo. Esses métodos traçam o movimento dos isótopos de ^{15}N e ^{14}N informando acerca do sistema e estimando a porcentagem de transformações do N (FRANCO et al., 2011). O uso do ^{15}N -fertilizante auxilia na quantificação e monitoramento do N na planta nos compartimentos do sistema em estudo, com a vantagem é a possibilidade de diferenciar o N na planta, do que veio do solo e o N oriundo do fertilizante (TRIVELIN et al., 1994).

Na cana-de-açúcar a EUN é baixa e varia em média de 10 a 40% (BASANTA et al., 2003; FORTES et al., 2013; JORRIS, 2015; PEREIRA, 2017). O N derivado dos fertilizantes não absorvidos pelas plantas pode ser imobilizado na matéria orgânica do solo ou pode ser perdido no ambiente. Nesse caso, tornar um poluente, no solo ou lençol freático, ou auxiliar para a emissão de gases de efeito estufa (CHIEN et al., 2009; SNYDER et al., 2009; OITA et al., 2016). Contudo o aumento da EUN é imprescindível para produção sustentável na cultura da cana-de-açúcar.

Estudo com aplicação de inoculante na cana-de-açúcar para melhorar a eficiência de uso de N-fertilizantes foi realizado por Jorris (2015), no qual relata que a inoculação com bactérias diazotróficas pode promover melhorias no aproveitamento de N-fertilizante aplicado na cana-de-açúcar cultivados em solo arenoso, o que resultou em respostas positivas na absorção de N, diminuindo potencialmente as perdas de N no cultivo. Porém, isso não resulta necessariamente em ganhos de produtividade.

A eficiência N-fertilizante que variou ao redor de 50% na colheita final não foi afetada pela inoculação, segundo o autor, Oliveira (2013), houve diferença significativa na recuperação de N-fertilizante entre os tratamentos com 50 kg ha⁻¹ de N e 50 kg ha⁻¹ de N + inoculação. Estes resultados sugerem que a associação da inoculação a adubação nitrogenada (50 kg ha⁻¹

de N) não proporcionaram efeito aditivos na recuperação do N nas condições de condução do ensaio, no entanto, deve-se destacar que com exceção da colheita final o tratamento que recebeu 50 kg ha⁻¹ de N associado à inoculação apresentou moderada elevação na recuperação do N-fertilizante, o que reforça a hipótese de que o inoculante pode estar promovendo aumento do sistema radicular e melhor aproveitamento do N aplicado no solo.

Dessa forma estudar o uso eficiente do N-fertilizantes podem ser o norte para redução de insumos no cultivo e desenvolvimento das plantas e, também, para atingir a sustentabilidade dos sistemas produtivos, tornando um ponto importante para questão socioeconômica do setor de cana-de-açúcar.

3. CAPÍTULO I

ACÚMULO DE MASSA SECA, NITROGÊNIO TOTAL E EFICIÊNCIA DE USO DE ¹⁵NEM CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADAS COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

3.1 RESUMO

Na cultura da cana-de-açúcar, o sistema de uso de mudas pré-brotadas visa um ganho econômico e melhoria na qualidade da muda com uso de inoculante com bactérias diazotróficas. O objetivo do trabalho foi avaliar a interação da fertilização nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no acúmulo de N e na produtividade de duas variedades de cana-de-açúcar e eficiência de recuperação do N-fertilizante por plantas de cana adubadas com equivalente a 45 kg N ha⁻¹ com e sem inoculação com bactérias diazotróficas. O experimento foi conduzido em condições de vaso com uso de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. Os vasos continham 100 kg de solo proveniente da camada de 0-40 cm de um Argissolo Vermelho-Amarelo. Os tratamentos foram: inoculação ou não com cinco estirpes de bactérias diazotróficas (*Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) estirpe BR11281T (PAL-5T), *Herbaspirillum seropedicae* (Hs - BR11335 = HRC54), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Hr - BR11504 = HCC103), *Paraburkholderia tropica* (Bt - BR11366T = PPe 8T) e *Nitrospirillum amazonense* (Na - BR11145 = CBAMc) e com e sem aplicação de 45 kg de N-fertilizantes (sulfato de amônio com 2% átomos ¹⁵N em excesso) e quatro épocas de colheita (90, 180, 270 e 360 DAT). Foi determinado o diâmetro do colmo, altura da planta, acúmulo de N, produtividade de colmos, enriquecimento de ¹⁵N (% átomos de ¹⁵N em excesso) e eficiência de uso de N-fertilizantes (EUN) da cultura de cana-de-açúcar. Eventualmente a adição de N-fertilizante inibiu, ou até mesmo causou efeito antagônico da inoculação, em algumas variáveis de crescimento (diâmetro de colmo, massa seca de folha e palha, teor e acúmulo de N na folha), porém sem efeito significativo na produtividade de colmos. A eficiência de recuperação do ¹⁵N-fertilizante pela planta variou ao redor de 60% nas duas variedades em estudo, sem influência da inoculação. Estudos com outras variedades e em diferentes condições de solo e clima devem ser realizados para definição de cenários com maior possibilidade de benefício da inoculação na cultura da cana-de-açúcar com bactérias diazotróficas quanto à eficiência de uso de N.

Palavras-chave: Acúmulo de N. Mudas pré-brotadas. *Poaceae*. Inoculação. Fertilizante Nitrogenado. Sulfato de Amônio.

3.2 ABSTRACT

In sugarcane cultivation, the system of use of pre-sprouted seedlings aims at economic gain and improvement in seedling quality using inoculant with diazotrophic bacteria. This work aimed to evaluate the interaction of nitrogen fertilization and inoculation with diazotrophic bacteria on N accumulation and yield of two sugarcane varieties and N-fertilizer recovery efficiency by fertilized sugarcane plants with 45 kg N ha⁻¹ with and without inoculation with diazotrophic bacteria. The experiment was conducted under pot conditions using pre-sprouted sugarcane seedlings. The pots contained 100 kg of soil from the 0-40 cm layer of a Ultisol. The treatments were: inoculation or not with five strains of diazotrophic bacteria (*Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) strain BR11281T (PAL-5T), *Herbaspirillum seropedicae* (Hs - BR11335 = HRC54), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Hr - BR11504 = HCC - Par11104) Bt - BR11366T = PPe 8T) and *Nitrospirillum amazonense* (Na - BR11145 = CBAMc) and with and without application of 45 kg N-fertilizer (ammonium sulfate with 2% excess ¹⁵N atoms) and four harvest seasons (90, 180, 270 and 360 DAT). The stem diameter, plant height, N accumulation, stem productivity, ¹⁵N enrichment (% excess ¹⁵N atoms) and use efficiency of N-fertilizer (EUN) use were determined. Eventually, the addition of N-fertilizer inhibited or even caused an antagonistic effect of inoculation on some growth variables (stem diameter, leaf, and straw dry matter, leaf N content and accumulation), but without significant effect yield in stalk yield. ¹⁵N-fertilizer recovery efficiency by plants varied around 60% in the two varieties studied, with no influence of inoculation. Studies with other varieties and under different soil and climate conditions should be performed to define scenarios with the highest possible benefit of inoculation in sugarcane culture with diazotrophic bacteria as the efficiency of N use.

Keywords: N accumulation. Pre-sprouted seedlings. Poaceae. Inoculation. Nitrogen Fertilizer. Ammonium sulfate.

3.3 INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar acumula elevada quantidade de N, alta demanda e extração de N e a reposição, se dá muitas das vezes por meio de fertilizantes nitrogenados, tendo aplicação anualmente de 30 a 60 kg ha⁻¹ em cana-planta e nas soqueiras chega a 100 kg ha⁻¹ (URQUIAGA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2010; OTTO et al., 2016). A área plantada e a grande quantidade de N fertilizante aplicado na cana-de-açúcar no Brasil torna a cana-de-açúcar a segunda maior cultura em termos de consumo de N-fertilizante (IFA, 2013).

O N faz parte da constituição das moléculas vitais dos vegetais (ALCANTARA et al., 2009). Portanto a deficiência do N torna-se limitante para crescimento e a produtividade da cultura (MILLER e CRAMER, 2004). O maior reservatório de N na biosfera é o ar atmosférico, porém este é uma fonte de N que não se encontra prontamente disponível para os vegetais, por encontrar-se na forma de N₂ (78%), uma forma muito estável. No entanto, a disponibilidade de N aos organismos depende da quebra dessa molécula para conversão em amônio (NH₄⁺) e nitrato (NO₃⁻) que são assimiláveis pelas plantas. Esse processo é denominado fixação de nitrogênio e pode ocorrer através da produção de fertilizantes (indústria) ou de forma natural, por descargas elétricas (8%), reações fotoquímicas (2%) e FBN realizada por bactérias ou algas azuis-verdes (90%) (TAIZ; ZEIGER, 2013; CHERKASOV et al., 2015).

O uso de inoculante que contém bactérias diazotróficas na cana-de-açúcar pode proporcionar benefícios à planta, pois estas produzem hormônios e estimulam o crescimento e desenvolvimento das raízes, favorecendo variáveis de crescimento e fisiológicas em todo o ciclo da planta, tais como: germinação, velocidade de brotação, sistema radicular, crescimento (altura da planta, diâmetro), matéria seca, conteúdo de N, concentração de sacarose, tudo associado com a FBN e efeitos hormonais (REIS et al., 2009; SCHULTZ et al., 2014; 2018; GÍRIO et al., 2015; LIU et al., 2015; PEREIRA et al., 2018). Diante do contexto, o Instituto Agrônomo de Campinas desenvolveu o sistema de produção de mudas pré-brotadas, que consiste em um método de multiplicação de cana-de-açúcar, que visa à produção de mudas em tubetes em viveiro e o uso de uma planta em condições de campo com uma boa garantia da sanidade das mudas, fatores estes, primordiais para aumentar a longevidade e produtividade dos canaviais (LANDELL et al., 2012; SANTOS et al., 2018).

A recuperação do N-fertilizante pela cana-de-açúcar está em torno de 10 a 40%, valores considerados baixos, o que demonstra a possibilidade de ocorrência de significativas perdas de N no sistema de produção de cana-de-açúcar, por imobilização na matéria orgânica do solo e/ou perda para meio ambiente quando altas doses de N-fertilizante são aplicadas (ISA et al., 2006; THORBURN et al., 2011; ALLEN et al., 2012; FORTES et al., 2013). Portanto, aumentar a eficiência de uso do N em sistemas de produção da cana-de-açúcar com uso de bactérias diazotróficas em mudas pré-brotadas torna-se importante para a sustentabilidade dos sistemas, faz com que a planta absorva melhor o N-fertilizante aplicado e de forma mais eficiente, sendo possível reduzir a dose aplicada (SANTOS et al., 2018).

A hipótese deste trabalho é que a resposta agrônômica da cana-de-açúcar à inoculação em mudas pré-brotadas com bactérias diazotróficas é influenciada pela fertilização nitrogenada e que aumentaria a eficiência de uso do N disponível em plantas de cana-de-açúcar adubadas com ¹⁵N-fertilizantes, o que levaria a variação do ¹⁵N nas diferentes partes da planta de cana-de-açúcar (raiz, folha palha e três partes de colmo inferior, médio e superior).

Diante deste contexto, o trabalho teve por objetivo avaliar o acúmulo de massa seca e nitrogênio total em duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas em quatro épocas de colheita; e avaliar a eficiência de uso de N-fertilizantes (EUN) na cana-de-açúcar adubada com ¹⁵N-fertilizante.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Caracterização da área do experimento

O experimento foi conduzido na área experimental da Embrapa Agrobiologia, localizada no município de Seropédica-RJ (22°44'38" Sul, 43°42'28" Oeste e 26 m de altitude). O experimento foi realizado em vasos a campo. Foi selecionada uma área nivelada, de aproximadamente 180 m² e sem vegetação arbórea nas proximidades, a fim de evitar interferências da exposição da radiação no crescimento das plantas nos vasos. Para apoio dos vasos, foi utilizado um bloco de cimento sextavado, distribuídos de forma que o espaçamento entre os vasos fosse de 1,2 m.

O clima da região, segundo a classificação de Köppen é o Aw, com verão úmido e inverno seco, apresentando temperatura média de 25°C. O regime pluvial é caracterizado pela existência de um período de chuvas no verão e estiagem no inverno. A precipitação anual é de 1.300 mm. Apesar das chuvas se concentrarem na primavera e no verão, é comum ocorrer veranicos em janeiro e fevereiro. Por sua vez, no inverno, podem ocorrer precipitações elevadas, acima das médias registradas (Figura 1).

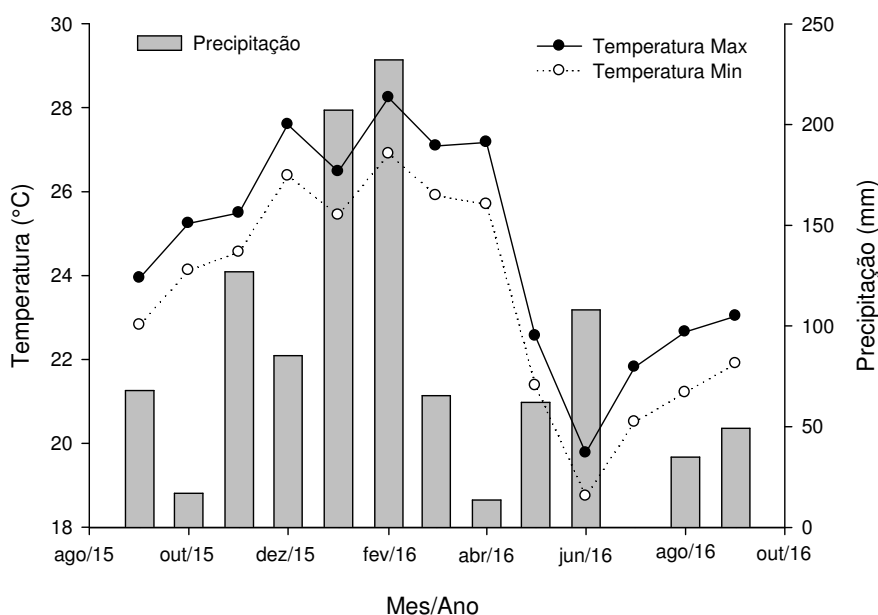


Figura 1. Climograma da região de Seropédica-RJ.

3.4.2 Preparo do solo

O solo utilizado para montagem do experimento foi classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico (SANTOS et al., 2013), coletado na área experimental da Embrapa Agrobiologia, local designado para retirada de solo para pesquisas com vegetação previa com capim colômbio. Foi utilizado para o preenchimento dos vasos um montante com aproximadamente de 13 toneladas de solo peneirado, sendo oriundo das profundidades de 0-20 e 20 a 40 cm que foi homogeneizado com auxílio de betoneira, obtendo assim, um solo com as seguintes atribuições, argila, 16,4%, silte, 36%, areia, 48,2%, pH (H₂O), 5,6; C, 1,0%; N, 0,11%; P disponível (Mehlich-I), 1,42 mg dm⁻³; e Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, H+Al, respectivamente,

1,81; 1,19; 0,14; 4,29 $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$, com uma saturação por bases resultante de 42%. Baseando-se na análise química do solo e nas recomendações do manual de calagem e adubação do Estado do Rio de Janeiro (FREIRE et al., 2013), foram calculados e aplicado a quantidade de calcário para 100 kg de solo, equivalente a 1,5 Mg ha^{-1} de calcário (71 g por vasos) com 45% de CaO e 18% MgO e PRNT de 122%, para elevação da saturação por bases a 60%. Também foi aplicado 0,5 Mg ha^{-1} de gesso (24 g por vaso), adubação fosfatada (65 g por vaso de super simples) equivalente a 250 kg ha^{-1} de P_2O_5 , aplicação de potássio (25 g de sulfato de potássio) equivalente a 250 kg ha^{-1} de K_2O , e 100 kg ha^{-1} de FTE-BR-12 (*Fritted Trace Elements*) (B: 1,8%, Cu: 0,8%, Fe: 3,0%, Mn: 2,0%, Mo: 0,1%, e Zn: 9,0%) como fontes de micronutrientes, levando em consideração que a planta desenvolveria em vasos.

Após homogeneização do solo, com mistura do corretivo e adubos, o solo foi distribuído em 128 vasos como unidade experimental (parcela) com dimensões de 0,40 m de diâmetro \times 0,80 m de altura e coloração azul. No fundo dos vasos foram feitos 10 furos com broca de 10 mm. Foi colocada uma camada de 10 cm de brita zero e uma manta acrílica 100 (100 g m^{-2}) em poliéster e sobre a manta foi colocado os 100 kg de solo, operação realizada aos trinta dias antes do transplante das mudas. O transplante das mudas para os vasos ocorreu na manhã do dia 14 de setembro de 2015.

O fornecimento de N-fertilizante foi realizado aos vinte dias após o transplante das mudas para os vasos, utilizando o fertilizante nitrogenado sulfato de amônio (0 e 45 kg N ha^{-1} com 2% de átomos de ^{15}N em excesso) (4,25 gramas por vaso). Para facilitar a aplicação, a dose de N-fertilizante para cada vaso foi diluída em 200 mL de água e aplicado em um sulco circular, aberto ao redor da planta e coberto após aplicação. O fornecimento de água para o experimento ocorreu por meio de chuvas e irrigação. A irrigação foi realizada para manter a capacidade de campo, com duas regas diárias, uma pela manhã e outra no final da tarde, utilizando baldes de 4 L graduados.

3.4.3 Produção de mudas pré-brotadas (MPB)

A produção de mudas teve início nos 14 de agosto de 2015 e foi baseada no Sistema de Produção de Mudanças Pré-brotadas (MPB) sugerido por Landell et al. (2012) tendo duração de 50 dias. Para o experimento foram produzidas mudas a partir de colmos de duas variedades comerciais de cana-de-açúcar (RB92579 e RB867515), obtidas da área experimental da Embrapa Agrobiologia. As duas variedades são de maturação média tardia, recomendadas para solos com baixa fertilidade natural. Outras características são descritas abaixo.

