

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar



Dissertação

**Uso de bactérias diazotróficas na produção de mudas de cana-de-açúcar em
diferentes substratos**

Ester Schiavon Matoso

Pelotas, 2017

ESTER SCHIAVON MATOSO

Engenheira Agrônoma

Uso de bactérias diazotróficas na produção de mudas de cana-de-açúcar em diferentes substratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Pesq. Dr. Sergio Delmar dos Anjos e Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Rogerio Mauch

Co-orientadora: Pesq^a. Dr^a. Veronica Massena Reis

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M425u Matoso, Ester Schiavon

Uso de bactérias diazotróficas na produção de mudas de cana-de-açúcar em diferentes substratos / Ester Schiavon Matoso ; Sergio Delmar dos Anjos e Silva, orientador ; Veronica Massena Reis, Carlos Rogério Mauch, coorientadores. — Pelotas, 2017.

115 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Plântulas. 2. Resíduos. 3. Fbn. 4. bactérias promotoras de crescimento. I. Silva, Sergio Delmar dos Anjos e, orient. II. Reis, Veronica Massena, coorient. III. Mauch, Carlos Rogério, coorient. IV. Título.

CDD : 633.61

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842


Ester Schiavon Matoso

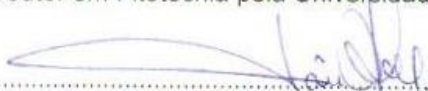
Uso de bactérias diazotróficas na produção de mudas de cana-de-açúcar em diferentes substratos

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 24 de fevereiro de 2017.

Banca examinadora:


.....
Sérgio Delmar dos Anjos e Silva (Orientador)
Doutor em Fitotecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.


.....
Tânia Beatriz Gamboa Araújo Morselli
Doutora em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas.


.....
Sandro José Giacomini
Doutor em Ciência do Solo pela Universidade Federal de Santa Maria.


.....
Jaqueline Tavares Schäfer
Doutora em Fitossanidade pela Universidade Federal de Pelotas.

“Tudo que eu sou, ou espero ser, eu devo ao meu anjo, minha mãe.” (Abraham Lincoln)

Em memória à minha mãe.

Ao meu esposo, companheiro e amigo Nataniel,
por todo o apoio nesta trajetória,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela força e pela luz que me mantém no caminho certo.

Ao Pesquisador Dr. Sergio Delmar dos Anjos e Silva, pela orientação, amizade e confiança depositada em mim. E pelos ensinamentos e incentivos que foram cruciais para a concretização deste trabalho.

À Pesquisadora Dra. Veronica Massena Reis, pela coorientação, envio de materiais e auxílio sempre que necessário.

Ao Professor Dr. Carlos Mauch, pela coorientação e auxílio.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar da UFPel, por todo o conhecimento adquirido.

À Embrapa Clima Temperado, pela oportunidade de realizar o trabalho de pesquisa.

À Embrapa Agrobiologia, pela disponibilidade de materiais.

À Universidade Federal de Pelotas e ao PPG SPAF pela oportunidade de mestrado.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Aos componentes da banca examinadora, Professora Dr^a. Tânia Morselli, Professor Dr. Sandro Giacomini e Dr^a Jaqueline Schafer, por terem aceitado gentilmente o meu convite.

Aos colegas do grupo Agroenergia, por toda ajuda na condução dos experimentos e demais momentos, e também pela amizade e união, pois com certeza juntos somos mais fortes.

À Luize Mascarenhas, por ser a pessoa certa na hora certa, pelo café, pela ajuda, paciência e pelos momentos de descontração na reta final do meu trabalho.

Aos incansáveis funcionários da Embrapa Clima Temperado, Cândida Montero, Vilmar Gonçalves e Seu Zuzu, por toda ajuda e boa vontade.

À Lorena Donini, por todo o conhecimento sobre cultivo *in vitro*.

Aos queridos colegas do Laboratório de Fitopatologia, por cada sorriso durante os trabalhos mais árduos.

A todos do Laboratório de Cultura de Tecidos, funcionários, colegas de pós-graduação e estagiários, por todo auxílio. Em especial à Daniele Masiero, pela ajuda e pelos conhecimentos sobre o biorreator de imersão temporária.

À minha família, que me incentiva a crescer cada vez mais.

Ao meu esposo Nataniel Kegles, por todo amor, carinho, ajuda, apoio, compreensão e paciência em todos os momentos. Sou grata a Deus por essa união.

A todos meus amigos, em especial ao Rogério Brys por acreditar tanto no meu potencial e por ser uma das pessoas que eu mais posso contar. E à Bruna Rezende e à Roberta Leal, pela amizade, pelo apoio e por estarem sempre ao meu lado.

Muito obrigada!

RESUMO

MATOSO, Ester Schiavon. **Uso de bactérias diazotróficas na produção de mudas de cana-de-açúcar em diferentes substratos**. 2017. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância no Brasil, o país é o primeiro do mundo na produção de cana e açúcar, segundo em etanol e conquista, cada vez mais, o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética. Um dos problemas desta cultura é o plantio convencional, pois nele ocorre o gasto excessivo de colmos que poderiam ser destinados à indústria, além de aumentar o risco de difusão de pragas e doenças. Além disso, a cana-de-açúcar é extremamente dependente da adubação nitrogenada, pois entre os nutrientes responsáveis pela sua nutrição, o nitrogênio é o elemento absorvido em maior quantidade. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas na produção de mudas originadas de minitoletes e de cultura de tecidos de cana-de-açúcar em substratos alternativos. Utilizaram-se as variedades de cana RB867515, RB92579, RB966928 e RB975932, e substratos produzidos a partir da mistura de casca de arroz carbonizada e composto orgânico, além de um de marca comercial. E foram desenvolvidos diversos experimentos, onde foram avaliados: a sobrevivência das espécies de bactérias diazotróficas nos substratos; parâmetros relacionados à brotação, desenvolvimento de parte aérea e de raízes, além do acúmulo de nitrogênio de mudas; a resposta dessas à inoculação quanto ao perfilhamento, teor de clorofila, área foliar, acúmulo de biomassa, incremento de massa seca, teor de nitrogênio e fixação biológica; e no cultivo *in vitro* foi avaliada a multiplicação das brotações e o crescimento de plântulas em frascos contendo meio semissólido e em biorreator de imersão temporária, a resposta destas plantas à inoculação quanto ao enraizamento e a aclimação nos diferentes substratos. Os resultados obtidos indicam a interação entre as variedades, substratos e inoculação para todos os parâmetros avaliados que envolveram estes fatores. Os substratos contendo casca de arroz carbonizada e composto orgânico apresentam melhores resultados na sobrevivência de bactérias diazotróficas e podem ser utilizados desde a aclimação até o desenvolvimento de mudas. Todas as variedades apresentam excelente desenvolvimento de mudas a partir de micropropagação e também de minitoletes, e de alguma forma respondem à inoculação de bactérias diazotróficas, mas apesar disso, apenas na RB92579 e na RB975932 ocorreu a fixação biológica de nitrogênio.

Palavras-chave: Plântulas. Resíduos. FBN. Bactérias promotoras de crescimento.

ABSTRACT

MATOSO, Ester Schiavon. **Use of diazotrophic bacteria in the production of sugarcane seedlings on different substrates.** 2017. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

Sugarcane is a very important culture in Brazil, the country is the world's first in the production of cane and sugar, second of ethanol and increasingly conquers the foreign market with the use of biofuel as an alternative energy. One of the problems of this crop is conventional planting, because in it occurs the excessive spending of stalks that could be destined to the industry, besides increasing the risk of diffusion of plagues and diseases. Moreover, sugarcane is extremely dependent on nitrogen fertilization, because among the nutrients responsible for its nutrition, nitrogen is the element absorbed in greater quantity. In this sense, the objective of this work was to evaluate the effects of the inoculation of diazotrophic bacteria in the promotion of growth, rooting and biological nitrogen fixation of pre-sprouted and micropropagated sugarcane seedlings produced in alternative substrates. Were used the sugarcane varieties RB867515, RB92579, RB966928 and RB975932, and substrates produced from the mixture of carbonized rice rusk and organic compound, in addition to a trademark. And several experiments were developed, where they were evaluated: the survival of the diazotrophic bacteria species in the substrates; parameters related to sprouting, aerial part and root development, and nitrogen accumulation of seedlings; the response of these seedlings to inoculation for tillering, chlorophyll content, leaf area, biomass accumulation, dry mass increase, nitrogen content and biological fixation; And in the in vitro cultivation the multiplication of the shoots and the growth of seedlings in glass jars containing semi-solid medium and in temporary immersion bioreactor, the response of these plants to the inoculation in rooting and the acclimatization in the different substrates. The results indicate the interaction between the varieties, inoculation and substrates for all evaluated parameters that involved these factors. The substrates containing carbonized rice rusk and organic compost present better results in the survival of diazotrophic bacteria and can be used from acclimatization to the development of seedlings. All varieties show excellent development of seedlings from micropropagation and also minitoteles, and somehow respond to the inoculation of diazotrophic bacteria, but nevertheless, only in RB92579 and in RB975932 the biological fixation of nitrogen.

Keywords: Seedlings. Waste. BFN. Growth-promoting bacteria.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Sistema de numeração de folhas estabelecido por Kuijper (CASAGRANDE,1991).20
- Figura 2** - Estádios de desenvolvimento da cana-de-açúcar.21
- Figura 3** - Materiais utilizados na composição dos substratos a) casca de arroz e b) composto orgânico. (Fotos: Sergio Silva e Ester Schiavon Matoso).36
- Figura 4** - Inoculantes à base de turfa para uso na cana-de-açúcar. (Foto: Ester Schiavon Matoso).39
- Figura 5** - Visão geral do experimento de mudas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas em ambiente protegido. (Foto: Ester Schiavon Matoso).....41
- Figura 6** - Transplante de mudas de cana-de-açúcar no Monte Bonito, interior de Pelotas, RS. (Foto: Ester Schiavon Matoso).46
- Figura 7** - Sobrevivência de bactérias diazotróficas inoculadas individualmente em diferentes substratos ao longo de cinco semanas.....47
- Figura 8** - Sobrevivência de bactérias diazotróficas inoculadas em mistura em diferentes substratos ao longo de cinco semanas.....48
- Figura 9** - Desenvolvimento de raízes de mudas de cana-de-açúcar (Var. RB92579) no substrato 75CAC25CO, inoculadas com bactérias diazotróficas. (Fotos: Ester Schiavon Matoso).....59
- Figura 10** - Mudas da variedade RB92579 em diferentes substratos, com (à esquerda) e sem (à direita) inoculação de bactérias diazotróficas. (Foto: Ester Schiavon Matoso).....59
- Figura 11** - Experimento de cana-planta aos: a) 60; b) 120 e c) 240 dias após o transplante. (Fotos: Ester Schiavon Matoso).65
- Figura 12** - Meristemas apicais inoculados em meio de cultura. (Foto: Ester Schiavon Matoso).80
- Figura 13** - Multiplicação de cana-de-açúcar in vitro. (Fotos: Ester Schiavon

Matoso).	81
Figura 14 - Multiplicação de cana-de-açúcar em: a) biorreator de imersão temporária; b) frascos contendo meio semissólido. (Fotos: Ester Schiavon Matoso).	82
Figura 15 - a) âmpolas contendo as estirpes de bactérias diazotróficas liofilizadas; b) colônias das bactérias em placas de Petri após o crescimento em B.O.D. (Fotos: Ester Schiavon Matoso).	83
Figura 16 - Substratos utilizados na aclimação das mudas. (Foto: Luize Mascarenhas).	85
Figura 17 - Repicagem de explantes da variedade RB975932. (Fotos: Ester Schiavon Matoso).	86
Figura 18 - Oxidação fenólica dos explantes durante as fases de estabelecimento e multiplicação <i>in vitro</i> . (Fotos: Ester Schiavon Matoso e Gustavo Fehrenbach).	88
Figura 19 - Contaminação fúngica e bacteriana durante a fase de multiplicação em biorreator de imersão temporária. (Fotos: Ester Schiavon Matoso e Gustavo Fehrenbach.....	89
Figura 20 - Aparência das raízes de plântulas de cana-de-açúcar das variedades RB867515 e RB966928 aos 30 dias de cultivo. (Fotos: Luize Mascarenhas).	90
Figura 21 - Aparência das plântulas de cana-de-açúcar em frascos do BIT e após a retirada, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas. (Fotos: Luize Mascarenhas).	91