RB867515 – Compõem 27% da área plantada nacional (APTA 2017). Possui alta produtividade agroindustrial, com uma ótima adaptabilidade e estabilidade de produção em solos de baixa fertilidade natural e menor capacidade de retenção de água. Possui alta velocidade de crescimento, porte alto, hábito de crescimento ereto, alta densidade de colmo, de cor verde arroxeado que se acentua quando expostos e fácil despalha. É uma variedade tolerante à seca e boa brotação de soqueira, mesmo colhida crua. Seus colmos têm alto teor de sacarose, crescimento rápido com alta produtividade (HOFFMANN et al., 2008; RIDESA, 2010).

RB92579 – É uma variedade muito difundida na região produtora de cana-de-açúcar do nordeste. Tem uma excelente produtividade agrícola, ótimo perfilhamento, bom fechamento da entrelinha, ótima brotação das soqueiras, garantindo longevidade dos canaviais. Possui porte semi-ereto, boa recuperação após períodos de seca. Seus colmos possuem ótimo teor de sacarose, maturação média, recomendada para colheita do meio para o

final de safra. Possui um florescimento baixo e tem tolerância ao ataque da broca comum, resistente à ferrugem marrom e escaldadura das folhas e moderadamente resistente ao carvão (RIDESA, 2010).

Seguindo o sistema de produção MPB, as mudas foram produzidas a partir do corte dos colmos da planta de cana, denominados de minitoletes, onde estão as gemas. Os colmos de cada variedade foram cortados em minitoletes, contendo gema individualizada (1 gema) e passado por tratamento térmico curto descrito por Sanguino et al. (2006), que consiste em imersão em banho maria imerso em água a 52°C por 30 min. Esse tratamento visa à redução de microrganismos fitopatogênicos e é eficaz para diminuir a microbiota associada aos minitoletes (REIS et al., 1994). Após o tratamento térmico, os minitoletes foram imersos em solução fungicida (Comet®) a 0,1% durante 3 min. Posteriormente, foram inoculadas com bactérias diazotróficas e conduzida ao ambiente para germinação como descrito no item 3.4.4 (Figura 2a).

3.4.4 Preparo do Inoculante e Inoculação

Para ocasião do plantio e formação das mudas pré-brotadas foi realizada inoculação nos minitoletes, utilizando inoculante turfoso que consistiu de uma mistura durante 30 minutos que continha cinco estirpes de bactérias diazotróficas isoladas, selecionadas e identificadas (OLIVEIRA et al., 2002, 2006). Essas bactérias estão depositadas na coleção de cultura da Embrapa Agrobiologia (Seropédica, RJ, Brasil), sendo as seguintes estirpes: BR11281^T de *Gluconacetobacter diazotrophicus* T = PAL-5^T, descrito por Cavalcante e Döbereiner (1988); *Herbaspirillum seropedicae* - BR11335 = HRC54, descrito por Baldani et al. (1986); *Herbaspirillum rubrisubalbicans*-BR11504 = HCC103, descrito por Baldani et al. (1996); *Paraburkholderia tropica* - BR11366^T = PPe 8^T, anteriormente pertencente ao gênero *Burkholderia*, descrito por Reis et al. (2004) e recentemente reclassificado por Oren e Garrity (2015); e *Nitrospirillum amazonense* - BR11145 = CBAMc, anteriormente pertencente ao gênero *Azospirillum*, descrito por Magalhães et al. (1983) e reclassificado por Lin et al. (2014).

Para a obtenção do inoculante, as bactérias foram cultivadas em meio de cultura Dyg's (BALDANI et al., 2014) de forma individualizada, sendo 75 mL de meio de cultura Dyg's com população de 109 células mL⁻¹ de cada estirpe misturado em 175 mL de meio de cultivo, totalizando 250 mL de inoculante, ficando a população por volta de 107 células bacterianas mL⁻¹ conforme descrito por Reis et al. (2009). As estirpes crescidas individualmente em meio de cultura foram veiculadas em turfa estéril de forma individualizada, sendo 250 gramas por embalagens, totalizando 1250 gramas do inoculante e no momento da inoculação foram diluídas em água destilada (1:100 ou 1:50 v/v).

Posteriormente a inoculação, os minitoletes foram plantados em caixas pretas para germinação, contendo substrato comercial Multiplant® (Buschle e Lepper SA, Joinville, Santa Catarina, Brasil) (Figura 2a). O substrato apresentava as seguintes características: pH (água) 5,5, elementos trocáveis (cmolc dm⁻³): H + Al, 0,28; Al, 0,0; Ca, 12,9; Mg, 4,1; K, 1,08; P disponível, (resina), 370 mg dm⁻³; soma de bases, 181,0; capacidade de troca de cátions (CTC), 209; V (100 [Ca + Mg + K]; CTC), 87 %; e SO₄⁻, 67 mg dm⁻³, matéria orgânica, 85 g dm⁻³ e N (%), 6,7. Os minitoletes germinaram e quando atingiu aproximadamente 10 cm de altura (Figura 2b e 2c), foram transplantadas para tubetes de 180 cm³, preenchidos com substrato supracitado. Após transplante para tubetes, as mudas passaram por fases de aclimação por 50 dias, como preconiza o sistema de produção de mudas pré-brotadas (Landell et al., 2012).

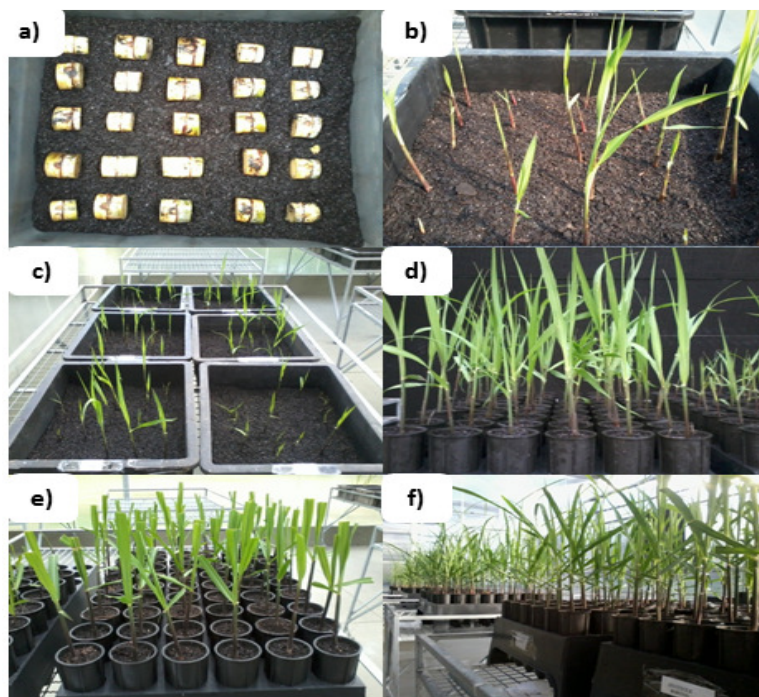


Figura 2. a) Minitoletes no substrato para brotamento; b) e c) Germinação dos minitoletes; d) Mudas crescidas; e) Mudas com 1ª poda de formação; e f) Estágio no qual as mudas foram para transplantadas.

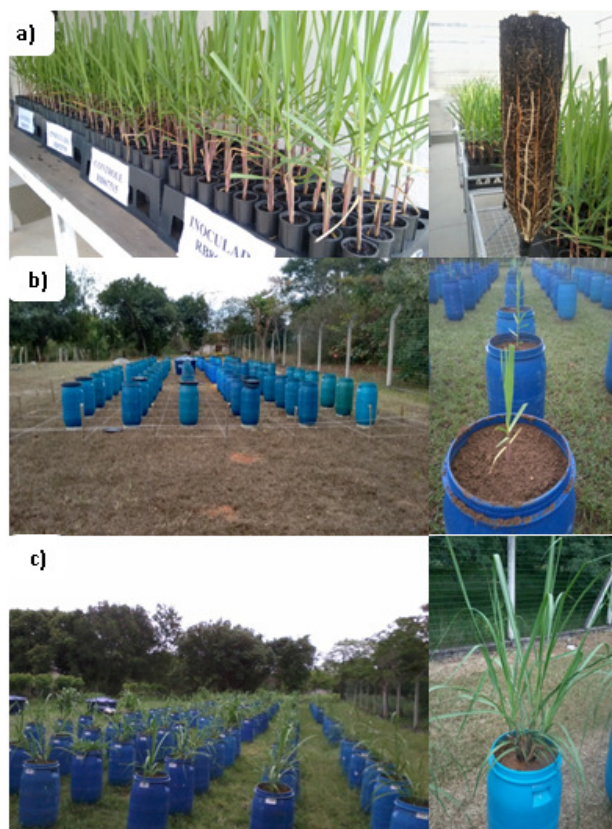


Figura 3. a) Aspecto das mudas pré-brotadas; b) Montagem do experimento no campo em setembro de 2015; c) Desenvolvimento das mudas de cana-de-açúcar aos trinta e dois dias após transplântio nos vasos.

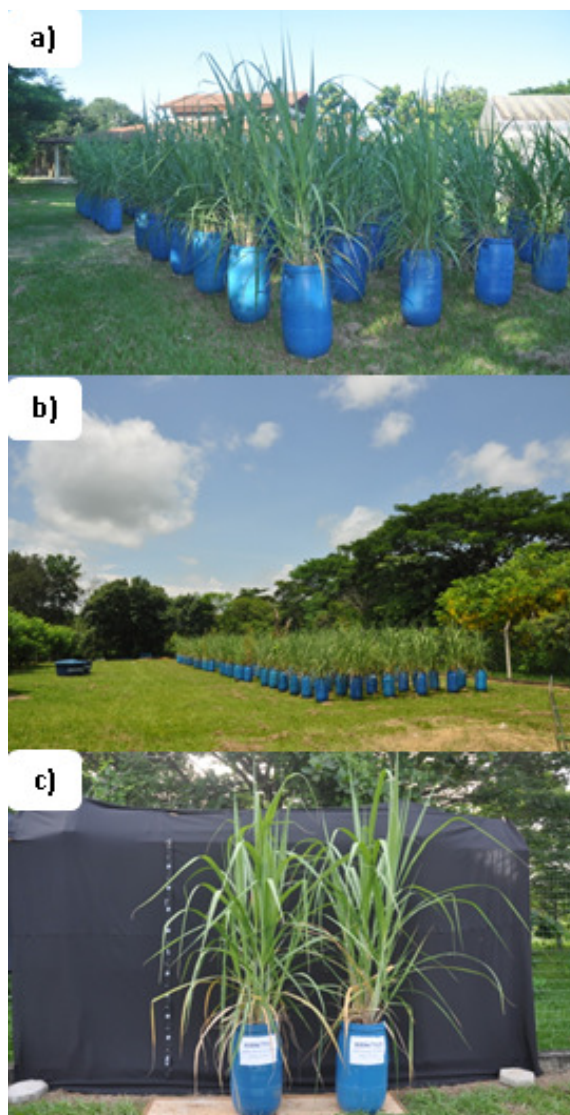


Figura 4. a) Aspecto da cana-de-açúcar a campo aos setenta dias após o transplântio; b) Vista geral da área do experimento; c) Caracterização da altura da cana-de-açúcar.

3.4.5 Avaliações agrônômicas

a) Altura da planta e diâmetro de colmos

A altura (cm) das plantas foi determinada com fita métrica medindo-se da base da planta até a lígula da folha +1 (sistema de numeração de Kuijper). O diâmetro (mm) de colmos foi determinado com uso de um paquímetro aferindo na parte média da planta de cana-de-açúcar, no qual foram realizados em quatro colmos da parcela, e posteriormente obtidos os valores médios.

b) Determinação da massa seca da planta, teor e acúmulo de N

A pesagem do material da parte aérea (folha, palha e colmo-inferior, médio e superior, respectivamente) fresco foram feitos após a colheita. O fracionamento do colmo-inferior, médio e superior foi realizado somente a partir da segunda coleta, ou seja, aos 180, 270 e 360

DAT. O sistema radicular foi retirado após os cortes vertical no vaso com auxílio de uma serra elétrica. O solo foi retirado dos vasos com uso de água corrente e posteriormente foi passado em uma peneira com malha de 1,0 mm, para coletar o máximo de raízes.

Foram retirados subamostras da parte da planta de cana-de-açúcar da folha, palha e colmo inferior, médio e superior que foram levadas para secagem em estufa de circulação forçada de ar a 65°C por 72 horas e posteriormente foram determinados os teores de N nas diferentes partes. O acúmulo de N foi determinado nas diferentes partes da planta: raiz, folha, palha e colmo-inferior, médio e superior aos 360 DAT. O acúmulo de N, em g N por vaso, foi obtido pela multiplicação da massa seca de cada parte em kg, por seu respectivo teor de N em g N kg.

3.4.6 Experimento de vaso - determinação do enriquecimento de ^{15}N nos tecidos vegetais (% átomos ^{15}N em excesso)

No presente estudo foram determinadas análises de % átomos de ^{15}N em excesso nas amostras de cana-de-açúcar que receberam fertilização nitrogenada e inoculada e não inoculada com bactérias diazotróficas em diferentes partes da planta aos 360 DAT. Após coleta das plantas e fracionamento em raiz, folhas, palha e colmo-inferior, médio e superior, estas foram pesadas, secas e moídas para determinar o teor de N e o enriquecimento de ^{15}N (% átomos ^{15}N em excesso).

A determinação do teor N foi realizada segundo o método semimicro-Kjeldahl. As análises de % átomos ^{15}N em excesso foram feitas nos tratamentos que receberam fertilização nitrogenada. Após a análise do teor de N nas partes da planta, conforme descrito previamente, foi feito um cálculo para obter uma subamostra vegetal com 40 μg N para análise de % átomos ^{15}N em excesso. Portanto, a massa da amostra foi calculada como 4 dividido pelo teor de N (%) na amostra. A pesagem foi feita em cápsulas de estanho (5 x 9 mm, D1008, Elemental Microanalysis Ltd. Devon, UK) usando balança com leitura de 0,01 mg (Mettler Toledo AG245, Greifensee, Switzerland). O valor de % átomos ^{15}N em excesso foi medido em um espectrômetro de massa de relação isotópica Delta V Advantage acoplado a um analisador elementar Flash 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

As amostras de colmos e palha foram exceções em relação à definição de massa de amostra descrita acima, não se usou o critério de 40 μg N por amostra devido à baixa repetitividade dos resultados. Após uma série de testes, definiu-se uma massa ideal de 10 mg.

3.4.7 Determinação da eficiência de uso do ^{15}N -fertilizante

A recuperação de N-fertilizante (sulfato de amônio com 2% de ^{15}N em excesso) foi avaliada com a finalidade de verificar o efeito da inoculação na eficiência de uso do N-fertilizante. Com os valores de % átomos de ^{15}N em excesso, foram determinados o N derivado do fertilizante (% Nddf), que foram calculados segundo procedimento descrito pela Agencia Internacional de Energia Atômica - IAEA (2001):

$$\% \text{ Nddf} = \frac{\text{Átomos } ^{15}\text{N em excesso}_{\text{amostra vegetal}}}{\text{Átomos } ^{15}\text{N em excesso}_{\text{Fertilizante}}} \times 100$$

Com o valor de % Nddf, o teor de N na amostra vegetal (% N) e a massa seca das plantas (MSP) em g por vaso, foram possíveis calcular a quantidade de N derivada do fertilizante (QNDDF), em g por vaso, da seguinte forma:

$$QNDDF = MSP \times \frac{\%N}{100} \times \frac{\%Nddf}{100}$$

Dessa forma, a eficiência de uso do N-fertilizante pelas plantas (EUN%) foi calculada da seguinte forma:

$$EUN\% = \frac{QNDDF}{\text{Quantidade de N aplicado por vaso}} \times 100$$

3.4.8 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições e arranjados em esquema fatorial (2×2). Para avaliar o acúmulo de massa seca e o nitrogênio total os fatores componentes dos tratamentos foram: inoculação da cana-de-açúcar com bactérias diazotróficas (com e sem) e fertilização nitrogenada (0 e 45 kg N ha⁻¹). Esses tratamentos foram avaliados em duas variedades de cana-de-açúcar RB867515 e RB92579 nas quatro épocas de colheita (90, 180, 270 e 360 DAT). Para avaliar a eficiência de recuperação de uso do ¹⁵N-fertilizante na cana-de-açúcar o delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com quatro repetições e arranjados em esquema de parcelas subdivididas (2×6). Os fatores componentes dos tratamentos foram: inoculação com bactérias diazotróficas na cana-de-açúcar (com e sem); partes da planta de cana-de-açúcar (raiz, folha, palha e colmo inferior, médio e superior) em duas variedades RB867515 e RB92579 aos 360 DAT. Os dados foram analisados utilizando o software ASSISTAT Versão 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2016) para verificação da normalidade e homogeneidade das variâncias dos erros utilizando o teste Shapiro-Wilk e Bartlett. Os dados foram submetidos a uma análise de variância e, quando houve efeito significativo de tratamentos pelo teste F, foi feita uma comparação de médias pelo teste de Tukey (*p*<0,05).

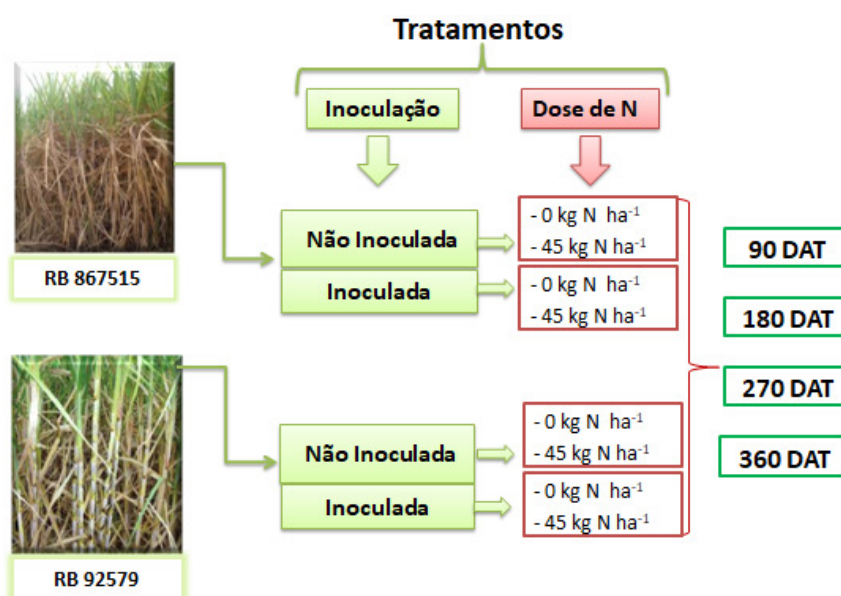


Figura 5. Representação dos tratamentos experimentais para avaliação do acúmulo de massa seca e nitrogênio total.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inoculação com bactérias diazotróficas e a fertilização nitrogenada não influenciou a produção de massa fresca do colmo, massa seca total da planta e acúmulo de N total nas variedades de cana-de-açúcar RB92579 e RB867515 na colheita final aos 360 DAT (Tabela 1). O valor médio de massa fresca do colmo total foi de 10,5 e 10,0 kg vaso⁻¹ nas variedades RB92579 e RB867515. Os valores de massa seca da planta total variaram de 6,2 a 5,6 kg vaso⁻¹ e o acúmulo N total na planta foi de 9,75 e 10,25 g vaso⁻¹ nas variedades RB92579 e RB867515, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Massa fresca de colmo, massa seca e acúmulo de N total das plantas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e fertilização nitrogenada, em duas variedades aos 360 DAT.