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Densidade, porosidade, capacidade de retenção de água (CRA), umidade, pH, matéria orgânica (M.O) e cinzas dos substratos compostos por misturas de casca de arroz carbonizada (CAC) e composto orgânico (CO), em três concentrações, e o comercial.37
- Tabela 2** - Análise de carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e relação C/N dos substratos compostos por misturas de casca de arroz carbonizada (CAC) e composto orgânico (CO), em três concentrações, e o comercial. Laboratório de Fertilidade do Solo da Universidade Federal de Pelotas.38
- Tabela 3** - Análise de solo da área experimental, localizada no Monte Bonito, interior de Pelotas, RS.43
- Tabela 4** - Médias mensais de temperatura mínima, média e máxima (°C), evapotranspiração e precipitação (mm) da região de Pelotas, no Rio Grande do Sul, entre janeiro e setembro de 2016.44
- Tabela 5** - Índice de velocidade de brotação (IVB) de mudas de cana-de-açúcar em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas.51
- Tabela 6** - Altura de parte aérea (cm) de mudas de cana-de-açúcar em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas.53
- Tabela 7** - Diâmetro do colmo (mm) de mudas de cana-de-açúcar em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas.56
- Tabela 8** - Comprimento de raízes (cm) de mudas de cana-de-açúcar em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas.56
- Tabela 9** - Avaliação quanto à dificuldade de retirada das mudas do tubete em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas.58
- Tabela 10** - Massa fresca total (g) de mudas de cana-de-açúcar em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de

bactérias diazotróficas.	61
Tabela 11 - Massa seca (%) de mudas de cana-de-açúcar em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas.	63
Tabela 12 - Teor de nitrogênio (%) de mudas de cana-de-açúcar em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas.	63
Tabela 13 - Número de perfilhos em plantas de cana-de-açúcar aos 120 dias após o transplante em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas.	65
Tabela 14 - Índice de área foliar (IAF) de plantas de cana-de-açúcar aos 60, 120 e 240 dias após o transplante em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas.	68
Tabela 15 - Teor de clorofila (índice SPAD) em plantas de cana-de-açúcar aos 60 dias após o transplante em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas.	70
Tabela 16 - Biomassa da parte aérea total (t ha ⁻¹) de plantas de cana-de-açúcar aos 240 dias após o transplante em função de substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas.	73
Tabela 17 - Massa seca (%) de plantas de cana-de-açúcar aos 240 dias após o transplante em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas.	73
Tabela 18 - Teor de nitrogênio (%) de plantas de cana-de-açúcar aos 240 dias após o transplante em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas.	75
Tabela 19 - Valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de plantas de cana-de-açúcar aos 240 dias após o transplante em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas.	75
Tabela 20 - Número de brotações de plântulas de cana-de-açúcar cultivadas <i>in vitro</i> , de quatro variedades e número de explantes obtidos ao final de cinco subcultivos.	85
Tabela 21 - Número de brotações e comprimento (cm) de plântulas de cana-de-açúcar cultivadas <i>in vitro</i> no sexto subcultivo, em função das variedades e dos tipos de meio de cultura.	87
Tabela 22 - Porcentagem de sobrevivência de mudas de cana-de-açúcar na fase de aclimação, em função de quatro variedades, quatro substratos, com e sem inoculação de bactérias.	92

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. A cultura da cana-de-açúcar	18
2.2. Métodos de propagação de cana-de-açúcar.....	21
2.3. Substratos	23
2.4. Nitrogênio (N).....	24
2.5. Bactérias diazotróficas endofíticas em cana-de-açúcar	26
2.5.1. Gênero <i>Azospirillum</i>	27
2.5.2. Gênero <i>Paraburkholderia</i>	28
2.5.3. Gênero <i>Gluconacetobacter</i>	29
2.5.4. Gênero <i>Herbaspirillum</i>	30
3. METODOLOGIA GERAL	31
4. CAPÍTULO 1. Produção de mudas de cana-de-açúcar a partir de minitoletes inoculadas com bactérias diazotróficas.....	32
4.1. Introdução	32
4.2. Material e métodos.....	33
4.2.1. Experimento 1: Sobrevivência de bactérias diazotróficas em substratos alternativos para plantio de cana-de-açúcar	33
4.2.2. Experimento 2: Utilização de minitoletes inoculados com bactérias diazotróficas na produção de mudas de cana-de-açúcar	34
4.2.2.1. Delineamento experimental.....	35
4.2.2.2. Preparo dos substratos	35
4.2.2.3. Produção, tratamento e inoculação das mudas	38
4.2.2.4. Avaliações	40
4.2.3. Experimento 3: desempenho de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas	42
4.2.3.1. Delineamento experimental.....	42
4.2.3.2. Produção e aclimatação das mudas	42

4.2.3.3.	Preparo do solo, adubação e calagem	42
4.2.3.4.	Transplante de mudas e adubação de cobertura	43
4.2.3.5.	Precipitação, temperatura e evapotranspiração	43
4.2.3.6.	Manejo de plantas daninhas.....	44
4.2.3.7.	Pragas e doenças	44
4.2.3.8.	Avaliações	44
4.2.3.9.	Análise estatística	45
4.3.	Resultados e discussão	46
4.3.1.	Experimento 1: sobrevivência das estirpes de bactérias diazotróficas nos substratos para plantio.....	46
4.3.2.	Experimento 2: desempenho de mudas inoculadas com bactérias diazotróficas em casa de vegetação.....	50
3.3.3.	Experimento 3: desempenho em cana-planta de variedades inoculadas com bactérias diazotróficas	64
3.4.	Conclusões	76
5.	CAPÍTULO 2. Multiplicação de mudas de cana-de-açúcar através de micropropagação.....	78
5.1.	Introdução	78
5.2.	Material e métodos.....	80
4.2.1.	Local de realização, material de origem, assepsia e indução da brotação	80
4.2.2.	Multiplicação das brotações.....	81
4.2.3.	Multiplicação em biorreator de imersão temporária (BIT)	81
4.2.4.	Contaminação bacteriana, fúngica e oxidação fenólica	83
4.2.5.	Inoculação de bactérias diazotróficas na fase de enraizamento das plântulas	83
4.2.6.	Aclimação das plântulas	84
5.3.	Resultados e discussão	85
5.3.1.	Taxa de multiplicação das brotações.....	85
5.3.2.	Multiplicação e comprimento de plântulas em BIT x meio semissólido	86
5.3.3.	Contaminação e oxidação dos explantes	88
5.3.4.	Enraizamento e desenvolvimento de parte aérea de plântulas inoculadas com bactérias diazotróficas	90
5.3.5.	Sobrevivência das mudas na fase de aclimação	91
5.4.	Conclusões	94
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
7.	REFERÊNCIAS	96

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar foi introduzida no período colonial, representa uma importante fonte de mão de obra no meio rural e ao longo do tempo se transformou em uma das principais culturas da economia brasileira. Apesar de ser cultivada em mais de 100 países, cerca de 80% da produção do planeta estão concentradas em dez países, sendo o Brasil o maior produtor, responsável por mais de 25% da cana produzida (UNICA, 2016). Além disso, o país é também o primeiro do mundo na produção de açúcar e etanol e conquista, cada vez mais, o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética.

A importância da cana-de-açúcar está na sua ampla utilidade, pois além de açúcar refinado e álcool, ela pode ser empregada na alimentação animal ou como matéria prima para a fabricação de produtos agroindustriais e artesanais como rapadura, melaço, melado, açúcar mascavo e aguardente. Seus resíduos também tem grande importância econômica, pois a vinhaça pode ser utilizada como adubo nitrogenado e o bagaço queimado, para geração de energia. (COUTO, 2013).

Na região sul, por exemplo, que hoje é somente a quarta maior região produtora, está concentrado cerca de 40% do total de estabelecimentos produtores de derivados de cana-de-açúcar do Brasil (VERISSIMO, 2012). O Rio Grande do Sul é o segundo maior produtor de cachaça e a cultura da cana-de-açúcar é a que dá maior rendimento financeiro para o estado (CONAB, 2016).

E toda esta importância da cultura tem levado à busca por ganhos produtivos, por isso, pesquisas têm sido desenvolvidas no âmbito do melhoramento genético, com estudos de novas cultivares adaptadas a diversas condições de solo e clima. Assim como, estudos de métodos alternativos ao plantio convencional, que reduzam o volume de material utilizado para a multiplicação e que melhorem a qualidade dos canaviais, como a produção de mudas livre de patógenos (ANTUNES et al., 2014).

Outro aspecto importante é a fixação biológica de nitrogênio (FBN), pois diante dos impactos ambientais decorrentes das práticas da cultura canieira, a menor utilização da adubação química de nitrogênio pode proporcionar uma

melhoria da qualidade do solo, dos mananciais e de outros componentes ambientais. A FBN está incluída em um plano estratégico do Brasil, o da Agricultura de Baixo Carbono (ABC), que foi desenvolvido devido à crescente demanda global por uma agricultura sustentável (BRASIL, 2012).

Bactérias diazotróficas são capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico, tornando-o assimilável pelas plantas, por isso a inoculação desses microrganismos pode substituir, total ou parcialmente, o uso de fertilizante nitrogenado na cultura da cana-de-açúcar. Mas assim como na adubação nitrogenada, as respostas à inoculação dependem da variedade empregada (SCHULTZ et al. 2012; URQUIAGA et al., 2012; PEREIRA et al., 2013) e costumam ser mais frequentes em solos de média e baixa fertilidade (GOSAL et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2006).

Possivelmente a associação com bactérias diazotróficas reduza o uso de fertilizantes por proporcionar benefícios às plantas, como a solubilização de fosfatos e zinco (SARAVANAN; MADHAIYAN; THANGARAJU, 2007; ESTRADA et al., 2013) e a produção de auxinas, giberilinas e citocininas (LIN et al., 2012; SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013), o que e conseqüentemente resulta na promoção do crescimento das plantas.

Visando contribuir com o desenvolvimento sustentável da cana-de-açúcar, a hipótese do presente trabalho é que a mistura de resíduos como a casca de arroz carbonizada com compostos orgânicos pode substituir o uso de substratos comerciais na produção de mudas de cana-de-açúcar.

O trabalho teve como objetivo geral, avaliar os efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas na promoção de crescimento, enraizamento e fixação biológica de nitrogênio de plantas de cana-de-açúcar em diferentes substratos. E como objetivos específicos: (i) obter respostas das variedades RB867515, RB92579, RB966928 e RB975932 quanto à inoculação de bactérias diazotróficas; (ii) efetuar práticas de multiplicação envolvendo propágulos para plantio da cana-de-açúcar; e (iii) desenvolver novas metodologias de produção de mudas micropropagadas e pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas, utilizando resíduos da produção agrícola como substrato.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta proveniente do sudeste asiático, que pertence ao gênero *Saccharum* L. Há pelo menos cinco espécies do gênero: *Saccharum officinarum* L.; *Saccharum spontaneum* L.; *Saccharum sinensis* Roxburgo; *Saccharum barberi* Jeswiet e *Saccharum robustum* Jeswiet. (BACCHI, 1983), sendo a cana-de-açúcar cultivada um híbrido multiespecífico, que recebe a designação de *Saccharum* spp. Estes híbridos são chamados de cultivares ou variedades, atribuindo-os nomes compostos de siglas da instituição que efetuou o cruzamento, ano em que o mesmo foi realizado e o número sequencial das seleções, como por exemplo, RB867515, “RB” República Brasil, ano do cruzamento 1986, família 7515 (VERISSIMO, 2012).

A cana faz parte da família Poaceae, representada pelo milho, sorgo, arroz e muitas outras gramíneas, porém, diferente das demais, é perene e perfilha de maneira abundante, na fase inicial do desenvolvimento. Em seguida vai formando touceiras, constituídas por partes aéreas (colmos e folhas) e subterrâneas (rizoma e raízes). E por possuir esta estrutura tipo rizoma constituída por nódios ou nós, internódios ou entrenós e gemas, ela rebrota sempre que a parte aérea for cortada, sendo essa nova brotação conhecida como soqueira. Após o plantio a primeira vegetação é denominada cana-planta, enquanto as soqueiras são denominadas de cana primeira soca, segunda soca e assim por diante, conforme a sequência de colheitas, que ocorrem durante quatro ou cinco anos consecutivamente, quando então a produtividade diminui muito e é feita a reforma do canavial. As soqueiras têm grande importância econômica, pois é delas que se retira o maior retorno econômico dessa cultura (MATSUOKA, 1996).