Tratamentos	RB92579	RB867515
	Massa fresca de colmo total (kg vaso ⁻¹)	
Não inoculado	10,4 a	10,5 a
Inoculado	10,7 a	9,5 a
Não fertilizado	10,9 a	10,6 a
Fertilizado	10,2 a	9,4 a
Teste F		
Inoculante (I)	0,3 ns	2,1 ns
Fertilizante (F)	1,6 ns	3,8 ns
Interação I × F	0,1 ns	0,3 ns
CV (%)	12	14
	Massa seca da planta total (kg vaso ⁻¹)	
Não inoculado	6,2 a	5,7 a
Inoculado	6,2 a	5,5 a
Não fertilizado	6,1 a	5,8 a
Fertilizado	6,3 a	5,5 a
Teste F		
Inoculante (I)	0,0 ns	0,8 ns
Fertilizante (F)	0,2 ns	3,5 ns
Interação I × F	0,0 ns	0,0 ns
CV (%)	15	9
	Acúmulo de N total da planta (g vaso ⁻¹)	
Não inoculado	9,8 a	10,5 a
Inoculado	9,7 a	10,0 a
Não fertilizado	9,8 a	10,1 a
Fertilizado	9,8 a	10,4 a
Teste F		
Inoculante (I)	0,3 ns	0,2 ns
Fertilizante (F)	0,0 ns	0,8 ns
Interação I × F	0,1 ns	0,2 ns
CV (%)	13	19

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ns: não significativo * e **significativo pelo teste F, a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

Quanto ao diâmetro de colmo, houve interação significativa entre tratamento inoculado e não inoculado na variedade RB867515, aos 270 DAT (Tabela 2). Nesta interação, observou-se que não houve efeito da inoculação no tratamento não fertilizado com N. A aplicação conjunta de fertilizante nitrogenado e inoculação diminuiu o diâmetro de colmos (Tabela 3), mas este efeito não influenciou na produção de matéria seca da planta inteira. Isso demonstra que a fertilização nitrogenada pode ter inibido a ação do inoculante. Provavelmente, há uma alteração fisiológica na planta na presença do N-fertilizante, afetando a associação com os microrganismos promotores de crescimento (REIS JUNIOR et al., 2000).

Quanto à altura da planta e diâmetro do colmo, não observou-se efeitos significativos e duradouros da inoculação e da fertilização nitrogenada. Houve apenas alguns efeitos eventuais quanto à altura das plantas na variedade RB92579, quando inoculada, aos 360 DAT (Tabela 2).

Na variedade RB867515, a inoculação e a fertilização aumentaram a altura da planta aos 180 DAT e 180 e 270 DAT, respectivamente. Resultados semelhantes foram expostos por Gírio et al. (2015), que também constataram que o uso do mesmo inoculante promoveu aumento em altura no crescimento inicial da parte aérea de cana até os 180 DAT.

Tabela 2. Efeito da inoculação e da fertilização nitrogenada na altura e diâmetro da planta de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) em duas variedades e quatro épocas de colheita.

Tratamentos	Altura (m)				Diâmetro (mm)			
	90 DAT	180 DAT	270 DAT	360 DAT	90 DAT	180 DAT	270 DAT	360 DAT
RB92579								
Não inoculado	0,72 a	1,92 a	2,6 a	2,7 b	25 a	26 a	27 a	27 a
Inoculado	0,70 a	1,96 a	2,6 a	2,9 a	25 a	26 a	26 a	26 a
Não fertilizado	0,70 a	1,96 a	2,6 a	2,9 a	25 a	26 a	26 a	26 a
Fertilizado	0,72 a	1,92 a	2,5 a	2,8 a	25 a	26 a	26 a	27 a
Teste F								
Inoculante (I)	0,1 ns	0,2 ns	0,0 ns	16,7**	0,2 ns	1,4 ns	0,2 ns	0,0 ns
Fertilizante (F)	0,4 ns	0,2 ns	1,3 ns	2,1 ns	0,0 ns	0,3 ns	0,3 ns	0,0 ns
Interação I × F	0,4 ns	2,9 ns	0,2 ns	2,1 ns	2,6 ns	0,0 ns	3,8 ns	3,3 ns
CV (%)	9	8	4	4	7	5	8	4
RB867515								
Não inoculado	0,72 a	1,9 b	2,7 a	3,0 a	27 a	26 a	28 a	27 a
Inoculado	0,77 a	2,0 a	2,7 a	2,9 a	26 a	25 a	26 b	27 a
Não fertilizado	0,72 a	1,8 b	2,8 a	3,0 a	26 a	26 a	27 a	27 a
Fertilizado	0,77 a	2,0 a	2,6 b	2,9 a	26 a	25 a	27 a	26 a
Teste F								
Inoculante (I)	3,8 ns	6,6 **	0,7 ns	1,2 ns	1,3 ns	1,5 ns	6,9*	0,0 ns
Fertilizante (F)	3,4 ns	16,2 *	28,2 **	3,9 ns	0,4 ns	1,7 ns	1,0 ns	1,0 ns
Interação I × F	0,9 ns	3,5 ns	0,3 ns	0,9 ns	0,7 ns	0,4 ns	7,0*	0,5 ns
CV (%)	6	4	3	4	4	7	3	5

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ns: não significativo * e **significativo pelo teste F, a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

Tabela 3. Desdobramento do efeito da interação entre inoculação e fertilização nitrogenada no diâmetro de colmo na variedade RB867515, aos 270 DAT.

Tratamento	Diâmetro (mm)	
	Não fertilizado	Fertilizado
Não inoculado	28 aA	28 aA
Inoculado	28 aA	26 bB

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Na variedade RB92579, a inoculação aumentou massa seca da folha aos 180 DAT (Tabela 4). Verifica-se que, com a fertilização nitrogenada resultados similares foram encontrados por (MATOSO et al., 2016) onde a inoculação com bactérias diazotróficas, principalmente *Herbaspirillum*, promove aumento no número de folhas da cana-de-açúcar.

Tabela 4. Efeito da inoculação com bactérias diazotróficas e da fertilização nitrogenada na produção de massa seca de diferentes partes das plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) na variedade RB92579, em quatro épocas de colheita.

Tratamentos	90 DAT	180 DAT	270 DAT §	360 DAT
	Massa seca de raiz (g vaso ⁻¹)			
Não inoculado	69 a	278 a	196 a	356 a
Inoculado	67 a	257 a	192 a	421 a
Não fertilizado	67 a	267 a	194 a	380 a
Fertilizado	70 a	268 a	195 a	398 a
Teste F				
Inoculante (I)	0,3 ns	1,3 ns	0,3 ns	2,9 ns
Fertilizante (F)	0,3 ns	0,0 ns	0,3 ns	0,2 ns
Interação I × F	0,1 ns	0,1 ns	1,9 ns	0,1 ns
CV (%)	11	13	15	19
Tratamentos	Massa seca de colmo (g vaso ⁻¹)			
	90 DAT	180 DAT	270 DAT	360 DAT
Não inoculado	153 a	1609 a	2926 a	4244 a
Inoculado	150 a	1743 a	3081 a	4130 a
Não fertilizado	153 a	1700 a	3081 a	4166 a
Fertilizado	151 a	1652 a	2926 a	4208 a
Teste F				
Inoculante (I)	0,0 ns	2,6 ns	0,5 ns	0,1 ns
Fertilizante (F)	0,0 ns	0,3 ns	1,7 ns	0,0 ns
Interação I × F	1,5 ns	0,2 ns	1,5 ns	0,5 ns
CV (%)	24	10	15	19
Tratamentos	Massa seca de folha (g vaso ⁻¹)			
	90 DAT	180 DAT	270 DAT	360 DAT
Não inoculado	572 a	645 b	587 a	537 a
Inoculado	512 a	786 a	598 a	535 a
Não fertilizado	545 a	696 a	557 a	523 a
Fertilizado	539 a	735 a	628 a	549 a
Teste F				
Inoculante (I)	2,6 ns	7,8*	0,1 ns	0,0 ns

Continua...

Continuação da **Tabela 4.**

Massa seca de folha (g vaso ⁻¹)				
Teste F				
Fertilizante (F)	0,0 ns	0,6 ns	0,1 ns	0,0 ns
Interação I × F	3,8 ns	0,0 ns	2,8 ns	0,1 ns
CV (%)	14	14	4	19
Massa seca de palha (g vaso ⁻¹)				
Não inoculado	34 a	337 a	659 a	988 a
Inoculado	33 a	324 b	617 a	1040 a
Não fertilizado	35 a	345 a	664 a	1001 a
Fertilizado	32 a	315 b	611 b	1027 a
Teste F				
Inoculante (I)	0,3 ns	6,3 *	4,6 ns	0,6 ns
Fertilizante (F)	2,6 ns	32,7**	7,2 *	0,2 ns
Interação I × F	3,4 ns	44,3 **	1,5 ns	0,2 ns
CV (%)	13	3	6	13

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ns: não significativo * e **significativo pelo teste F, a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente. [§]Transformados na função de log (x) para massa seca de raiz (270 DAT).

No desdobramento do efeito da interação entre inoculação e fertilização nitrogenada quanto a massa seca de palha na variedade RB92579 aos 180 DAT, verifica-se que, com a fertilização nitrogenada a inoculação aumentou a massa seca da palha e sem a fertilização, verifica-se o efeito contrário (Tabela 5). A menor produção da massa seca da palha quando inoculada, pode ser provocada por uma maior manutenção da vida útil das folhas com menor redistribuição de N das folhas mais velhas para as mais novas. Da mesma forma, na presença de N-fertilizante, a planta inoculada foi estimulada ao crescimento devido a maior oferta de N, gerando assim, a formação de folhas novas e menor translocação de N e conseqüentemente uma menor formação de palha.

O tratamento que não recebeu N-fertilizante teve maior produção de palha, quando não inoculado (Tabela 5), o que poderia ser explicada pela ausência de N em níveis adequados, o que promove a redistribuição do N, e conseqüentemente, ocorreu a senescência de folhas, formando maior massa seca de palha.

Tabela 5. Desdobramento do efeito da interação entre inoculante e fertilização nitrogenada quanto a massa seca de palha na variedade RB92579, aos 180 DAT.

Tratamento	Massa seca de palha (g vaso ⁻¹)	
	Não fertilizado	Fertilizado
Não inoculado	339 aA	304 bB
Inoculado	321 bA	326 aA

Médias seguidas por letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Constatou-se diferença para a massa seca de raiz aos 180 e 360 DAT, massa seca de folhas aos 270 DAT e massa seca de palha aos 270 e 360 DAT na variedade RB867515 (Tabela 6). A maior massa seca de raiz foi aos 180 DAT no tratamento não inoculado e não fertilizado, isto ocorre possivelmente devido ao estímulo natural do crescimento radicular na ausência de nutrientes para suprir a carência destes, mas não se tem explicação definitiva.

Tabela 6. Efeito da inoculação e da fertilização nitrogenada na produção de massa seca de diferentes partes das plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) na variedade RB867515, em quatro épocas de colheita.

Tratamentos	90 DAT	180 DAT	270 DAT	360 DAT [§]
	Massa seca da raiz (g vaso ⁻¹)			
Não inoculado	93 a	358 a	226 a	412 a
Inoculado	89 a	301b	279 a	451 a
Não fertilizado	93 a	356a	233 a	483 a
Fertilizado	89 a	303 b	272 a	380 b
Teste F				
Inoculante (I)	0,3 ns	8,9 *	1,6 ns	0,9 ns
Fertilizante (F)	0,3 ns	7,9 *	0,8 ns	6,2 *
Interação I × F	0,1 ns	0,5 ns	0,1 ns	3,3 ns
CV (%)	16	11	33	19
Massa seca de colmo (g vaso⁻¹)				
Não inoculado	189 a	1576 a	3007 a	3714 a
Inoculado	186 a	1607 a	3006 a	3537 a
Não fertilizado	181 a	1575 a	2859 a	3799 a
Fertilizado	194 a	1608 a	3153 a	3452 a
Teste F				
Inoculante (I)	0,01 ns	0,2 ns	0,0 **	1,0 ns
Fertilizante (F)	0,37 ns	0,2 ns	2,5 ns	4,8 ns
Interação I × F	0,15 ns	0,2 ns	1,8 ns	1,4 ns
CV (%)	22	9	12	10
Massa seca de folha (g vaso⁻¹)				
Não inoculado	575 a	594 a	534 a	567 a
Inoculado	571 a	613 a	470 b	573 a
Não fertilizado	589 a	630 a	448 b	565 a
Fertilizado	557 a	577 a	556 a	574 a
Teste F				
Inoculante (I)	0,0 ns	0,4 ns	16,8 **	0,0 ns
Fertilizante (F)	0,9 ns	3,2 ns	47,1 **	0,0 ns
Interação I × F	2,5 ns	0,1 ns	9,2*	3,4 ns
CV (%)	11	9	6	27
Massa seca da palha (g vaso⁻¹)				
Não inoculado	43 a	363 a	760 a	1036 a
Inoculado	47 a	357 a	778 a	948 a
Não fertilizado	42 a	356 a	695 b	999 a
Fertilizado	47 a	363 a	843 a	985 a
Teste F				
Inoculante (I)	1,2 ns	0,4 ns	0,9 ns	3,8 ns
Fertilizante (F)	1,7 ns	0,5 ns	64,4 **	0,1 ns

Continuação da **Tabela 6.**

————— Massa seca da palha (g vaso ⁻¹) —————				
	Teste F			
Interação I × F	0,3 ns	0,1 ns	6,3 *	29,6 **
CV (%)	17	4	4	9

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ns: não significativo * e **Significativo pelo teste F, a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente. §Trasformados na função de log (x) para massa seca do colmo (360 DAT).

Em relação à variedade RB867515, houve interação significativa para massa seca da folha aos 270 DAT e para massa seca da palha aos 270 e 360 DAT (Tabela 7). No desdobramento do efeito da interação na variedade RB867515, quanto à massa seca de folha, verificou-se que na presença de N-fertilizante, a inoculação obteve menor valor. Independente da inoculação, a fertilização nitrogenada aumentou a massa seca de folha na variedade RB867515. Esse efeito dever-se a carência de N, o qual é de extrema importância para a formação das folhas. Para a variedade RB867515 observou-se que, na ausência de N-fertilizante, a inoculação aumentou a produção de palha aos 270 e 360 DAT, sendo esta variedade RB867515, mais responsiva a inoculação do que a variedade RB92579.

Essa diferença na produção de biomassa entre variedades quando inoculadas ocorre devido à interação entre a planta e a bactéria, sendo bem conhecido no caso de bactérias diazotróficas. Estudos prévios observaram que a variedade RB867515 pode ser classificada como responsiva a aplicação do inoculante contendo bactérias diazotróficas (REIS et al., 2006; PEREIRA et al., 2013). Gírio (2014) também encontrou maior produção de massa seca da palha na variedade RB867515 quando inoculada.

Ainda aos 270 DAT percebe-se que, independente da inoculação na variedade RB867515 aumentou a massa seca de palha quando fertilizada (Tabela 7). Isso pode ser explicado pela carência de N, em consequência promover uma menor produção de folhas e, consequentemente, menos palha em comparação aos tratamentos com maior oferta de N, mas não se tem uma explicação definitiva.

Por fim, aos 360 DAT, o tratamento inoculado produziu menor massa seca de palha do que o não inoculado na presença de N-fertilizante (Tabela 7). Trabalhos na literatura mencionam que pode ocorrer uma alteração fisiológica na planta na presença do N-fertilizante, afetando a interação com as bactérias diazotróficas. No entanto, isso só foi constatado com doses altas de adubação nitrogenada ($\geq 120 \text{ kg ha}^{-1}$) (FUENTES-RAMIREZ et al., 1993; REIS JUNIOR et al., 2000). Rivera et al. (1991); Pedula et al., (2016) também obteve resultados em experimento de campo mostrando que altas concentrações de N mineral diminuíram a população de bactérias diazotróficas na cultura da cana-de-açúcar, e que a população foi restaurada quando o conteúdo de N mineral do solo diminuiu.

Tabela 7. Desdobramento do efeito da interação entre inoculação e fertilização nitrogenada quanto a massa seca da folha e palha na variedade RB867515.

Tratamento	Não fertilizado	Fertilizado
	Massa seca da folha 270 DAT (g vaso ⁻¹)	
Não inoculado	456aB	612 aA
Inoculado	439 aB	500 bA
Massa seca da palha 270 DAT (g vaso ⁻¹)		
Não inoculado	664 bB	857 aA

Continua...

Continuação da **Tabela 7.**

	Massa seca da palha 270 DAT (g vaso ⁻¹)	
Inoculado	727 aB	828 aA
	Massa seca da palha 360 DAT (g vaso ⁻¹)	
Não inoculado	921 bB	1151 aA
Inoculado	1078 aA	819 bB

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Em relação ao efeito da inoculação e da fertilização no acúmulo de N na variedade RB92579, não houve efeito significativo e consistente da inoculação e da fertilização nitrogenada em nenhuma parte da planta. Houve apenas alguns efeitos eventuais no acúmulo de N na raiz aos 90 DAT, colmo aos 180 DAT, folha aos 90 e 360 DAT e palha aos 270 e 360 DAT (Tabela 8). Houve maior acúmulo de N na raiz nos tratamentos não inoculado e maior acúmulo de N na raiz nos tratamentos com N-fertilizante (Tabela 8). Conforme discutido anteriormente, a carência de N deve ter estimulado a exploração de um maior volume de solo pelo sistema radicular, o que consequentemente acarretou em maior acúmulo de N na raiz nos tratamentos não inoculados.