As variedades são escolhidas pela produtividade, resistência a doenças e pragas, teor de sacarose, facilidade de brotação, exigência de clima e solo e período útil de industrialização. Para que possa fornecer matéria-prima para a destilaria durante toda a safra, que dura em torno de seis meses, é necessário que a lavoura

de cana-de-açúcar tenha variedades precoces, médias e tardias; isto quer dizer, variedades em que a maturação da cana ocorra no início, meio e fim da safra.

O estado de São Paulo é o maior produtor de cana-de-açúcar do Brasil, e neste estado, as variedades mais cultivadas são da sigla RB, que são os materiais desenvolvidos pela Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (Ridesa). Esta liderança foi confirmada pelo Censo Varietal 2016, realizado pelo Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar (PMGCA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Sendo a RB867515 a variedade mais cultivada, ocupando 25,3% da área. Em segundo lugar vem a RB966928, que a cada ano ocupa uma área de cultivo maior no estado. O terceiro material mais cultivado também é uma RB, a RB92579, com 6,9%.

A cultura se desenvolve melhor em solos profundos, argilosos de boa fertilidade, com alta capacidade de retenção de água, com boa drenagem e pH entre 6,0 e 6,5. Normalmente no preparo do solo para o plantio há necessidade de se fazer calagem para que o pH atinja estes valores, e uma adubação baseada na análise do solo e nas exigências nutricionais da cultura (DIAS, 1997).

O sistema radicular da cana-de-açúcar é composto por raízes temporárias, permanentes e adventícias, formando um sistema fasciculado bem desenvolvido com crescimento de até quatro metros ou mais. Sendo que, 85% delas encontram-se nos primeiros 50 cm e, aproximadamente, 60% entre os primeiros 20-30 cm de profundidade, havendo diferenças entre as variedades (SILVA; SILVA, 2012).

O colmo, ou seja, o caule da planta é a parte mais importante, pois é o órgão de reserva da mesma, onde é armazenado o açúcar. Está formado por entre-nós que variam em longitude, grossura, forma e cor segundo a variedade. Os entre-nós estão unidos por nós, lugar onde se enxertam as folhas. Nos nós encontramos a gema que é importante na propagação da planta.

Já as folhas, são lanceoladas de filotaxia oposta. São compostas pela lâmina e bainha, ligadas por uma porção internamente membranosa, denominada lígula. A base de sua sustentação é a nervura central, da qual saem várias nervuras paralelas, cada qual contendo um feixe vascular. Entre estas nervuras se estendem fileiras de estômatos, presentes nas duas faces da folha (BACCHI, 1983). A junta de lâmina é onde se encontram duas áreas em forma de calço chamadas de "barbelas". As folhas são numeradas pelo sistema de Kuijper, como foi citado por Casagrande (1991). A primeira folha de cima para baixo do colmo com barbelas vistas

claramente é designada +1. Para baixo elas recebem, sucessivamente, os números +2, +3 e assim por diante (Figura 1). A folha "da barbela superior visível" (+3) é um tecido diagnóstico que é frequentemente usado na avaliação do estado nutricional.

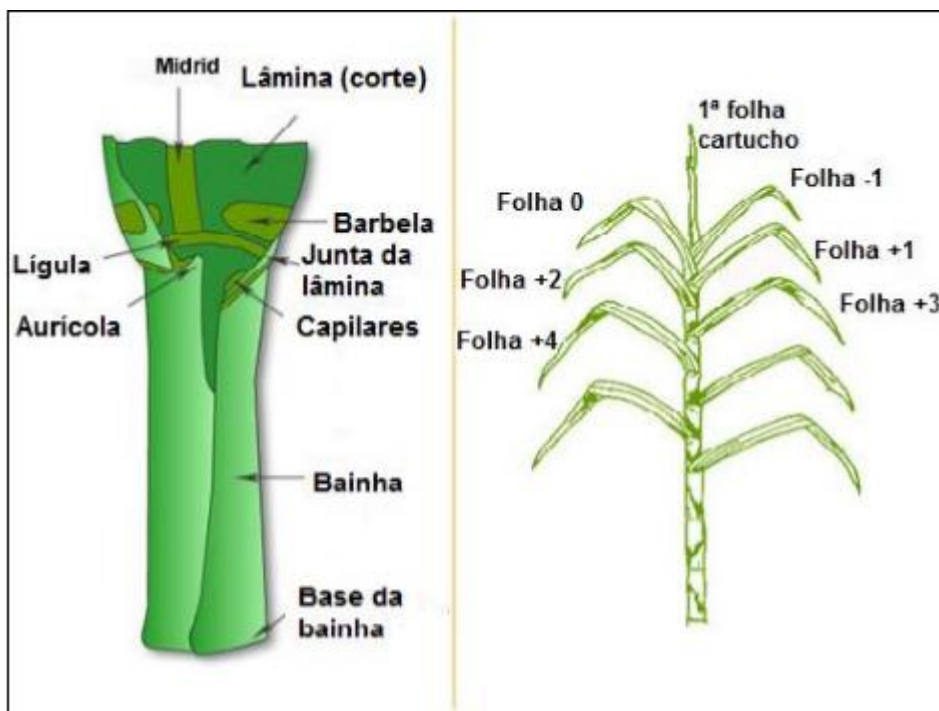


Figura 1 - Sistema de numeração de folhas estabelecido por Kuijper (CASAGRANDE,1991).

Em relação à fenologia, pode-se considerar que a cana-de-açúcar tenha quatro estádios de desenvolvimento, sendo o primeiro da brotação e emergência dos brotos (colmos primários). A base de uma boa cultura está nesse estágio, pois é nele que ocorre o estabelecimento inicial das plantas no campo. O segundo se dá no perfilhamento e estabelecimento definitivo da cultura. O terceiro é período de grande crescimento, que vai do perfilhamento final ao intenso acúmulo de sacarose. E no quarto ocorre a maturação, com intenso acúmulo de sacarose nos colmos (Figura 2).

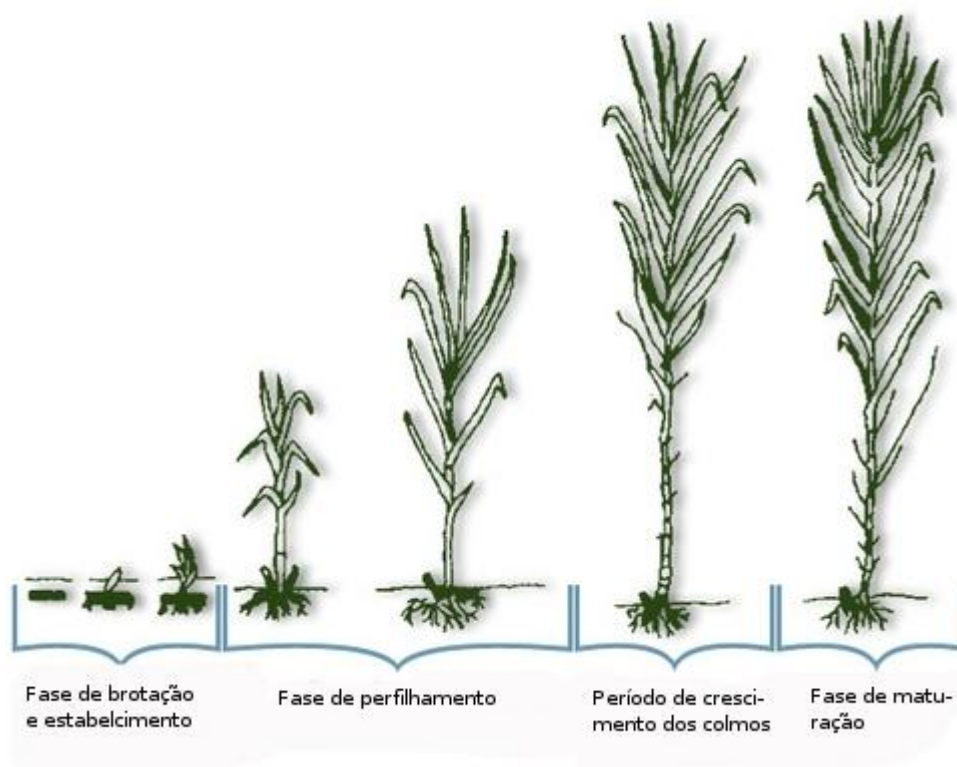


Figura 2 - Estádios de desenvolvimento da cana-de-açúcar (GASCHO; SHIH, 1983)

2.2. Métodos de propagação de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar se propaga de forma sexuada, através de sementes e de forma assexuada ou vegetativa, por meio de gemas laterais. O florescimento representa a possibilidade da reprodução sexuada, desejável em programas de melhoramento genético. O local escolhido para execução dos cruzamentos deve levar em consideração os fatores que favoreçam o aparecimento de pendões florais dos progenitores a serem utilizados (MATSUOKA; GARCIA; ARIZONO, 2005).

Tradicionalmente, o florescimento é evitado em cultivos comerciais, com o plantio de variedades que não florescem ou que não o fazem com facilidade. A multiplicação de canaviais é feita vegetativamente por meio de toletes de duas a três gemas, com aproximadamente 25 centímetros, que são extraídos de colmos produzidos em viveiros. O plantio envolve quatro etapas principais: a coleta dos colmos em local distinto das áreas de plantio; o transporte; o seccionamento (picagem) dos colmos e distribuição do material nos sulcos e, por último, é feita a adubação e a cobertura das mudas (BRAUNBECK; MAGALHÃES, 2010).

A partir do ano de 2006, o plantio manual foi quase todo substituído pelo plantio mecanizado, e com isso, houve o aumento significativo da quantidade dos toletes necessários para o plantio de um hectare de cana-de-açúcar. Quando o sistema era manual, eram necessárias, em geral, de 10 a 12 toneladas de toletes para plantar um hectare e com a mecanização, de 16 a 20 toneladas para a obtenção dos mesmos resultados. Isso porque as gemas presentes nos toletes são muito sensíveis, fáceis de sofrer danos, o que ocorre frequentemente durante o processo. Outro problema é a compactação do solo causada pelo tráfego excessivo de máquinas nas áreas, que é um dos principais fatores de queda de produtividade a médio e longo prazos nas lavouras de cana-de-açúcar brasileiras.

Uma alternativa ao método convencional de propagação é o uso de mudas pré-brotadas (MPB). O sistema se baseia na utilização de toletes de uma gema, conhecidos como minitoletes, os quais são plantados em substrato para que ocorra a brotação e crescimento das mudas. Permanecem em ambiente protegido por aproximadamente 45 dias, em seguida passam por duas fases de aclimação, a primeira em tela de sombreamento (sombrite) e a segunda a céu aberto e então somente podem ser levadas para o campo (LANDELL et al., 2012). As gemas são escolhidas cuidadosamente, eliminando as danificadas e com presença de patógenos, o que garante a redução do volume de colmos e o melhor controle na qualidade de vigor, redundando em canaviais de excelente padrão clonal e, portanto, com maior homogeneidade, confirmam Xavier et al., (2014).

Outra opção é a micropropagação através de meristemas, que é um dos métodos mais viáveis para obter material sadio, pois por apresentar células indiferenciadas há poucas possibilidades de presença de patógenos (ALCANTARA et al., 2014). Esta técnica tem o objetivo de regenerar plantas idênticas à planta mãe, e isto é possível, pois os propágulos (células, teidos ou órgãos) são mantidos em meio de cultivo sob condições assépticas com controle de densidade de fluxo de fótons, fotoperíodo e temperatura (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; GEORGE, 2008; CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2013).

A utilização do meio de cultivo adequado para a cultura é de fundamental importância. Para a cana a maioria dos trabalhos utilizam meios semissólidos para o estabelecimento e meios líquidos para a etapa de multiplicação. A composição básica do meio recomendado utiliza os sais minerais do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), modificações substanciais são feitas dependendo da variedade e do

propósito do estudo. Estas modificações normalmente variam entre concentrações e combinações de reguladores vegetais, sendo auxinas e citocininas, os mais utilizados. Os reguladores de crescimento vegetal são fundamentais, pois são responsáveis por suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios do explante, estimulando respostas como enraizamento, alongamento, multiplicação de parte aérea ou crescimento (LEMOS, 2013).