O tratamento inoculado gerou maior acúmulo de N no colmo aos 180 DAT em relação ao não inoculado (Tabela 8). Quanto ao acúmulo de N na folha, só houve resposta aos 360 DAT (Tabela 8), onde o tratamento inoculado gerou maior acúmulo. Nesta época (360 DAT) com a formação dos colmos e das outras partes já estabelecidas, o N absorvido pela planta acumulou no colmo, o que possivelmente indica que houve uma redução na translocação do N do colmo para as partes mais novas da planta, já que a mesma estava formada.

Tabela 8. Efeito da inoculação e da fertilização nitrogenada quanto ao acúmulo de N nas diferentes partes das plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) na variedade RB92579, em quatro épocas de colheita.

Tratamentos	90 DAT	180 DAT	270 DAT	360 DAT
	Acúmulo de N na raiz (g N vaso ⁻¹)			
Não inoculado	0,52 a	0,98 a	0,63 a	1,30 a
Inoculado	0,42 b	0,81 a	0,62 a	1,15 a
Não fertilizado	0,43 b	0,95 a	0,63 a	1,16 a
Fertilizado	0,51 a	0,84 a	0,63 a	1,29 a
Teste F				
Inoculante (I)	10,0*	2,3 ns	0,0 ns	2,9 ns
Fertilizante (F)	5,6*	0,8 ns	0,0 ns	2,1 ns
Interação I × F	0,0ns	0,2 ns	7,2*	1,8 ns
CV (%)	14	25	19	13
	Acúmulo de N no colmo (g N vaso ⁻¹)			
Não inoculado	1,53 a	1,96 b	3,59 a	3,28 a
Inoculado	1,63 a	2,37 a	3,44 a	3,58 a
Não fertilizado	1,55 a	2,18 a	3,67 a	3,56 a
Fertilizado	1,61 a	2,16 a	3,36 a	3,30 a
Teste F				
Inoculante (I)	0,3 ns	5,8*	0,2 ns	2,3 ns

Continua...

Continuação da **Tabela 8.**

Acúmulo de N no colmo (g N vaso ⁻¹)				
Teste F				
Fertilizante (F)	0,8 ns	0,0 ns	1,1 ns	1,7 ns
Interação I × F	2,1 ns	0,8 ns	0,3 ns	3,3 ns
CV (%)	25	15	16	11
Acúmulo de N na folha (g N vaso ⁻¹)				
Não inoculado	5,78 a	4,19 a	3,68 a	2,13 b
Inoculado	5,00 a	4,30 a	3,29 a	2,91 a
Não fertilizado	5,44 a	4,20 a	3,31 a	2,47 a
Fertilizado	5,01 a	4,29 a	3,66 a	2,57 a
Teste F				
Inoculante (I)	4,9 ns	0,1 ns	0,5 ns	7,0*
Fertilizante (F)	0,0 ns	0,8 ns	0,4 ns	0,1 ns
Interação I × F	6,68*	0,31 ns	3,65 ns	0,00 ns
CV (%)	12	15	30	23
Acúmulo de N na palha (g N vaso ⁻¹)				
Não inoculado	0,17 a	0,90 a	1,53 a	1,79 a
Inoculado	0,15 a	0,83 a	1,67 a	1,66 a
Não fertilizado	0,16 a	0,88 a	1,47 b	1,62 b
Fertilizado	0,16 a	0,85 a	1,74 a	1,83 a
Teste F				
Inoculante (I)	1,4 ns	2,8 ns	3,1 ns	2,9 ns
Fertilizante (F)	0,1 ns	0,5 ns	11,5 **	6,8*
Interação I × F	3,1 ns	0,2 ns	2,5 ns	1,4 ns
CV (%)	15	9	9	9

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Ns: Não significativo* e **Significativo pelo teste F, a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

Discorre-se agora sobre o desdobramento da interação inoculante e fertilização nitrogenada no acúmulo de N na folha aos 90 DAT da variedade RB92579 (Tabela 9). Observa-se, que na presença de N-fertilizante, o tratamento não inoculado apresentou maior acúmulo de N na folha do que o tratamento inoculado e que na ausência de N-fertilizante ambos os tratamentos (inoculado e não inoculado) apresentaram resultados semelhantes (Tabela 9). Há um antagonismo entre N-fertilizante no acúmulo de N na folha e que aos 90DAT a inoculação não foi tão eficaz para fornecer N, tendo em vista a semelhança entre o tratamento inoculado com a testemunha (sem N-fertilizante e sem inoculante).

Tabela 9. Desdobramento do efeito da interação entre inoculação e fertilização nitrogenada no acúmulo de N na folha na variedade RB92579.

Tratamento	Não fertilizado	Fertilizado
	Acúmulo de N na folha 90 DAT (g vaso ⁻¹)	
Não inoculado	5,4 aA	6,2 aA
Inoculado	5,5 aA	4,5 bA

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O efeito da inoculação e da fertilização nitrogenada no acúmulo de N da variedade RB867515, também não apresentou efeito duradouro consistente, houve apenas diferença significativa na raiz aos 180 DAT, o colmo aos 180 e 270 DAT, folha aos 90 e 270 DAT e palha aos 90 e 270 DAT (Tabela 10). Para o acúmulo de N na raiz aos 180 DAT houve a mesma tendência dos resultados na RB92579, onde o tratamento não inoculado acumulou mais N na raiz, possivelmente devido uma maior exploração das raízes no solo em busca de N.

Em relação ao acúmulo de N no colmo, o tratamento não inoculado acumulou mais N aos 180 e 270 DAT e aos 90 DAT, o maior acúmulo ocorreu nas folhas na variedade RB867515 (2,3 g vaso⁻¹) (Tabela 10). Para essa variedade, o resultado parece não estar ligado a um aumento e/ou fornecimento de N, mas, sim, a algum efeito hormonal.

Trabalho desenvolvido por Pereira et al. (2013) também não verificaram diferença no teor de N no ponteiro (folha verdes), colmo e N-total da cana-de-açúcar nestas variedades analisadas quanto a inoculação. De maneira similar, Gírio (2014) não constataram alteração no teor de N nas raízes e parte aérea quanto à inoculação. Essa falta de resposta no N acumulado em tratamentos inoculado comparado ao controle são evidências de que o crescimento observado nas plantas se deu mais em função dos efeitos fisiológicos causados pelas bactérias na planta (GÍRIO et al., 2015).

Tabela 10. Efeito da inoculação e da fertilização nitrogenada quanto ao acúmulo de N nas diferentes partes da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) na variedade RB867515, em quatro épocas de colheita.

Tratamentos	90 DAT	180 DAT	270 DAT	360 DAT
	Acúmulo de N na raiz (g N vaso ⁻¹)			
Não inoculado	0,61 a	1,15 a	0,83 a	1,40 a
Inoculado	0,55 a	0,98 b	0,92 a	1,60 a
Não fertilizado	0,59 a	1,15 a	0,83 a	1,70 a
Fertilizado	0,57 a	0,97 b	0,92 a	1,27 b
Teste F				
Inoculante (I)	1,0 ns	9,2*	0,6 ns	2,3 ns
Fertilizante (F)	0,3 ns	9,9*	0,8 ns	11,9 **
Interação I × F	0,3 ns	0,4 ns	0,0 ns	0,8 ns
CV (%)	17	10	28	17
Acúmulo de N no colmo (g N vaso ⁻¹)				
Não inoculado	1,15 a	2,67 a	4,14 a	4,18 a
Inoculado	1,55 a	2,45 b	3,26 b	3,49 a
Não fertilizado	1,35 a	2,68 a	3,23 b	3,55 a
Fertilizado	1,65 a	2,45 b	4,17 a	4,12 a
Teste F				
Inoculante (I)	0,3 ns	6,3*	6,2*	4,7 ns
Fertilizante (F)	2,6 ns	6,5*	7,2*	3,3 ns
Interação I × F	1,1 ns	2,0 ns	4,0 ns	0,8 ns
CV (%)	25	7	18	16

Continua...

Continuação da **Tabela 10.**

Acúmulo de N na folha (g N vaso ⁻¹)				
Não inoculado	7,7 a	3,7 a	3,1 a	2,8 a
Inoculado	5,6 b	3,2 a	3,3 a	3,3 a
Não fertilizado	6,5 a	3,6 a	3,5 a	2,5 b
Fertilizado	6,2 a	3,3 a	2,9 b	3,6 a
Teste F				
Inoculante (I)	17,5 **	1,8 ns	4,6 ns	4,9 ns
Fertilizante (F)	1,13 ns	0,79 ns	14,89 **	40,32**
Interação I × F	2,57 ns	0,33 ns	54,60**	1,27 ns
CV (%)	10	21	8	12
Acúmulo de N na palha (g N vaso ⁻¹)				
Não inoculado	0,1 a	0,9 a	2,1 a	1,7 a
Inoculado	0,1 a	0,8 a	1,9 a	1,7 a
Não fertilizado	0,1 b	0,8 a	1,7 b	1,7 a
Fertilizado	0,2 a	0,9 a	2,3 a	1,7 a
Teste F				
Inoculante (I)	0,2 ns	0,8 ns	1,4 ns	0,2 ns
Fertilizante (F)	8,2*	0,6 ns	22,7 **	0,3 ns
Interação I × F	1,7 ns	2,5 ns	3,9 ns	6,2 *
CV (%)	16	15	13	13

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ns: não significativo * e **Significativo pelo teste F, a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

O acúmulo de N na folha aos 270 DAT na variedade RB867515, na presença de N-fertilizante, o tratamento inoculado acumulou menos N na folha, ou seja, o N-fertilizante diminuiu a ação do inoculante no acúmulo de N na folha aos 270 DAT (Tabela 11). Esse resultado é reforçado também pela constatação de que na presença do inoculante o tratamento sem N-fertilizante acumulou maior quantidade de N em relação ao inoculado e com N-fertilizante (Tabela 11). Alterações fisiológicas na planta na presença do N-fertilizante, afeta a interação com as bactérias diazotróficas. No entanto, isso só foi constatado com doses altas de adubação nitrogenada ($\geq 120 \text{ kg ha}^{-1}$) (RIVERA et al., 1991, FUENTES-RAMIREZ et al., 1993; REIS JUNIOR et al., 2000).

Tabela 11. Desdobramento do efeito da interação entre inoculação e fertilização nitrogenada quanto ao acúmulo de N na folha na variedade RB867515.

Tratamento	Não fertilizado	Fertilizado
	Acúmulo de N na folha 270 DAT (g vaso ⁻¹)	
Não inoculado	2,8 bB	3,3 aA
Inoculado	4,1 aA	2,5 bB

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os valores médios observados na produção de massa seca total foram de 5,8 e 5,4 kg vaso⁻¹ e os valores médios de acúmulo de N total foram de 9,7 e 10,4 g N vaso⁻¹ nas variedades RB92579 e RB867515, respectivamente, sem efeito significativo da inoculação.

Observa-se que os valores das variáveis abordadas não foram influenciados pela inoculação com bactérias diazotróficas (Tabela 12).

Tabela 12. Total de massa seca e acúmulo de N das plantas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e fertilização nitrogenada, em duas variedades aos 360 DAT.

Tratamentos	RB92579	RB867515
	Massa seca total (kg vaso ⁻¹)	
Não inoculado	5,8 a	5,6 a
Inoculado	5,9 a	5,2 a
CV%	8	9
Tratamentos	Acúmulo de N total (g N vaso ⁻¹)	
	RB92579	RB867515
Não inoculado	9,9 a	10,4 a
Inoculado	9,6 a	10,4 a
CV%	15	13

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Em geral, os tratamentos em estudo não apresentaram influência significativa consistente ou estável na maioria das variáveis associadas com rendimento da cultura em nenhuma das duas variedades em estudo, a pesar de estar se trabalhando em solo pobre em N disponível. Estes resultados indicam que cana-de-açúcar é realmente uma cultura muito adaptada a solos pobres em N disponível, e que, neste caso, a FBN nativa associada às plantas poderia ser uma fonte importante de N para a nutrição da cultura, como se verá no segundo capítulo desta tese.

Quanto aos valores de % átomos ¹⁵N excesso, houve influência da inoculação com bactérias diazotróficas apenas na variedade RB92579 (Tabela 13). Esta variedade de cana RB92579 tem relatos de sua grande capacidade de extração e acúmulo de N (OLIVEIRA et al., 2010). Os resultados deste trabalho com a variedade RB92579 confirmam que existem diferenças entre as variedades de cana-de-açúcar quanto a capacidade de absorver e utilizar o N (WHAN et al., 2010), em resposta a inoculação.

Aplicando-se ¹⁵N-fertilizante, não se verificou diferenças nos valores de % átomos de ¹⁵Nem excesso nas diferentes partes da planta de cana-de-açúcar em nenhuma das duas variedades em estudo (Tabela 13). Este resultado demonstra que em estudos com objetivos de estimar a recuperação de ¹⁵N proveniente de fertilizante, podem ser amostradas apenas as partes da planta que melhor represente o estado nutricional nitrogenado da planta, o que ajudará na redução no tempo, custo de amostragem e análise de ¹⁵N.

Tabela 13. Valores de % átomos ¹⁵N excesso em plantas de cana-de-açúcar como efeito da adubação com ¹⁵N-fertilizante, com e sem inoculação com bactérias diazotróficas, em duas variedades da cultura.

Tratamentos	RB92579	RB867515
	% átomos ¹⁵ N excesso	% átomos ¹⁵ N excesso
Não inoculado	0,085 b	0,078 a
Inoculado	0,091 a	0,076 a

Continua...

Continuação da Tabela 13.

Tratamentos	RB92579	RB867515
	% átomos ¹⁵ N excesso	% átomos ¹⁵ N excesso
Raiz	0,081 a	0,079 a
Colmo Inferior	0,090 a	0,076 a
Colmo Médio	0,090 a	0,072 a
Colmo Superior	0,084 a	0,800 a
Folha	0,084 a	0,077 a
Palha	0,083 a	0,075 a
Teste F		
Inoculante (I)	10,2 *	1,1 ns
Parte da planta (PP)	2,5 *	0,6 ns
Interação I x PP	0,6 ns	2,7 *
CV _I %	13	6
CV _{pp} %	8	11
Média ponderada – planta inteira		
Não inoculado	0,080 b	0,078 a
Inoculado	0,090 a	0,075 a
CV %	5	3
Média ponderada – parte aérea		
Não inoculado	0,080 b	0,078 a
Inoculado	0,090 a	0,073 a
CV %	5	5

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ns: não significativo; * significativo pelo teste F, a 5% probabilidade.

No desdobramento do efeito da interação entre inoculação e as partes da planta de cana-de-açúcar na variedade RB867515, houve efeito significativo da inoculação na % átomos ¹⁵N excesso nas folhas (Tabela 14).

Tabela 14. Desdobramento do efeito da interação entre inoculação e parte da planta de cana-de-açúcar na variedade RB867515 quanto % átomos ¹⁵N em excesso.

Tratamento	% átomos ¹⁵ N excesso					
	Raiz	Colmo inferior	Colmo médio	Colmo superior	Folha	Palha
Não inoculado	0,076 aA	0,070 aA	0,070 aA	0,085 aA	0,085 aA	0,077 aA
Inoculado	0,080 aA	0,082 aA	0,075 aA	0,075 aA	0,069 bA	0,075 aA

Médias seguidas de mesma letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Em relação ao N derivado do fertilizante nitrogenado (Nddf), apenas na folha houve influência da inoculação na variedade RB92579, com valores foram de 4,9 e 5,5 % para os tratamentos não inoculado e inoculado, respectivamente (Tabela 15).

Observa-se que os valores de QNDDF não tiveram influência da inoculação em nenhuma das duas variedades. Estes apresentaram valores de 0,47 e 0,50 g N vaso⁻¹ para o tratamento não inoculado e inoculado na variedade RB92579 e 0,48 g N vaso⁻¹ em ambos os tratamentos na variedade RB867515 (Tabela 15).

A eficiência de uso do N foi de 59 a 61 % e 60 a 59 % nos tratamentos não inoculado e inoculado nas variedades RB92579 e RB867515 respectivamente (Tabela 15). Estes resultados de eficiência de uso do N são superiores aos encontrados na literatura para cana-de-açúcar, o qual possivelmente associa-se ao fato das plantas, neste estudo, crescerem em volume limitado de solo, no qual teve o solo melhor explorado pelas raízes da planta cana-de-açúcar.

Na cana-de-açúcar, estudos avaliando a eficiência de recuperação do N fertilizante de modo geral é baixa, ficando em média na ordem de 10 a 40% (FORTES et al., 2013). Segundo Joris (2015), o aproveitamento de N proveniente do fertilizante pode atingir valores em torno de 45% em condições de baixo N residual no solo, e em solos adubados com N em ciclos anteriores, o aproveitamento do N-fertilizante não supera 30%. Neste estudo, a EUN não foi influenciada pela inoculação com bactérias diazotróficas em nenhuma das duas variedades (Tabela 15). Pereira (2017), em trabalho realizado com objetivo de avaliar a influência da inoculação com bactérias diazotróficas na EUN em cana planta, primeira e segunda soqueira, também não encontrou influência da inoculação na variedade RB92579.

Tabela 15. Valores de N proveniente da planta derivado do fertilizante (Nddf), quantidade de N derivado do fertilizante (QNDDF) e eficiência de uso do N ou recuperação (EUN) do ¹⁵N-fertilizante pela planta, em duas variedades de cana-de-açúcar, com e sem inoculação com bactérias diazotróficas.