O sistema de biorreator de imersão temporária (BIT) patenteado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia utiliza frascos dispostos lado a lado, onde um contém o meio nutritivo e o outro o material vegetal. Os frascos são interligados por um tubo e o meio líquido é transferido de um para o outro através de fluxo de ar. Este sistema foi baseado no modelo proposto por Lorenzo et al. (1998) e têm aumentado a eficiência, produtividade da propropagação de plantas com redução no tempo requerido para micropropagação.

2.3. Substratos

Substrato para plantas corresponde à matéria-prima ou mistura de matérias-primas que substituem o solo no cultivo e servem de suporte de plantas e ancoragem para as raízes, possibilitando o fornecimento de quantidades equilibradas de ar, água e nutrientes (ZORZETO, 2011).

Geralmente o substrato é utilizado na produção de mudas, aclimatação de plântulas micropropagadas e no cultivo fora do solo de flores e produtos olerícolas. Esse insumo proporciona um maior rendimento em relação aos métodos tradicionais por apresentar características importantes como: maior precocidade, menor possibilidade de contaminação por fitopatógenos, maior percentual de aproveitamento na relação muda/semente e gerar menor estresse no transplante (LIMA et al., 2009).

As matérias-primas utilizadas na composição de substratos podem ser de origem mineral, orgânica ou sintética, desde que apresentem características químicas, físicas e biológicas desejáveis (KANASHIRO, 1999). Um bom substrato é aquele que proporciona boas condições de umidade, teor de nutrientes, disponibilidade de nutrientes e de água, macro e microporosidade, capacidade de troca de cátions, boa agregação às raízes e uniformidade (ENSINAS, S.C.; MAEKAWA JUNIOR; ENSINAS, B.C, 2011; COSTA et al., 2013).

No entanto, é difícil encontrar um material que seja capaz de atender todas as exigências para crescimento e desenvolvimento das espécies, da mesma forma que não há substrato que seja recomendado a todas as culturas (ABAD, 1991). Portanto, é necessário averiguar quais os melhores materiais para cada situação avaliada, necessitando de pesquisas com diferentes tipos de substratos para o conhecimento das características presentes e do potencial de cada um para as culturas de interesse.

Em primeiro lugar, deve ser feita a caracterização do material, determinando-se suas propriedades físicas, químicas e biológicas; depois, a comparação dessas propriedades com as de um substrato considerado “ideal”; caso essas características sejam significativamente distintas dos valores ótimos recomendados, proceder ao seu melhoramento; e, finalmente, considerar ensaios de crescimento vegetal (ABAD; MARTINEZ, P. F.; MARTINEZ, J., 1993).

Os materiais orgânicos mais comumente utilizados no cultivo de plantas são: turfa, cascas de pínus, fibra de coco, casca de arroz carbonizada, outras fibras e cascas. E dentre os minerais estão vermiculita, perlita, espuma fenólica, pó de rochas e argila expandida.

A turfa é o resultado da decomposição lenta do musgo *sphagnum* que se acumula em pântanos, principalmente no Canadá (CSPMA, 2010) e devido ao seu alto teor de matéria orgânica, é amplamente utilizada como componente principal de substratos de marcas comerciais. Entretanto, por serem as turfeiras um habitat natural de espécies de plantas e animais, além de “arquivo” arqueológico e reservatório de carbono, sua exploração tem sido alvo de grupos de defesa ambiental, o que tem levado à substituição da turfa por compostos orgânicos (GRUSZYNSKI, 2002). E a associação de casca de arroz a outros materiais se destaca devido ao baixo custo, ausência de contaminantes, fácil manuseio e grande capacidade de drenagem, que quando associada a outros materiais garante boas características ao substrato.

2.4. Nitrogênio (N)

O ciclo do nitrogênio, após a fotossíntese, é o processo mais importante no planeta. O nitrogênio faz parte da constituição das bases nitrogenadas, aminoácidos e conseqüentemente das proteínas, demonstrando assim a sua importância na

constituição de moléculas vitais para os organismos vivos, sendo assim, um dos elementos de maior importância na nutrição de plantas (LIMA et al., 2001).

Mesmo apresentando tal importância, a maioria dos organismos não consegue assimilar o nitrogênio atmosférico, o qual compõe 78% da atmosfera. Apenas um grupo relativamente pequeno de bactérias, chamadas diazotróficas, consegue fixar o nitrogênio e converte-lo em compostos de amônia solúveis em água. Este processo ocorre devido à presença da enzima a nitrogenase nestes microrganismos, a qual é formada por duas subunidades. A primeira subunidade capta a energia necessária para o processo e a segunda é responsável pela conversão no nitrogênio em amônia.

O processo de fixação do nitrogênio pode ser obtido de forma industrial (Haber-Bosch), no entanto a quebra da tripla ligação que existe entre as duas moléculas do nitrogênio atmosférico requer condições elevadas de temperatura e pressão, o que só é conseguido através da queima de combustíveis fósseis, este custo é transferido para a produção das culturas agrícolas (na forma de adubo de nitrogenado), o qual é responsável por cerca de até 20% dos custos de produção (JORIS, 2015).

Entre os nutrientes responsáveis pela nutrição da cana-de-açúcar, o nitrogênio é o elemento absorvido em maior quantidade, basicamente nas formas minerais NO_3^- e NH_4^+ , sendo a maior parte absorvido através do fluxo de massas (99%) e apenas 1% pela interceptação radicular (PRADO et al., 2005; MALAVOLTA, 2006). Embora o N constitua aproximadamente apenas 1% da matéria seca da cana-de-açúcar, suas funções são fundamentais no desenvolvimento da planta. Em condições de deficiência do nutriente, ocorre clorose nas folhas mais velhas e a diminuição da atividade meristemática da parte aérea, o que resulta na diminuição do perfilhamento, da área foliar, longevidade das folhas, qualidade do caldo e aumento do teor de fibra. Já o excesso do mesmo, resulta no atraso da maturação e também prejudica a qualidade do caldo.

A cana-de-açúcar no Brasil é cultivada com doses relativamente baixas de N (90 a 120 kg ha⁻¹). Em outros países, as quantidades de N aplicadas na cultura podem ser até 100% superiores (150 a 250 kg ha⁻¹), com a obtenção de produtividades similares (CANTARELLA; TRIVELIN; VITTI, 2007). Com baixo uso de insumos, as condições favoráveis de solo e clima resultam em altas produtividades da cultura nas regiões produtoras brasileiras, fornecendo assim bons índices de

produção de energia renovável em relação ao total de energia fóssil gasto na produção agrícola e industrial. Nesse contexto, o uso de fertilizantes nitrogenados é um componente-chave no balanço energético, pois responsável por 23% da energia fóssil utilizada nas operações da cultura, e 19% da energia total gasta, considerando também todas as etapas para a produção de bioetanol (GALDOS et al., 2010; JORIS, 2015).