Tratamentos	RB92579			RB867515		
	Nddf (%)	QNDDF (g N vaso ⁻¹)	EUN (%)	Nddf (%)	QNDDF (g N vaso ⁻¹)	EUN (%)
Não inoculado	4,9 b	0,47 a	59 a	4,7 a	0,48 a	60 a
Inoculado	5,5 a	0,50 a	61 a	4,6 a	0,48 a	59 a
CV %	13	13	13	6	16	16

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Em algumas situações se encontra algum efeito varietal na EUN em alguma fase do crescimento da planta. Kolln (2016) encontrou que a eficiência no uso do N por variedades de cana-de-açúcar em condições controladas, na fase inicial de desenvolvimento, a variedade RB867515 foi responsiva a inoculação, porém pouco eficiente na recuperação do N-fertilizante pela planta.

A busca pelo aumento da eficiência no uso de fertilizantes nitrogenados é de extrema relevância. Em geral, a eficiência de uso do N-fertilizante na cultura de cana-de-açúcar avaliada neste trabalho não teve influência das bactérias diazotróficas.

Mesmo sendo observadas variações entre respostas e as interações entre bactérias e variedades de cana-de-açúcar, diversos grupos de bactérias têm demonstrado contribuição significativa quando inoculadas, seja pela capacidade de fixar N, por promoção do crescimento vegetal ou pela eficiência de recuperação de uso de nitrogênio. Novos estudos devem ser direcionados para a obtenção de respostas à inoculação nas principais variedades cultivadas no Brasil.

3.6 CONCLUSÕES

A adubação nitrogenada e a inoculação com bactérias diazotróficas não influenciaram o rendimento de colmos nas variáveis associadas ao crescimento da planta de cana-de-açúcar em nenhuma das duas variedades.

A aplicação de N-fertilizante, ocasionalmente inibiu ou causou efeito antagônico da inoculação em variáveis de crescimento (diâmetro de colmo, massa seca de folha e palha, teor e acúmulo de N na folha), porém sem efeito significativo na produtividade de colmos ao final do experimento aos 360 DAT.

Quando a planta de cana-de-açúcar recebe ^{15}N -fertilizante como fonte adicional de N, o enriquecimento de ^{15}N das diferentes partes da planta tende a uma uniformidade entre elas, independente da variedade e da inoculação com bactérias diazotróficas.

Os resultados indicam que em estudos de recuperação de ^{15}N -fertilizante pela planta de cana-de-açúcar, pode-se amostrar apenas as partes mais representativas indicadoras do estado nutricional nitrogenado da cultura, contribuindo assim com a redução de tempo, de amostragem e no custo das análises de ^{15}N .

A eficiência de recuperação do N-fertilizante pelas plantas de cana-de-açúcar nas duas variedades variou ao redor 60 % e não foi influenciada pela inoculação com bactérias diazotróficas.

4. CAPÍTULO II

USO DA TÉCNICA DE ABUNDÂNCIA NATURAL DE ^{15}N PARA QUANTIFICAR A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NA CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADA COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

4.1 RESUMO

A estimativa da FBN na cultura da cana-de-açúcar por meio da técnica de abundância natural de ^{15}N tem oferecido boas perspectivas sobre a contribuição de nitrogênio para a cultura. Os objetivos do presente trabalho foram (i) avaliar a variação de $\delta^{15}\text{N}$ em diferentes plantas de referência e em diferentes partes das plantas de cana-de-açúcar para quantificação da FBN pela técnica de abundância natural de ^{15}N e (ii) avaliar o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas na quantidade de N-fixado biologicamente em cana-de-açúcar ao longo de um ano de cultivo. O experimento foi conduzido em condições de vasos com uso de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. Os vasos continham 100 kg de solo proveniente da camada de 0-40 cm de um Argissolo. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições e arranjados em esquema de parcelas subdivididas (2x6). Os fatores componentes dos tratamentos foram: inoculação com bactérias diazotróficas na cana-de-açúcar (com e sem); partes da planta de cana-de-açúcar (raiz, folha, palha e colmo inferior, médio e superior) e duas variedades RB867515 e RB92579. Foram determinados os valores de abundância de natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) nas diferentes partes da planta aos 360 DAT. A FBN contribuiu em média, com 48% do N acumulado na variedade RB92579 e com 46% na variedade RB867515, sem efeito significativo da inoculação com bactérias diazotróficas. Não se verificou variação significativa de abundância de natural de ^{15}N do N disponível do solo dos vasos estimado pelas plantas de referência (Sorgo, milho e braquiária). Por outro lado, houve variação significativa nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre as diferentes partes da planta. Esses resultados indicam que a estratégia amostral para quantificação de FBN pela técnica da abundância natural de ^{15}N deve considerar necessariamente a planta inteira de cana-de-açúcar. Mais estudos são necessários para outras variedades comerciais e em condições edafoclimáticas diferentes.

Palavras-chave: Plantas de referência. Abundância Natural ^{15}N . Isótopos de nitrogênio. Fixação de N.

4.2 ABSTRACT

The BNF estimation in sugarcane using the ^{15}N natural abundance technique has offered good prospects on the contribution of nitrogen to the crop. The objectives of the present study were (i) to evaluate the variation of $\delta^{15}\text{N}$ in different reference plants and in different parts of sugarcane plants to quantify the BNF by the ^{15}N natural abundance technique and (ii) to evaluate the effect of diazotrophic bacteria inoculation in the amount of N from BNF in sugarcane seedlings during 1 year of crop. The experiment was conducted under field conditions using pre-sprouted sugarcane seedlings in pots containing 100 kg of soil from the 0-40 cm layer of an Ultisol. The experimental design was in randomized blocks with four replications and arrangements in split plot scheme (2×6). The treatments were: diazotrophic inoculation in sugarcane (with and without); parts of sugarcane plant (lower, middle and upper root, leaf, straw and stalk) in two varieties RB867515 and RB92579. The values of $\delta^{15}\text{N}$ were determined in roots, leaves, straw and in three stem fractions (lower, medium and higher) at 360 DAT. The BNF contributed on average 48% of N accumulated in variety RB92579 and 46% in variety RB867515, without significant effect of inoculation of seedlings with diazotrophic bacteria. There was no significant variation of natural abundance of ^{15}N of available N of the soil estimated by different reference plants. On the other hand, there was significant variation in $\delta^{15}\text{N}$ values in the different parts of the plant. These results indicate that the sampling strategy for quantification of BNF by the ^{15}N natural abundance technique must necessarily consider the whole sugarcane plant. More studies are needed for other commercial varieties and under different soil and climatic conditions.

Keywords: Reference plants. ^{15}N Natural Abundance. Nitrogen isotopes. Fixation of N.

4.3 INTRODUÇÃO

A fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) é um dos processos mais importantes conhecidos na natureza e é realizado apenas por alguns microorganismos, denominados de diazotróficos (DOBEREINER, 1993; BALDANI et al., 2009). A cana-de-açúcar é capaz de se associar com bactérias diazotróficas que fornecem N à planta via o processo de FBN, o que é vantajoso, pois contribui para adequada nutrição nitrogenada da cultura e permite reduzir significativamente o uso de fertilizantes nitrogenados (URQUIAGA et al., 2012).

As técnicas isotópicas de ^{15}N são úteis para quantificar a contribuição da FBN associadas às Poaceae. Especificamente, a técnica baseada na abundância natural de ^{15}N apresenta várias vantagens para quantificar a FBN na cultura de cana-de-açúcar em comparação a outras técnicas isotópicas. É uma técnica que dispensa o uso de ^{15}N fertilizante para marcação prévia do N disponível do solo, permitindo a avaliação da FBN mesmo em plantas crescidas em áreas comerciais já estabelecidas (UNKOVICH et al., 2008). Porém, a acurácia da técnica de abundância natural de ^{15}N para quantificação da FBN em cana-de-açúcar é condicionada: (i) ao emprego criterioso de plantas referência não fixador de N_2 atmosférico ou de fixação desprezível para estimativa da composição isotópica de ^{15}N no N disponível do solo; e (ii) à amostragem de partes das plantas fixadoras que seja representativa da abundância de ^{15}N da planta toda.

A determinação precisa da abundância de ^{15}N do N disponível do solo para as plantas é um dos pressupostos para a utilização da técnica de abundância natural de ^{15}N para quantificação da FBN (UNKOVICH et al., 2008; BODDEY et al., 2001; URQUIAGA et al., 2012; SCHULTZ et al., 2012). Essa quantificação é convencionalmente feita pelo uso de plantas de referência não eficientes para FBN. Essas plantas devem ter enraizamento e marcha de absorção de N do solo similares aos da planta fixadora em avaliação. O cultivo de diferentes plantas de referência em casa de vegetação com amostras das camadas de solo exploradas pela planta fixadora tem sido utilizado para uma quantificação mais precisa da marcação com ^{15}N do N disponível do solo (BATISTA et al., 2014).

A determinação da variação de $\delta^{15}\text{N}$ em diferentes partes da planta é crucial para definição de estratégias de amostragem de biomassa em plantas fixadoras de médio e grande porte, como a cana-de-açúcar ou leguminosas arbóreas. Uma variação significativa de $\delta^{15}\text{N}$ em diferentes partes associada à inviabilidade de se amostrar a biomassa inteira dessas plantas exige uma amostragem de partes representativas em termos de acúmulo de N e $\delta^{15}\text{N}$. Contudo, essa amostragem deve ser feita sem gerar número muito grande de amostras vegetais, onerando excessivamente o custo da análise isotópica de ^{15}N em tecidos vegetais.

As hipóteses do presente estudo foi que: (i) o valor de $\delta^{15}\text{N}$ varia em diferentes partes da planta de cana-de-açúcar exigindo uma estratégia adequada para uma estimativa acurada da FBN; (ii) que o valor de ^{15}N do N disponível do solo independe da espécie de referência usada; e (iii) que a inoculação com bactérias diazotróficas em mudas de cana-de-açúcar aumenta a FBN nessa cultura. Os objetivos do presente trabalho foram (i) avaliar a variação de $\delta^{15}\text{N}$ em diferentes plantas de referência e em diferentes partes das plantas de cana-de-açúcar para quantificação da FBN pela técnica de abundância natural de ^{15}N e (ii) avaliar o efeito da inoculação bactérias diazotróficas na quantidade de N-FBN em mudas de cana-de-açúcar.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental do vaso em campo foi em grande parte descrita no Capítulo I.

4.4.1 Experimento em vasos - estimativa da FBN pela técnica de abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$)

A determinação do teor N foi realizada segundo o método semimicro-Kjeldahl. No presente estudo foram feitas análises de $\delta^{15}\text{N}$ nas amostras dos tratamentos não fertilizados de diferentes partes da planta de cana-de-açúcar (folhas, palha, raiz e partes inferior, média e superior de colmo) colhidas ao final do experimento, aos 360 DAT. Também foi determinado aos 360 DAT o valor de $\delta^{15}\text{N}$ do N total do solo nos vasos, realizando a coleta nos quatro blocos e com quatro repetições por bloco.

Após a análise do teor de N nas partes da planta foi feito um cálculo para se obter uma subamostra vegetal com 40 μg N para análise de $\delta^{15}\text{N}$. Portanto, a massa da amostra foi calculada como 4 dividido pelo teor de N (%) na amostra. A pesagem foi feita em cápsulas de estanho (5 x 9 mm, D1008, Elemental Microanalysis Ltd, Devon, UK) usando balança com leitura de 0,01 mg (Mettler Toledo AG245, Greifensee, Switzerland). O valor de $\delta^{15}\text{N}$ foi medido em um espectrômetro de massa de relação isotópica Delta V Advantage acoplado a um analisador elementar Flash 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). As amostras de colmos e palha foram exceções em relação à definição de massa de amostra descrita acima, não se usou o critério de 40 μg N por amostra devido à baixa repetitividade dos resultados. Após uma série de testes, definiu-se uma massa ideal de 10 mg.

O N derivado da FBN foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Ndfa} = \frac{(\delta^{15}\text{N PTNF} - \delta^{15}\text{N PTF})}{(\delta^{15}\text{N PTNF} - \text{B})} \times 100$$

$\delta^{15}\text{N PTNF}$ – Valor de $\delta^{15}\text{N}$ do solo obtido das plantas controle não fixadoras, utilizadas como referência.

$\delta^{15}\text{N PTF}$ - Valor de $\delta^{15}\text{N}$ da planta teste fixadora de N_2 (cana-de-açúcar).

B – Valor da discriminação isotópica de ^{15}N realizado pelas plantas no processo de FBN, no caso de plantas não leguminosas é considerado igual à zero.

4.4.2 Determinação dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ em plantas de referência

Para quantificar a contribuição da FBN em cana-de-açúcar pela técnica da abundância natural de ^{15}N , avaliou-se a abundância de ^{15}N do N disponível do solo cultivando-se três espécies de plantas referência não fixadoras ou com fixação relativamente não significativa em relação à cana-de-açúcar: sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], milheto [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] e braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf). Essas plantas foram cultivadas separadamente em vasos adicionais em cada um dos quatro blocos do experimento. Além desse experimento, as plantas de referência também foram cultivadas em casa de vegetação em copos de 500 mL, utilizando o mesmo solo processado e utilizado nos vasos no campo. Os copos receberam 400 g de solo seco ao ar, e deixados em pré-incubação antes da semeadura das plantas de referência.

Todos os vasos ou copos foram cultivados com apenas uma espécie de referência. Cada unidade experimental (vaso ou copo) foi semeada com 6 a 8 sementes. Um desbaste foi feito após uma semana, deixando apenas quatro plântulas por cada unidade experimental. As plantas referências foram cultivadas até o momento que apresentou amarelecimento sinal de esgotamento do N disponível no solo. As plantas foram coletadas e levadas a estufa de circulação forçada de ar a 65°C por 72 horas e, posteriormente, moídas em moinho tipo Wiley (2 mm) para depois, serem moídas mais finamente em moinho de rolos, necessária para as análises isotópicas. A determinação do teor N foi feita segundo o método semimicro-Kjeldahl (NOGUEIRA e SOUZA, 2005). Após a análise do teor de N nas partes da planta, foram determinados os pesos para análise de $\delta^{15}\text{N}$, conforme descrito anteriormente para as amostras isotópicas de cana-de-açúcar.

4.4.3 Determinação da massa seca e acúmulo de N aos 360 DAT

A pesagem do material da parte aérea (folha, palha e colmo-inferior, médio e superior, respectivamente) fresco foi realizada após a colheita. O sistema radicular foi retirado após os cortes vertical no vaso com auxílio de uma serra elétrica. O solo foi retirado dos vasos com uso de água corrente e posteriormente foi passado em uma peneira com malha de 1,0 mm, para coletar o máximo de raízes.

Foram retirados subamostras da parte da planta de cana-de-açúcar da folha, palha e colmo inferior, médio e superior que foram levadas para secagem em estufa de circulação forçada de ar a 65°C por 72 horas e posteriormente foram determinados os teores de N nas diferentes partes.

O acúmulo de N foi determinado nas diferentes partes da planta: raiz, folha, palha e colmo-inferior, médio e superior aos 360 DAT. O acúmulo de N, em g N por vaso, foi obtido pela multiplicação da massa seca de cada parte em kg, por seu respectivo teor de N em g N kg.

4.4.4 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições e arranjados em esquema de parcelas subdivididas (2x6). Os fatores componentes dos tratamentos foram: inoculação com bactérias diazotróficas (com e sem) na cana-de-açúcar; partes da planta de cana-de-açúcar (raiz, folha, palha e colmo inferior, médio e superior) em duas variedades RB867515 e RB92579.

Os dados foram analisados utilizando-se o software ASSISTAT Versão 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2016) para verificação da normalidade e homogeneidade das variâncias dos erros utilizando o teste Shapiro-Wilk e Bartlett. Os dados foram submetidos a uma análise de variância e, quando houve efeito significativo de tratamentos pelo teste F, foi feita uma comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.5 RESULTADO E DISCUSSÃO

Não foi verificada influência significativa da inoculação com bactérias diazotróficas na massa seca e no acúmulo de N nas duas variedades. Foram observados valores médios de massa seca de 6,1 kg vaso⁻¹ e um acúmulo médio de N de 9,8 g N vaso⁻¹ em ambas variedades (Tabela 16).

Tabela 16. Massa seca e acúmulo de N em duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas ou não com bactérias diazotróficas.

Tratamentos	RB92579	RB867515
	Massa seca total (kg vaso ⁻¹)	
Não inoculado	6,1 a	6,3 a
Inoculado	6,1 a	5,8 a
CV%	11	12
Tratamentos	Acúmulo de N total (g N vaso ⁻¹)	
	RB92579	RB867515
Não inoculado	9,7 a	9,7 a
Inoculado	9,8 a	9,8 a
CV%	9	9

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Houve variação significativa na quantidade acumulada de N nas diferentes partes da planta decana-de-açúcar, com maiores quantidades acumuladas nas folhas em ambas variedades (Tabela 17). A interação não significativa de tratamentos mostra que a inoculação não influenciou a variação da quantidade de N acumulada nas diferentes partes das plantas da variedade RB92579 (Tabela 17).

Tabela 17. N acumulado em diferentes partes da planta de cana-de-açúcar inoculada e não inoculada com bactérias diazotróficas em duas variedades aos 360 DAT.

Tratamentos	RB92579	RB867515
	N acumulado ⁺ g N vaso ⁻¹	
Raiz	1,3 c	1,8 b
Colmo inferior	1,3 bc	1,5 b
Colmo médio	1,0 c	1,1 c
Colmo superior	1,2 c	0,7 d
Folha	2,5 a	2,4 a
Palha	1,6 b	1,7 b
Teste F		
Inoculante (I)	0,3 ns	7,8 ns
Parte da planta (PP)	26,8**	54,4 **
Interação I x PP	1,6 ns	2,8 *
CV%	52	15

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ns: não significativo * e **significativo pelo teste F, a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente. ⁺ dados transformados em X=X+C.

Por outro lado, a inoculação aumentou a quantidade de N acumulado nas folhas da variedade RB867515, como evidenciado no desdobramento da interação significativa entre tratamentos para essa variedade (Tabela 17 e 18).

Tabela 18. Desdobramento da interação entre inoculação e parte da planta de cana-de-açúcar referente à quantidade de N acumulado (g/vaso) na variedade RB867515.

Tratamento	RB867515					
	Raiz	Colmo inf	Colmo med	Colmo sup	Folha	Palha
Não inoculado	1,6 aD	1,4 aBC	1,0 aCD	0,7 aD	2,1 bA	1,6 aB
Inoculado	2,0 aB	1,5 aCD	1,1 aD	0,6 aE	2,7 aA	1,8 aBC

Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ das plantas de referêncianão apresentaram diferença quando cultivadas em casa de vegetação quanto no campo (Tabela 19). Assim, pode-se dizer que a determinação da abundância natural de ^{15}N não depende da espécie escolhida como planta de referência, isto é, elas apresentaram comportamento similar em termos de absorção de N no do solo. Martins (2017) também avaliou a abundância natural de ^{15}N do N disponível de um Argissolo, amostrado do mesmo lugar deste estudo, utilizando as mesmas plantas de referência usadas no presente estudo (sorgo, milho e braquiária) para a estimativa de FBN em plantas de cana-de-açúcar. O autor observou que valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ eram iguais 7,86‰, ou seja, muito similar aos valores observados no presente estudo (Tabela 19).

A estimativa da FBN para a cultura da cana-de-açúcar foi realizada usando como controle o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ de 7,8 ‰ obtido de plantas de referência cultivadas em vasos no campo, ou seja, nas mesmas condições experimentais onde cresceu a cana. Verificou-se que os valores foram significativamente maiores (Tabela 19) que os encontrados na planta de cana-de-açúcar (Tabela 20), um pré-requisito para estimativa da FBN usando técnicas isotópicas (BODDEY et al., (2001).

Tabela 19. Valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de plantas controle cultivadas em casa de vegetação (copos) e no campo (vasos) e valores de $\delta^{15}\text{N}$ do N disponível no solo.

Plantas controle	$\delta^{15}\text{N}$ do N disponível	$\delta^{15}\text{N}$ do N disponível	$\delta^{15}\text{N}$ do N total
	do solo em copos	do solo em vasos	
‰			
Braquiária	8,5 a	7,5 a	
Milho	8,1 a	7,8 a	
Sorgo	8,2 a	8,0 a	11,8
Média	8,3	7,8	
CV (%)	4	8	

Médias seguidas de pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade(4 n).

Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ da planta de cana-de-açúcar não foram modificados pela inoculação ambas as variedades (Tabela 20). Entre as partes da planta houve diferenças significativas, com maiores valores de $\delta^{15}\text{N}$ na parte da raiz nas duas variedades (Tabela 20). Maiores valores de $\delta^{15}\text{N}$ na parte da raiz de cana-de-açúcar podem estar relacionados a problemas inevitáveis de contaminação ao contato com o solo, que apresentou valor de $\delta^{15}\text{N}$ de 11,8‰, determinado pela análise de amostras do solo experimental (Tabela 19), o que pode ter proporcionando o enriquecimento de ^{15}N na parte da raiz, resultando nos valores maiores

de ^{15}N (MARTINS, 2017). Valores altos de $\delta^{15}\text{N}$ na parte da raiz também foram relatados por Martins (2017) que avaliou o efeito da inoculação em plantas de cana-de-açúcar em variedades similares a estas abordadas neste trabalho.

Sabe-se que o N é um nutriente muito dinâmico na biosfera, e na planta não foi diferente, os aminoácidos e compostos orgânicos nitrogenados (clorofila, por exemplo) presentes num dado momento num organismo vivo não é estável, é produto de permanente síntese e degradação, e do equilíbrio destes depende o crescimento vegetal. Nesse processo de redistribuição do N pela planta pode estar ocorrendo discriminação dos isótopos ^{15}N do ^{14}N , partindo do princípio que o isótopo ^{14}N é mais leve, é mais abundante do que ^{15}N (LOPES et al., 2016), e assim, dependendo dessa dinâmica, espera-se alta variabilidade de $\delta^{15}\text{N}$ nas diferentes partes da planta. Isto explicaria o fato da palha (folhas secas) apresentarem maiores valores de $\delta^{15}\text{N}$, após translocar a maior parte do N para as outras partes da planta (Tabela 20).

A este respeito, parece que o genótipo vegetal e as condições de crescimento (estresse hídrico, etc) também afetam a dinâmica (transformação, translocação, etc) do N e distribuição de ^{15}N nas diferentes partes da planta. Em trabalho de fracionamento de planta de cana-de-açúcar na variedade SP70-1143 avaliando os valores de $\delta^{15}\text{N}$ nas diferentes frações da planta com oito meses de idade, cultivada em um solo de textura arenosa, de baixa fertilidade, Boddey et al. (2001) verificaram que a variabilidade dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ foi relativamente pequena entre as frações, sendo o maior valor observado nos brotos recém emergidos ($\delta^{15}\text{N}$ 5,0‰) e o menor valor no entrenó do meio da planta ($\delta^{15}\text{N}$ 3,4‰). Se deve destacar que este fenômeno não se observa quando a planta recebe N-fertilizante enriquecido com ^{15}N . Hill (1980) encontrou que, devido à rápida remobilização do N na planta, está tende a uma marcação uniforme de ^{15}N em todas as partes da planta. Pelo mencionado acima, no caso de trabalhar com abundância natural de ^{15}N , diferente de quando se trabalha com amostras enriquecidas com o isótopo, nos estudos de quantificação da FBN será essencial trabalhar com a média ponderada da parte aérea da planta.

Tabela 20. Valores de $\delta^{15}\text{N}$ em duas variedades de cana-de-açúcar, inoculadas e não inoculadas com bactérias diazotróficas, cultivadas em vasos, aos 360 DAT.

Tratamentos	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	
	RB92579	RB867515
Raiz	6,0 a	5,7 a
Colmo inferior	4,4 b	4,6 b
Colmo médio	4,7 b	4,7 b
Colmo superior	3,6 c	4,3 b
Folha	2,4 d	3,1 c
Palha	4,7 b	4,4 b
	Teste F	
Inoculante (I)	1,2 ns	5,2 ns
Parte da planta (PP)	59,4 **	32,1 **
Interação I x PP	8,1**	15,7 **
CV%	10	9

Continua...

Continuação da **Tabela 20.**

Média ponderada – planta inteira		
Não inoculado	3,9 a	4,1 a
Inoculado	4,0 a	4,4 a
CV %	3	5
Média ponderada – parte aérea		
Não inoculado	3,6 a	3,8 a
Inoculado	3,7 a	4,1 a
CV %	5	4

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ns: não significativo * e **significativo pelo teste F, a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

Houve interação significativa entre inoculação e parte da planta de cana-de-açúcar quanto aos valores de $\delta^{15}\text{N}$ em duas variedades, ou seja, a inoculação influenciou significativamente a variação de $\delta^{15}\text{N}$ nas diferentes partes da planta de cana-de-açúcar. A partedo colmo teve efeito da inoculação nos valores de $\delta^{15}\text{N}$, e o contrário ocorreu na parte da palha na variedade RB92579 (Tabela 21). Na variedade RB867515, o efeito da inoculação aumentou os valores de $\delta^{15}\text{N}$ nas diferentes partes da planta, exceto na parte da raiz e palha (Tabela 21). Estes resultados demonstram que a inoculação afetou a dinâmica de N na planta, especialmente a translocação, sendo que em geral no tratamento inoculado todas as partes da planta, exceto folhas senescentes, apresentaram maiores valores de $\delta^{15}\text{N}$, contudo estas diferenças embora significativas fossem pequenas e pouco afetou a média ponderada de $\delta^{15}\text{N}$ da parte aérea e/ou planta inteira (Tabela 20).

Tabela 21. Desdobramento da interação entre inoculação e partes da planta de cana-de-açúcar referente aos valores de $\delta^{15}\text{N}$ em duas variedades aos 360 DAT.

Tratamento	RB92579					
	Raiz	Colmo inf	Colmo méd	Colmo sup	Folha	Palha
Não Inoculado	5,8 aA	3,7 bB	4,4 aB	3,5 aB	2,4 aC	5,5 aA
Inoculado	6,2 aA	5,1 aB	4,5 aBC	3,7 aB	2,4 aE	4,1 bCD
	RB867515					
	Não Inoculado	6,0 aA	4,3 bB	4,3 bB	4,3 bB	2,3 bC
Inoculado	5,4 bA	4,9 aAB	5,3 aAB	4,4 aAC	3,9 aC	3,6 bC

Médias seguidas de mesma letrasminúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os valores médios ponderados de $\delta^{15}\text{N}$ das plantas de cana, que em geral variou ao redor de 4.0, foram significativamente menores do que a média das testemunhas ($\delta^{15}\text{N} = 8\text{‰}$), que estimaram o $\delta^{15}\text{N}$ do N disponível do solo, demonstrando a forte contribuição da FBN derivada das bactérias diazotróficas nativas, na nutrição nitrogenada da cultura. O fato do valor de $\delta^{15}\text{N}$ do N disponível do solo (8‰) ser muito inferior ao do N total do solo ($\delta^{15}\text{N}=11,8\text{‰}$), reforça o mencionado acima, pois se as plantas extraíram do solo N diferente do N disponível, ficariam com maiores valores de $\delta^{15}\text{N}$, e nesse caso a FBN ficaria menor do que o encontrado.

Os valores da estimativa da FBN, usando o valor medio ponderado da planta inteira de cana, foram em média de 46 a 49 % na variedade RB92579 e de 44 a 47 % na variedade RB867515, para os tratamentos inoculados e não inoculados, que não mostrou diferença

(Tabela 22). Quando se estima a FBN pela média ponderada da parte aérea da planta, observa-se um mínimo acréscimo na estimativa da FBN, chegando a 51% na variedade RB92579 e a 47,5% na variedade RB867515, sem impacto da inoculação.

Tabela 22. Estimativa de FBN na cultura de cana-de-açúcar em duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas e não inoculada com bactérias diazotróficas.

Tratamentos	FBN (%)	
	RB92579	RB867515
Média ponderada – planta inteira		
Não inoculado	49 a	47 a
Inoculado	46 a	44 a
CV%	3	6
Média ponderada – parte aérea		
Não inoculado	53 a	47 a
Inoculado	51 a	43 a
CV%	5	7

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os resultados de FBN obtidos neste trabalho confirmam resultados encontrados por diversos pesquisadores trabalhando nesta cultura, destacando-se que este processo varia, entre outros, em função do tipo de solo e da variedade utilizada. Reportado por Lima et al. (1987), Boddey et al. (1991) e Urquiaga et al. (1992) a contribuição da FBN em cultivares de cana-de-açúcar pode suprir em até 60% do N total requerido pela cultura. Portanto, trabalhos anteriores mostram que a contribuição da biota nativa de bactérias variedades na cultura de cana-de-açúcar é aproximadamente de 40 a 64 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N, através do processo de FBN (URQUIAGA et al., 2012).

Trabalho realizado com onze experimentos utilizando a técnica de abundância natural de ¹⁵N, nove deles apresentaram valores de N proveniente da FBN variando de 25 a 60% (BODDEY et al., 2001). Outras pesquisas também utilizando a técnica de ¹⁵N no Brasil, Filipinas e Japão mostraram que a contribuição da FBN nas plantas de cana variou de 0 a 72%, com média de 30% (YONEYAMA et al., 1997) e de 0 a 60% no Brasil, média de 32% (POLIDORO et al., 2001).

Estimativas de FBN com médias 30% do N acumulado foram verificadas nas variedades SP701143 e SP813250 quando se utilizou a mesma mistura bacteriana em material micropropagado utilizado neste trabalho e determinou a contribuição usando plantas espontâneas presentes nos canaviais (OLIVEIRA et al., 2006). Lembrando que estas maiores contribuições diferiram quanto ao solo utilizado no crescimento e entre as variedades testadas.

Avaliando a FBN em sete variedades comerciais de cana-de-açúcar e duas variedades selvagens em um solo com baixa fertilidade, baixos teores de N disponível (0,07% N total), sem fertilização nitrogenada e empregando plantas referências (milho e sorgo), determinou-se que a contribuição da FBN nas variedades variou de 24 a 43% sem aplicação de inoculante (XAVIER, 2006).

Evidências da ocorrência de FBN em plantas de cana-de-açúcar foram relatadas na Índia por Muthukumarasamy et al. (2005); Gosal et al. (2012) e no México por Muñoz-Rojas e Caballero-Mellado, (2003). Um dos primeiros estudos realizado na região norte do Uruguai por Taulé et al. (2012) utilizando a técnica de diluição isotópica de ¹⁵N em três variedades de cana-de-açúcar em condições controladas e em vasos com solos esterilizados apresentou contribuição de FBN variando de 35 a 59 %.

4.6 CONCLUSÕES

Em condições de vasos a FBN na cultura de cana-de-açúcar contribuiu, em média, com 47% do N acumulado nas variedades RB92579 e RB867515, independente da inoculação com bactérias diazotróficas.

Há variação significativa nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ nas diferentes partes da planta de cana-de-açúcar, indicando que a estratégia amostral para quantificação de FBN pela técnica da abundância natural de ^{15}N deve considerar a média ponderada da parte aérea e/ou a planta inteira.

Não se verifica variação significativa de abundância de natural de ^{15}N do N disponível do solo estimado por diferentes plantas de referência (braquiária, milho e sorgo).

5. CONCLUSÕES GERAIS

O uso de inoculante na cultura da cana-de-açúcar é uma alternativa potencial para a redução no uso de fertilizantes nitrogenados, o que tem incentivado as pesquisas na cultura da cana-de-açúcar, visando obter vantagens econômicas e ambientais.

O sistema de produção de mudas pré-brotadas para cana-de-açúcar está revolucionando o plantio, devido à redução da quantidade de unidades propagativas (colmo) em comparação ao sistema convencional. Pois permite o controle sanitário, boa sanidade, uniformidade das mudas e uso de inoculante bacterianos, aumentando assim a qualidade das mudas.

Trabalhamos com ideia de que a resposta agrônômica da cana-de-açúcar à inoculação de mudas pré-brotadas com bactérias diazotróficas é influenciada pela fertilização nitrogenada, podendo a inoculação além de promover a FBN, aumentar a eficiência da adubação nitrogenada. Avaliar as plantas de referência e a estratégia de amostragem de diferentes partes das plantas de cana-de-açúcar para quantificação da FBN pela técnica de abundância natural de ^{15}N em duas variedades inoculadas ou não com bactérias diazotróficas também foi proposta deste trabalho.

Pelos resultados obtidos pode-se observar que em condições de vasos a FBN contribuiu, em média, com 47% do N acumulado nas variedades, independente da inoculação com bactérias diazotróficas, demonstrando que a FBN é uma importante fonte de N para a cultura da cana-de-açúcar. A respeito da eficiência da adubação nitrogenada em cana-de-açúcar nas duas variedades ficaram ao redor 60 % e não foi influenciada pela inoculação com bactérias diazotróficas. Contudo, resultados indicam que em estudos de recuperação de ^{15}N -fertilizante pela planta de cana-de-açúcar, faz-se necessária amostragem apenas nas partes mais representativa, na qual indica estado nutricional do nitrogenado da cultura, o que irá contribuindo na redução de tempo de amostragem e no custo das análises de ^{15}N .

Considerando a diversidade edafoclimática do Brasil, grande avanço tem sido observado nos últimos anos acerca da FBN. Estudos com outras variedades e em diferentes condições de solo e clima devem servir de cenários com maior possibilidade de benefício da inoculação com bactérias diazotróficas na cultura da cana-de-açúcar.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, D. E.; KINGSTON, G.; RENNENBERG, H.; DALAL, R. C.; SCHMIDT, S. Effect of nitrogen fertilizer management and waterlogging on nitrous oxide emission from subtropical sugarcane soils. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 136, p. 209-217, 2012.
- ABREU, G. M.; OLIVEIRA, N. S.; SOARES, N. Z.; GUIRARDI, B. D.; SCHIAVO, J. A. Absorção de nitrogênio e fósforo, eficiência e dependência micorrízica em plantas de cana-de-açúcar inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares sob diferentes doses de composto orgânico. In: XLIV Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola. 2015. São Pedro. **Anais...** São Pedro: CONBEA, 2015.
- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King Saud University-Science**, v.26, p. 1-20, 2014.
- AINSWORTH, T.D.; THURBER, R. V.; GATES, R. D. The future of coral reefs: a microbial perspective. **Trends in Ecol. Evol.** 25, 233-240. 2010.
- ALCANTARA, R. M. C. M.; SOUSA, S. R.; XAVIER, G. R.; MOURA, M.R.; RUMJANEK, N. G. **Mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares relacionados com a eficiência de uso de nitrogênio em leguminosas e gramíneas.** Embrapa Meio-Norte, 39 p. 2009.
- ALVES, B.J.R.; SANTOS, J.C.F.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. **Análise de Carbono nos Estudos da Matéria Orgânica do Solo.** In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. (Org) Manual de Métodos Empregados em estudos de Solo e Planta. 1ed. Brasília: Embrapa-SPI, v. 1, p. 511-525. 1994.
- ALVES, B.J.R.; SANTOS, J.C.F.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. **Métodos de Determinação do Nitrogênio em Solo e Planta.** In: Araújo, R. S.; Hungria, M. (Org.). Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola. 1ed. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994b, v. 1, p. 449-469, 1994.
- ANTONIO, C. S.; ROUWS, L. F. M.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. Diazotrophic bacteria associated to sugarcane varieties cropped at Northeast Region of Brazil. **Agrária - Revista Brasileira de Ciências Agrária**, v.11, n.4, p.272-280, 2016.
- ANDA - ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS. **Anuário Estatístico do Setor de Fertilizantes**, São Paulo, ANDA, 1987-2012. 178. p. 2011.
- ARMANHI, J. S. L.; SOUZA, R.S.C.; ARAÚJO, L. M.; OKURA, K.V.; MIECZKOWSKI, P.; IMPERIAL, J.; ARRUMA, P. Multiplex amplicon sequencing for microbe identification in community-based culture collections. **Scientific Reports** 6:29543, 2016.
- ARNOLD, S.L.; SCHEPERS, J.S. A simple roller-mill grinding procedure for plant and 495 soil samples. **Communication Soil Science Plant Analysis**, v.35, p. 537-545, 2004.

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

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

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

BADRI, D.V., ZOLLA, G., BAKKER, M.G., MANTER, D.K., and Vivanco, J .M. Potential impact of soil microbiomes on the leaf metabolome and on herbivore feeding behavior. **New Phytol.** V.198, n.1, p.264–273, 2013.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J.I. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 77, n.3, 549-579, 2005.

BALDANI, J. I.; TEIXEIRA, K. R. S.; SCHWAB, S.; OLIVARES, F. L.; HEMERLY, A. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; NOGUEIRA E. M.; ARAÚJO, J. L. S.; BALDOTTO, L. E. B.; SOARES, L. H. B.; VINAGRE, F.; BALDANI, V. L. D.; CARVALHO, T. L. G.; ALVES, B. J. R.; JAMES, E. K.; JANTALIA, C. P.; FERREIRA, P. C. G.; VIDAL, M. S.; BODDEY, R. M. **Fixação Biológica de Nitrogênio em Plantas da Família da Poaceae (antiga gramínea)**. In: RIBEIRO M. R. ARAÚJO, NASCIMENTO, C. W.; RIBEIRO FILHO, M. R.; CANTALICE, J. R. B. (Ed.). *Tópicos em Ciência do Solo*. 1 ed. Viçosa-MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p. 203-271, 2009.

BAPTISTA, R. B; MORAES, R. F; LEITE, J. M.; SCHULTZ, N.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Variations in the ¹⁵N natural abundance of plant-available N with soil depth: their influence on estimates of contributions of biological N₂ fixation to sugar cane. **Applied soil Ecology**, v. 73, p. 124-129, 2014.

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

BENEDUZI, A.; MOREIRAB, F.; COSTA, P. B.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; AVRETO, R.; BALDANI, J. I.; PASSAGLIA, L. M. P. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**. v. 63, n. 3, p. 94-104, 2013.

BELL,M.J.; BIGGS, J.; MCKELLAR, L.B.; CONNELLAN, J.; DI BELLA, L.; DWYER, R.; EMPSON, M.; GARSIDE, A.J.; HARVEY, T.; KRAAK, J.; LAKSHMANAN, P.; LAMB,

D.W.; MEIER, E.; MOODY, P.; MUSTER, T.; PALMER, J.; ROBINSON, N.; ROBSON, A.; SALTER, B.; SCHROEDER, B.; SILBURN, M.; SCHMIDT, S.; SKOCAJ, D.M.; STACEY, S.; STANLEY, J.; THORBURN, P.; VERBURG, K.; WALKER, C.; WANG, W.; WOOD, A. **A review of nitrogen use efficiency in sugarcane**. Austrália: Sugar Research Australia limited, 2015, 343p.

BHATTACHARJEE, R.B; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S.N. Use of nitrogen fixing bacteria as biofertilizer for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 2, p.199-209, 2008.

BHATTACHARYYA, P.N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n.4, p.1327–1350, 2012.

BODDEY, R. M. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. CRC. **Crit Rev Plant Sci**, v.6, p.209–266, 1987.

BODDEY, R.M; URQUIAGA, S.; REIS, V.; DÖBEREINER, J. Biological Nitrogen Fixation Associated with sugar cane. **Plant and Soil**, v. 137, n. 1, p. 111–117, 1991.

BODDEY, R.M; URQUIAGA, S.; OLIVEIRA, O.C.; ALVES, B.J.R; URQUIAGA, S. Field application of the ¹⁵N isotope dilution technique for the reliable quantification of plant-associated biological nitrogen fixation. **Fert. Res.**, 42: 77-87, 1995.

BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE A.S.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to grasses and cereals. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, n.9, 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.

BURBANO, S.S.; LIU, Y., ROSNEY, K. L.; REIS, V.M.; CABALLERO-MELLADO, J.; REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Predominant de Niftrascriptphylotypes related to Rhizobium Rosettiformans in fird-grown sugarcane planats and in Norway spruce. **Eviroment. Microbiol. Reports** v. 3.p. 383-389, 2011.

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

CANTARELLA, H.; ROSSETTO, R. **Fertilizantes para cana-de-açúcar**. In: CORTEZ, Luis Augusto Barbosa (Coord.). Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Blucher, 2010.

CHAPOLA, R.G.; CRUZ, J.A.; NUNES, I.K.; FERNANDES JÚNIOR, A.R. **Censo varietal 2012**. Araras: Rede Inter universitária para o Desenvolvimento do Setor Suco energético, Universidade Federal de Goiás, 55p. 2013.

CHAPARRO, J.M., BADRI, D.V., BAKKER, M.G., SUGIYAMA, A., MANTER, D.K., AND VIVANCO, J.M. Root exudation of phytochemicals in Arabidopsis follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. **PloS ONE**, 8(2): 2013.

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

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB, 2018). **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. V. 4 – Safra 2018/19 N. 4 – Quarto levantamento novembro/2018. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em novembro: 2018.

CHIEN, S.H.; PROCHNOW, L. I.; CANTARELLA, H. Recent Developments of Fertilizer Production and Use to Improve Nutrient Efficiency and Minimize Environmental Impacts. *Advances in Agronomy*, From: In Sparks, editor: **Advances in Agronomy**, v. 102, p.267-322, 2009.

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

COMPANT, S.; CLÉMENT, S. SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v.42, p.669-678. 2010.

COSTA, D. P.; DIAS, A. C. F.; DURRER, A.; ANDRADE, P. A. M.; GUMIERE, T.; ANDREOTE, F. D. Composição diferencial das comunidades bacterianas na rizosfera de variedades de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciências do solo**, v. 38, n. 6, p. 1694-1702, 2014.

CUMMINGS, S.P. The application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in low input and organic cultivation of graminaceous crops; potential and problems. **Environmental Biotechnology**, v. 5, p. 43-50, 2009.

DE OLIVEIRA, C. **Estimativas de fixação Biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar por $\delta^{15}\text{N}$** . Dissertação (Mestrado), Agricultura Tropical e Subtropical, Área de Concentração em Gestão de Recursos Agroambientais. Instituto Agrônomo. Campinas. 80p. 2012.

DE SANTI FERRARA, F.I.; OLIVEIRA, Z.M.; GONZALES, H.H.S.; FLOH, E.I.S.; BARBOSA, H.R. Endophytic and rhizospheric centerobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. **Plant and Soil**, v. 353, p. 409-417, 2012.

DE MATOS, G.F.; ZILLI, J.E.; DE ARAÚJO, J.L.S.; PARMA, M. M.; MELO, I. S.; RADL, V.; BALDANI, J. I.; ROUWS, L. F. M. *Bradyrhizobium sacchari* sp. nov., a legume nodulating bacterium isolated from sugarcane roots. **Archivos Microbiol.** V. 10, p.1-8, 2017.

DINI-ANDREOTE, F.; ANDREOTE, F.D.; COSTA, R.; TAKETANI, R.G.; VAN ELSAS, J.D.; ARAUJO, W.L. Bacterial soil community in a Brazilian sugarcane field. **Plant and Soil**, v. 336, n. 1/2, p. 337-349, 2010.

DÖBEREINER, J.; ALVAHYDO, R. Sobre a influência da cana-de-açúcar na ocorrência de "*Beijerinckia*" no solo. II. Influência das diversas partes do vegetal. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 401-412, 1959.

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

DOBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, v. 13, p. 1-13, 1993.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p. 771-774. 1998.

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

DOBERMANN, A. **Nutrient use efficiency - measurement and management**. Proc. of International Fertilizer Industry Association (IFA) Workshop on Fertilizer Best Management Practices. Brussels, Belgium. March 7-9, 22 p. 2007.

EMBRAPA, **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2 ed. 627 p. 2009.

EMBRAPA, NOTÍCIAS AGRÍCOLAS – Embrapa e Basf conseguem unir o biológico (bactérias) com o químico (inseticida/fungicida), São Paulo-SP. Disponível em: <https://www.noticiasagricolas.com.br/videos/sucroenergetico/225986-embrapa-e-basf-conseguem-unir-o-biologico-bacterias-com-o-quimico-inseticidafungicida.html#.XGskZOhKjIV>. Acesso em: novembro de 2018.

EPE – EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Plano Decenal de Expansão de Energia 2023**. Empresa de Pesquisa Energética, Rio de Janeiro, Brasil. Disponível em: <http://www.epe.gov.br/Estudos/Documents/PDE2023.pdf>. Acesso em: abril de 2018.

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

FAGERIA, N.K; BALIGAR, V.C. Enhancing Nitrogen use efficiency in crop plants. **Advances in Agronomy**. v. 88, p.267-322, 2005.

FISCHER, D.; PFITZNER, B.; SCHMID, M., SIMÕES-ARAÚJO, J., REIS, V.M., PEREIRA, W.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; HAI, B.; HOFMANN, A.; SCHLOTTER, M., ROMERO-MARTINEZ, E.; BALDANI, J.I.; HARTMANN, A. Molecular characterization of

the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). **Plant and Soil**, V. 356, p.83-99. 2011.

FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, A.H.; STANFORD, N. P.; SANTO, C.E.R.S **Microorganismo e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura**. ISBN: 978-85-98934-05-1.2018.

FORTES, C.; TRIVELIN, P.C.O.; VITTI, A.C.; OTTO, R.; FRANCO, H.C.J.; FARONI, C.E. Stalk and sucrose yield in response to nitrogen fertilization of sugarcane under reduced tillage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.88-96, 2013.

FRANCO, H.C.J.; BOLOGNA, I.R.; FARONI, C.E.; VITTI, A.C.; TRIVELIN, P.C.O. Acúmulo de macronutrientes em cana-de-açúcar em função da adubação nitrogenada e dos resíduos culturais incorporados ao solo no plantio. **Bragantia**, v.66, n.4. p. 669-674, 2007.

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

FREIRE, L; L. R.; BALIEIRO, F. de C.; ZONTA, E.; ANJOS, L. H. C. dos; PEREIRA, M. G.; LIMA, E.; GUERRA, J. G. M.; FERREIRA, M. B. C.; LEAL, M. A. de A.; CAMPOS, D. V. B. de; POLIDORO, J. C.; BALIEIRO, F. de C.; ZONTA, E.; ANJOS, L. H. C. dos; PEREIRA, M. G.; LIMA, E.; GUERRA, J. G. M.; FERREIRA, M. B. C.; LEAL, M. A. de A.; CAMPOS, D. V. B. de; POLIDORO, J. C. **Manual de calagem e adubação do Estado do Rio de Janeiro**. Brasília, DF: Embrapa; Seropédica, RJ: Editora Universidade Rural. 430 p. 2013.

FUENTES-RAMÍREZ, L.E.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I.R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacterdiazotrophicus*, anindoleaceticacidproducingbacteriumisolatedfromsugarcane cultivarsofMexico." **Plant and Soil**, v.154, p.145-150, 1993.

GARCIA, J. C.; VITORINO, R.; AZANIA, C. A. M.; SILVA, D. M. BELUCI, L. R. Inoculação de bactérias diazotróficas no desenvolvimento inicial de cana-de-açúcar, variedade RB867515. **Nucleus**, v.10, n.1, p. 99-107, 2013.

GÍRIO, L. A.; DIAS, F. L. F.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; SCHULTZ, N.; BOLONHEZI, D.; MUTTON, M. A. Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.50, p.33-43, 2015.

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

GOMES, A. A.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R. Relação entre distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 40, n. 11, p. 1105-1113, 2005.

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

HILL, J. 1980. The remobilization of nutrients from leaves. **Journal of plant nutrition**, New York, 2 (4): 407-444.1980.

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

HUANG, X.; CHAPARRO, J.M.; REARDON, K.F.; ZHANG, R.; SHEN, Q.; VIVANCO, J.M. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. **Botany**, v. 92, n. 4, p. 267-275, 2014.

IAEA - International Atomic Energy Agency (2001). **Use of Isotope and Radiation Methods in Soil and Water Management and Crop Nutrition**. Training Course Series N° 14. IAEA, Vienna.

IFA, 2013. **Assessment of Fertilizer Use by Crop at the Global Level 2010-2010/11** - International Fertilizer Industry Association (IFA), Paris, France, 10p.

IFA, 2013. **Fertilizer Outlook 2013-2017** - International Fertilizer Industry Association (IFA), Paris, France, 8p.

INUI, R. N. **Isolamento e Identificação e bactérias solubilizadoras de fósforo e produtoras de auxina em solos com cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em genética e melhoramento de plantas Genética do Melhoramento de Plantas. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal – SP, f. 90, jun. 2009

ISA, D.W.; HOFMAN, G.; VAN CLEEMPUT, O. Uptake and balance of fertilizer nitrogen applied to sugarcane. **Field Crops Research**, v.95, p.348–354, 2006.

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

JOHNSTON-MONJE, D.; RAIZADA, M.N. Plant and Endophyte Relationships: Nutrient Management. **Comprehensive Biotechnology** (Second Edition). Canada, v.4, p. 713-727. 2011.

JORIS, H.A.W. **Nitrogênio na produção de cana-de-açúcar: aspectos agronômicos e ambientais**. 134 p. 2015. Tese (Doutorado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas. 2015.

KOLLN, O. T. **Eficiência de usos de nitrogênio pela cana-de-açúcar: diferenças genotípicas, preferência por amônio e emissão de N₂O**. Tese (Doutorado-programa de pós-graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia nuclear na agricultura e no meio ambiente). CENA-Universidade de São Paulo. 120 f. 2016.

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

LIMA, E.; BODDEY, R.M.; DOBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ^{15}N aided nitrogen balance. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, n.2, p. 165-170, 1987.

LIMA, D.R.M. **Bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco**. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento Agronomia, Recife, 110, f. 2012.

LIMA, D.R.M.; SANTOS, I.B.; OLIVEIRA, J.T.C.; BARBOSA, J.G. DINIZ, W.P.S.; FARIAS, A.

R.F.; FREIRE, F.J. e SOBRAL, J.K. Tolerance of potentially diazotrophic bacteria to adverse environmental conditions and plant growth-promotion in sugarcane, **Archives of Agronomy and Soil Science**, 64:11,1534-1548. 2018.

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

LIRA-CADETE, L.; FARIAS, A. R. B.; RAMOS, A. P. S.; COSTA, D. P., FREIRE, F. J.; KUKLINSKY SOBRAL, J. Variabilidade genética de bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar capazes de solubilizar fosfato inorgânico. **Bioscience Journal**, v. 28, n.1, p. 122-129, 2012.

LOPES, E. C.P; MORAES, A; LANG, R. Estudo do fracionamento isotópico de nitrogênio aplicado à gramíneas e leguminosas forrageiras *Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science*, Guarapuava-PR, v.9, n.1 p.121-130, 2016. **Applied Research & Agrotechnology**. v.9. n.1 jan/apr. 2016.

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

MARTINS, D.E. **Inoculação de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar: influência na produtividade, acúmulo de nutrientes e distribuição isotópica de ^{15}N na planta**. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 51f. 2017.

MATOSO, E.S., MARCO, E; BELLE, C.; RODRIGUES, A.; SILVA, S.D.A. Desenvolvimento inicial de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas **Revista da jornada de pós-graduação e pesquisa**. ISSN: 1982-2960. 2016.

MARIOTTI, A. Atmospheric nitrogen is a reliable standart for ^{15}N natural abundance measurements. **Nature**, v.303, p.685-687, 1983.

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

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F, DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. **Annals of Botany**, v.105. P.1-17, 2010.

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

MENDES, R.; KRUIJT, M.;DE BRUIJN, I.; DEKKERS E. VAN, der V.; M, SCHNEIDER, J.H.; PICENO Y. M.; DESANTIS T. Z.; ANDERSEN, G.L.; BAKKER, P.A.; RAAIJMAKERS, J. M.Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, New York, v. 332, n. 6033, p. 1097-1100, 2011.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMARKERS, J.M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and humam pathogenic microorganisms. **Federation of European Microbiological Societies**, Oxford, v. 37, p. 634-663, 2013

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

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.

MOLL, R.H.; KAMPRATH, E.J.; JACKSON, W.A. Analysis and interpretation of factor which contribute to efficiency of nitrogen utilization. **Agronomy Journal**. v.74, p. 562-564, 1982.

MURUMKAR, D. R, NALAWADE, S.V.; INDI, D.V.; PAWARET, S. M. Response of Sugarcane Seed Plot to Microbial Inoculation by *Gluconacetobacterdiazotrophicus* and Phosphate-Solubilizing Bactéria. **Sugar Tech**, v.19, p.26, 2017.

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

MUTHUKUMARASAMY, R.; GOVINDARAJAN, M.; VADIVELU, M.; REVATHI, G. N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. in micropropagated sugarcane plants. **Microbiological Research**, v.161, p. 238-245, 2005.

JORIS, H.A.W. **Nitrogênio na produção de cana-de-açúcar: aspectos agronômicos e ambientais**. Tese (Doutorado em Agricultura Tropical e Subtropical). – Instituto Agronômico de Campinas, 2015, 135p.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G. **A Dimensão do Setor Sucoenergético - Mapeamento e Quantificação da Safra 2013/14**. Ribeirão Preto: Markestrat, Fundace, 2014, 45 p.

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. Manual de laboratório: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos. São Carlos-SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 313p. 2005.

OITA, A.; MALIK, A.; KANEMOTO, K.; GESCHKE, A.; NISHIJIMA, S.; LENZEN, M. Substantial nitrogen pollution embedded in international trade. **Nature Geoscience**, v. 9, p. 111-115, 2016.

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

OLIVARES, F.L. Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. Híbrido) por bactérias endofíticas do gênero *Herbaspirillum*. 1997. Tese (Doutorado) - UFRRJ, Seropédica, R.J.

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

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

OLIVEIRA, A.L.M.; CANUTO, E.L.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v.284, p.230-32, 2006.

OLIVEIRA, A.L.M.; STOFFEL, 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, p. 106-113, 2009.

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

OLIVEIRA, R. P. **Análise de crescimento de cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas e com adubação nitrogenada**. 2013. 46f. Dissertação (Mestrado

em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

OLIVEIRA, A.R.; SIMÕES, W.L. Cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas em condições irrigadas no semiárido brasileiro. **Revista Energia na Agricultura**. Botucatu. v. 31 n. 2, p. 154-161. 2016.

OLIVEIRA; R. I.; DE MEDEIROS; M. R. F. A.; FREIRE, C. S.; FREIRE, F. J.; SIMÕES NETO, D. E.; DE OLIVEIRA, E. C. A. Nutrient partitioning and nutritional requirement in sugarcane. **Australian Journal of Crop Science**. v. 10, n. 1, p. 69-75, 2016.

ORLANDO-FILHO J.; HAAG H.P.; ZAMBELLO Jr. E. **Crescimento e absorção de macronutrientes pela cana-de-açúcar, variedade CB 41-76 em função de idade em solos do Estado de São Paulo**. Boletim Técnico; Planalsucar, Piracicaba, v.2, n.1, p.1-128, 1980.

OREN, A, GARRITY, G.M. List of new names and new combinations previously effective, but not validly published. **Int Syst Evol Microbiol** 65:2017-2025. 2015.

OTTO, R.; CASTRO, S. A. Q.; MARIANO, E.; CASTRO, S. G. Q.; FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. O. Nitrogen Use Efficiency for Sugarcane-Biofuel Production: What Is Next? **Bioenergy Research**, v.9, p.1272-1289, 2016.

PEDULA, R.O.; SCHULTZ, N.; MONTEIRO, R.C.; PEREIRA, W.; ARAÚJO, A.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. Growth analysis of sugarcane inoculated with diazotrophic bacteria and nitrogen fertilization. **African Journal of Agricultural Research**, v.11, p.2786-2795, 2016.

PEREIRA, W. **Produtividade e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas**. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 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 Agrônômica**, v. 44, n. 2, p. 363-370, 2013.

PEREIRA, W.; SOUSA, J.S.; SCHULTZ, N.; REIS, V.M. Sugarcane Productivity as a Function of Nitrogen Fertilization and Inoculation with Diazotrophic Plant Growth-Promoting Bacteria. **Sugar Tech**, v. 1, p. 1, 2018.

PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J.M.; LEMANCEAU, P.; VAN DER PUTTEN, W.H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 11, n. 11, p. 789-799, 2013.

PISA, G.; MAGNANI, G.S.; WEBER, H.; SOUZA, E.M.; FAORO, H.; MONTEIRO, R.A.; DAROS, E.; BAURA, V.; BESPALHOK, J.P.; PEDROSA, F.O.; CRUZ, L.M. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 44, n. 12, p. 1215-1221. 2011.

PRASERTSAK, P.; FRENEY, J.R.; DENMEAD, O.T.; SAFFIGNA, P.G.; PROVE, B.G.; REGHENZANI, J.R. Effect of fertilizer placement on nitrogen loss from sugarcane in tropical Queensland. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 62, p. 229-239, 2002.

POLIDORO, J.C. **O molibdênio na nutrição nitrogenada e na contribuição da fixação biológica do nitrogênio associada à cultura da cana-de-açúcar**. 2001. 185 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2001.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; DOBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacterdiazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.10, p.101-104, 1994.

REIS, V.M.; DE PAULA, M.A.; DOBEREINER, J. Ocorrência de MicorrizasArbusculares e da Bactéria Diazotrófica *Acetobacterdiazotrophicus* em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p. 1933-1941, 1999.

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

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

REIS, V.M. Uso de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio como Inoculante para aplicação em gramíneas. Embrapa Agrobiologia: **Documentos 232**, jun. 2007.

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

RESENDE, A. S.; XAVIER, R. P.; OLIVEIRA, O. C. DE; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Long-term effects of pre-harvest burning and nitrogen and vinasse applications on yield of sugar cane and soil carbon and nitrogen stocks on a plantation in Pernambuco. **Plant and Soil**, v.281, p.337-349, 2006.

RIDESA – Rede Interstitucional de Desenvolvimento do Setor Sucroenergético. **Censo Varietal Brasil 2014**. Disponível em: <<http://pmgca.dbv.cca.ufscar.br/variedades>>. Acesso em: abril de 2016.

RIVERA, R.; VELAZCO, A.; TRETO, E. La fertilización (^{15}N), nutrición nitrogenada y actividad de los microorganismos nitrofixadores en la caña de azúcar, cepa de caña planta, cultivada sobre suelo ferralítico rojo. **Cultivos Tropicales**, v. 12, p. 21-28. 1991.

ROUWS, L. F. M., LEITE, J., DE MATOS, G. F., ZILLI, J. E., COELHO, M. R. R., XAVIER, G. R., FISCHER, D., HARTMANN, A., REIS, V. M. and BALDANI, J. I. Endophytic *Bradyrhizobium* spp. isolates from sugarcane obtained through different culture strategies. **Environmental Microbiology Reports**. 2014.

ROBERTSON, G.P.; VITOUSEK, P.M. Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 34, p. 97-125, 2009.

SANTOS, I. B.; LIMA, D. R. M.; BARBOSA, J. G.; OLIVEIRA, J. T. C; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**. v. 28, n. 1, p. 142-149, 2012.

SANTOS, H.G. dos; JACOMINE, P.K.T.; ANJOS, L.H.C. dos; OLIVEIRA, V.A. de; OLIVEIRA, J.B. de; LUMBRERAS, J.F.; COELHO, M.R.; ALMEIDA, J.A.; CUNHA, T.J.F.; OLIVEIRA, J.B. (Eds). **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3.ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 353p.

SANTOS, S.G.;RIBEIRO, F.S.;FONSECA, C.S.; PEREIRA, W.;SANTOS, L.A.;REIS, V.M. Developmentandnitratereductaseactivityofsugarcaneinoculatedwithfivediazotrophicstrains. **Arch Microbiol**. 199; 863-873. 2017.

SANTOS, S.G.; CHAVES, V.A; DA SILVA, F.; ALVES, G.C.; REIS, V.M. Rooting and growth of pre-germinated sugarcane seedlings inoculated with diazotrophic bacteria. **AppliedSoilEcology**. v. 133, p. 12-23, 2018.

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

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **Afr. J. Agric. Res**, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.

SILVA, M. A. **Bactérias diazotróficas e adubação molíbdica na contribuição da fixação biológica de N₂ em cana planta**. 107 f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento Agronomia, Recife, 90fl. 2016.

SCHULTZ, N.; LIMA, E.; PEREIRA, M. G; ZONTA, 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, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

SCHULTZ, N.; MORAIS, R.F. de; SILVA, J.A. da; BAPTISTA, R.B.; OLIVEIRA, R.P.; LEITE, J.M.; PEREIRA, W.; CARNEIRO JÚNIOR, J. de B.; ALVES, B.J.R.; BALDANI, J.I.; BODDEY, R.M.; 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, p. 261-268. 2012.

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

SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SILVA, P.A.; BALDANI, J.I.; BODDEY, R.M.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. Yield of sugarcane varieties and their sugar quality grown in different soil types and inoculated with a diazotrophic bacteria consortium, **Plant Production Science**, 20:4, 366-374. 2017.

SHEARER, G.; KOHL, D.H. N₂ fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. **Aust. J. Plant Physiol.**, 13, 699-756, 1986.

SNYDER, C.S. BRUULSEMA; T.W.; T.L. JENSEN C, P.E. FIXEN. Review of greenhouse gas emissions from crop production systems and fertilizer management effects. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v.133, p. 247-266, 2009.

SOUZA, R.S.C.; OKURA, V.O.; ARMANHI, J.S.L.; JORRÍN, B. NÚRIA LOZANO, N.; SILVA, J.M.; GUERRERO, M.G.; ARAÚJO, L.M, VERZA, N.F.; BAGHERI, H.; IMPERIAL, J.; ARRUDA, J. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Scientific Reports**. 6, 28774. 2016.

SUNDARA, B.; NATARAJAN, V.; HARI, K. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. **Field Crops Research**, v. 77, p. 43-49, 2002.

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

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

TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V. M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 35-49, 2012.

THAWEENUT, N.; HACHISUMA, Y.; ANDO, S.; YANAGISAWA, S.; YONEYAMA, T. Tho seasons study of nif gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (*Saccharum* spp.hibrids): expression of nifH genes similar to those of *Rhizobium*. **Plant Soil**. v.338, p.435-449, 2011.

THORBURN, P. J.; BIGGS, J. S.; WEBSTER, S. J.; BIGGS, I. M. An improved way to determine nitrogen fertiliser requirements of sugarcane crops to meet global environmental challenges. **PlantandSoil**, Dordrecht, v. 339, p. 51-67, 2011.

THOMPSON, J.R.; RIVERA, H.; CLOSEK, C.J.; MEDINA, M. Micróbios no coral holobiont: parceiros através da evolução, desenvolvimento e interações ecológicas. **Frente. Célula. Infectar. Microbiol.** 4: 176. 2014.

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

TRISTÃO, L. E.; FIGUEIREDO, P. A. M.; ZIED, D. C; LISBOA, L. M. A.; ALVES, V. G. C. Parâmetros agronômicos iniciais de cana-de-açúcar inoculadas com fungos micorrizicosarbusculares. In: *Initial agronomic parameters of sugarcane inoculated with mycorrhizal m ycorrhizal fungi*. 1º Encontro Internacional de Ciências Agrárias e Tecnológicas. Crise: tecnologias para a superação de desafios no setor agrário. Resumo expandido. 2016.

TRIVELIN, P.C.O.; LARA, C.W.; VICTORIA, R.L.; REICHARDT, K. Evaluation of a ¹⁵N plot design for estimating plant recovery of fertilizer nitrogen applied to sugar cane. *Scientia Agricola*, v.51, p. 226-234, 1994.

UNICA (2018). União das Indústrias de Cana de Açúcar. UNICADATA. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br>>. Acesso em: 08 nov. 2018.

UNKOVICH, M.; HERRIDGE, D.; PEOPLES, M.; CADISCH, G.; BODDEY, R.; GILLER, K.; ALVES, B. AND CHALK, P. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. *ACIAR Monograph* N°136, 258p, 2008.

URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J. Fijación biológica de nitrógeno asociada com gramíneas forrajeras, cereales y caña de azúcar. In: OLIVARES, J.; BAREA, J. M., (Ed.). **Fixación y mobilización biológica de nutrientes**. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, v. 2. p. 71-89. 1991.

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

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

XAVIER, R. P. **Contribuição da Fixação Biológica de Nitrogênio na Produção Sustentável da Cultura de Cana de açúcar**. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, 2006.

XU, G.; FAN, X.; MILLER, A.J. Plant Nitrogen Assimilation and use efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, v.63, p.1-30, 2012.

YONEYAMA, T.; MURAOKA, T. KIM, T.H.; DACANAY, E.V. e NAKANISHI, Y. The natural ¹⁵N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 189, p.239-244, 1997.

WHAN, A.; ROBINSON, N.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S.; AITKEN, K. A quantitative genetics approach to nitrogen use efficiency in sugarcane. *Functional Plant Biology*, Collingwood v. 37, p. 448-454, 2010.

7. ANEXOS

Tabela 23. Efeito da inoculação e da fertilização nitrogenada nos teores de N na planta de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) na variedade RB92579, em quatro épocas de colheita.

Tratamentos	90 DAT	180 DAT	270 DAT	360 DAT
	Teor de N na raiz (%)			
Não inoculado	0,75 a	0,31 a	0,33 b	0,31 a
Inoculado	0,60 b	0,29 a	0,33 a	0,33 a
Não fertilizado	0,63 b	0,30 a	0,32 a	0,32 a
Fertilizado	0,72 a	0,31 a	0,35 a	0,32 a
Teste F				
Inoculante (I)	217,8**	4,9 ns	0,8 ns	4,3 ns
Fertilizante (F)	81,9 **	2,1 ns	5,2 *	0,1 ns
Interação I × F	12,9 **	0,8 ns	0,0 ns	2,9 ns
CV (%)	3	6	8	4
————— Teor de N no colmo (%) —————				
Não inoculado	0,98 b	0,14 a	0,13 a	0,08
Inoculado	1,06 a	0,14 a	0,11 b	0,08
Não fertilizado	0,99 b	0,14 a	0,12 a	0,09 a
Fertilizado	1,06 a	0,14 a	0,12 a	0,08 b
Teste F				
Inoculante (I)	26,87**	0,76 ns	11,56 **	0,00*
Fertilizante (F)	20,48 **	0,96 ns	1,37 ns	8,21*
Interação I × F	5,69*	26,32 **	0,00 ns	0,03 ns
CV (%)	3	7	6	14
————— Teor de N na folha (%) —————				
Não inoculado	1,00 a	0,61 a	0,13 a	0,48 b
Inoculado	0,97 b	0,55 b	0,11 b	0,56 a
Não fertilizado	1,00 a	0,59 a	0,12 a	0,52 a
Fertilizado	0,98 a	0,57 a	0,12 a	0,52 a
Teste F				
Inoculante (I)	9,5*	39,9 **	11,6 **	14,4 **
Fertilizante (F)	2,4 ns	2,6 ns	1,4 ns	0,1 ns
Interação I × F	11,1**	0,0 ns	0,0 ns	32,1 **
CV (%)	2	3	6	8
————— Teor de N na palha (%) —————				
Não inoculado	0,48 a	0,27 a	0,23 b	0,18 a
Inoculado	0,47 a	0,26 b	0,27 a	0,16 a
Não fertilizado	0,45 b	0,26 a	0,22 b	0,16 a
Fertilizado	0,51 a	0,27 a	0,28 a	0,19 a
Teste F				
Inoculante (I)	1,9 ns	7,3*	13,3**	2,3 ns
Fertilizante (F)	19,1 *	2,4 ns	36,1**	4,8 ns
Interação I × F	1,2 ns	3,7 ns	1,7 ns	0,4 ns
CV (%)	4	4	8	12

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ns: não significativo * e **significativo pelo teste F, a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

Tabela 24. Desdobramento da interação entre inoculante e fertilizante nitrogenado quanto ao teor de N em diferentes partes da planta de cana-de-açúcar na variedade RB92579.

Tratamento	Não fertilizado		Fertilizado	
	Teor de N na raiz 90 DAT (%)			
Não inoculado	0,73 aB		0,78 aA	
Inoculado	0,54 bB		0,67 bA	
Teor de N no colmo 90 DAT (%)				
Não inoculado	0,93 bB		1,04 aA	
Inoculado	1,05 aA		1,08 aA	
Teor de N no colmo 180 DAT (%)				
Não inoculado	0,15 aB		0,13 bB	
Inoculado	0,12 bB		0,16 aA	
Teor de N na folha 90 DAT (%)				
Não inoculado	1,0 aA		1,01 aA	
Inoculado	1,00 aA		0,95 bB	
Teor de N na folha 360 DAT (%)				
Não inoculado	0,42 bB		0,54 aA	
Inoculado	0,63 aA		0,50 aB	

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Tabela 25. Efeito da inoculação e da fertilização nitrogenada quanto ao teor de N na cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) na variedade RB867515, em quatro épocas de colheita.

Tratamentos	90 DAT	180 DAT	270 DAT	360 DAT
	Teor de N na raiz (%)			
Não inoculado	0,64 a	0,32 a	0,35 a	0,32 b
Inoculado	0,62 a	0,31 a	0,35 a	0,37 a
Não fertilizado	0,63 a	0,32 a	0,32 b	0,35 a
Fertilizado	0,64 a	0,31 a	0,38 a	0,34 a
Teste F				
Inoculante (I)	0,23 ns	0,61 ns	0,39 ns	37,87**
Fertilizante (F)	0,16 ns	1,71 ns	43,61 **	0,11 ns
Interação I x F	0,61 ns	0,68 ns	0,39 ns	11,68**
CV (%)	10	6	4	4
Teor de N no colmo (%)				
Não inoculado	0,77 a	0,20 a	0,14 a	0,98 a
Inoculado	0,83 a	0,18 b	0,12 b	0,98 a
Não fertilizado	0,72 b	0,20 a	0,11 b	0,08 b
Fertilizado	0,88 a	0,18 b	0,15 a	0,11 a
Teste F				
Inoculante (I)	3,2 ns	24,5**	12,1**	0,1 ns
Fertilizante (F)	23,2 **	92,3**	36,5**	79,6 **
Teste F				
Interação I x F	21,1**	29,5 **	5,2*	5,4*
CV (%)	8	2	9	6

Continua...

Continuação da **Tabela 25.**

Teor de N na folha (%)				
Não inoculado	1,23 a	0,55 b	0,61 a	0,59 a
Inoculado	0,99 b	0,58 a	0,54 b	0,57 a
Não fertilizado	1,11 a	0,57 a	0,60 a	0,55 b
Fertilizado	1,11 a	0,56 a	0,56 b	0,61 a
Teste F				
Inoculante (I)	106,1**	17,7**	101,5*	4,2 ns
Fertilizante (F)	0,7 ns	0,0 ns	30,4**	86,3 **
Interação I × F	0,2 ns	20,0**	0,9 ns	5,8 *
CV (%)	1	3	2	2
Teor de N na palha (%)				
Não inoculado	0,35 a	0,25 a	0,26 a	0,17 b
Inoculado	0,35 a	0,24 a	0,24 a	0,18 a
Não fertilizado	0,35 a	0,25 a	0,24 a	0,17 b
Fertilizado	0,35 a	0,25 a	0,27 a	0,18 a
Teste F				
Inoculante (I)	1,1 ns	2,3 ns	2,5 ns	7,1*
Fertilizante (F)	1,1 ns	0,1ns	4,3 ns	7,1*
Interação I × F	4,5 ns	14,7 *	1,2 ns	6,5 ns
CV (%)	1	5	11	5

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ns: não significativo * e **significativo pelo teste F, a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

Tabela 26. Desdobramento da interação entre inoculante e fertilização nitrogenada quanto ao teor de N na raiz, colmo e folha na variedade RB867515.

Tratamento	Não fertilizado		Fertilizado	
	Teor de N na raiz 360 DAT (%)			
Não inoculado	0,34 aA		0,31 bB	
Inoculado	0,36 aA		0,38 aA	
Teor de N no colmo 90 DAT (%)				
Não inoculado	0,76 aA		0,77 bA	
Inoculado	0,67 aA		0,98 aA	
Teor de N no colmo 180 DAT (%)				
Não inoculado	0,20 aA		0,19 aB	
Inoculado	0,21 aA		0,16 bB	
Teor de N no colmo 240 DAT (%)				
Não inoculado	0,11 aB		0,17 aA	
Teor de N no colmo 240 DAT (%)				
Inoculado	0,11 aB		0,13 bA	
Teor de N no colmo 360 DAT (%)				
Não inoculado	0,08 aB		0,11 aA	
Inoculado	0,08 aB		0,10 aA	
Teor de N na folha 180 DAT (%)				
Não inoculado	0,53 bB		0,57 aA	
Inoculado	0,61 aA		0,56 aB	
Teor de N na folha 360 DAT (%)				
Não inoculado	0,56 aB		0,61 aA	
Inoculado	0,53 bB		0,61 aA	

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.