A adubação nitrogenada pode promover aumento da produtividade em ciclo de cana-planta, no entanto embora existente em algumas situações, a resposta da cana-planta ao N é pequena e normalmente ocorre em doses baixas (FRANCO et al., 2010; FORTES et al., 2013; PENATTI, 2013). Na cana-soca, as respostas à adubação nitrogenada são mais evidentes que em cana-planta, refletindo em maior vigor das soqueiras, aumentando assim o potencial produtivo da cultura. No ciclo de cana-soca, as condições são mais favoráveis ao aproveitamento do N aplicado, pois iniciam após a obtenção de altas produtividades com baixas doses de N na cana-planta (PENATTI, 2013).

O nitrogênio também é utilizado na síntese de compostos celulares, como a clorofila, sendo o seu teor nas folhas da planta, proporcional à quantidade de nitrogênio que ela absorveu. Dessa forma, conhecendo o teor de clorofila é possível saber as áreas da lavoura que estão com deficiência de N. Ou ainda, é possível saber onde os níveis já estão satisfatórios e evitar desperdícios com adubações desnecessárias. A medição do teor de clorofila através de um clorofilômetro (índice SPAD – Soil Plant Analysis Development) é considerada a melhor indicadora do estado nutricional de N na planta (BLACKMER; SCHEPERS, 1994). O índice SPAD estima o teor relativo de clorofila, mediante valores calculados no aparelho a partir da quantidade de luz absorvida pela folha (WASKOM et al., 1996).

2.5. Bactérias diazotróficas endofíticas em cana-de-açúcar

Bactérias endofíticas possuem, da mesma forma que patógenos, a capacidade de penetrar na planta e colonizar sistematicamente o hospedeiro, podendo habitar o apoplasto, vasos condutores e ocasionalmente o meio intracelular (ANDREOTE, 2007). Também podem atuar em processos essenciais para o desenvolvimento vegetal, como por exemplo, auxílio na obtenção de nutrientes, promovendo o crescimento vegetal por meio de produção de fitormônios. E ainda,

atuam protegendo a planta hospedeira contra patógenos seja por antibiose direta ou pela indução de resistência sistêmica vegetal (OLIVEIRA; ANDRADE, 2010). A associação mais conhecida é a que ocorre entre várias espécies de leguminosas e as bactérias do gênero *Rhizobium*, mas já se sabe que as bactérias fixadoras de nitrogênio endofíticas também atuam no interior de algumas plantas, como cana-de-açúcar, cereais e forrageiras.

A inoculação de bactérias proporciona benefícios à cana além da FBN, como aumento das raízes, da assimilação de CO₂ e do número de folhas, (KLEINGESNDS, 2010). Pereira et al. (2013) constataram que algumas variedades de cana, quando inoculadas, chegam a acumular mais matéria seca do que em tratamentos com uso de fertilizante nitrogenado. Gosal et al. (2012), no entanto, relataram que o uso de inoculante na espécie permite maior acúmulo de biomassa apenas quando combinado com a adubação nitrogenada.

Os estudos sobre a associação de bactérias à cana-de-açúcar tem se intensificado ao longo dos anos e várias bactérias fixadoras de N₂ foram isoladas de tecidos de diversas partes da planta (BALDANI et al., 2002). Em 2008 foi lançado pela Embrapa Agrobiologia, um inoculante que pode ser aplicado tanto na cana-planta como na cana-soca para redução total ou parcial do nitrogênio aplicado. Este inoculante é composto por cinco estirpes de cinco espécies de bactérias diazotróficas, as quais serão abordadas a seguir nesta revisão de literatura.

2.5.1. Gênero *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* compreende bactérias diazotróficas que estão associadas com plantas da família *Poaceae* como arroz, trigo, milho e cana-de-açúcar. Algumas espécies têm sido estudadas devido a uma série de características que as tornam importante para os seres humanos como a capacidade de promover o crescimento vegetal através da produção de fitormônios e fixação biológica do nitrogênio. Estudos de regulação da expressão gênica demonstraram que a fixação do nitrogênio ocorre apenas em condições especiais devido ao grande gasto energético por parte do microrganismo. Uma das condições necessárias para a expressão da nitrogenase é baixa disponibilidade de nitrogênio intracelular, portanto a utilização de altas doses de fertilizantes nitrogenados, como a uréia, inibe a fixação biológica.

Estas bactérias estão presentes em todos tipos de solos e possuem um diâmetro de um micrômetro (μm) e o comprimento de 2,1 a 3,8 μm (SILVA et al., 2004), são curvas, móveis e de variadas origens geográficas (HUERGO, 2006). A temperatura ótima de crescimento varia entre 28 e 41°C, dependendo da espécie (ECKERT et al., 2001). São microrganismos aeróbicos típicos quando supridos com fonte de N combinado, e microaerofílicos quando crescem dependendo da fixação de N_2 (DONZELI, 2002).

As fontes de carbono de maior preferência pelo *Azospirillum* são ácidos orgânicos como, o malato, piruvato, succinato, glicose e frutose. Já as fontes de nitrogênio podem advir de amônia, aminoácidos, nitrato e nitrito e nitrogênio atmosférico (N_2) (DOBEREINER, 1995). Todavia, são microrganismos capazes de crescer utilizando o N atmosférico como fonte única de nitrogênio (HUERGO, 2006). Algumas bactérias fixadoras de N_2 ocorrem na superfície de raízes, no entanto espécies do gênero *Azospirillum* ocorrem no interior das raízes, entre os espaços intercelulares ou até dentro de algumas células da raiz, como no protoxilema, que pode ser completamente preenchido por estas (SIQUEIRA; FRANCO, 1988). Estas bactérias tem a capacidade colonizar o sistema radicial, assim como, o colmo das gramíneas, e isto ocorre devido à presença de flagelos, que possibilita uma maior mobilidade desta no solo e nas plantas (DE WEERT et al., 2002).

A espécie desse gênero que participa da composição do inoculante para FBN em cana-de-açúcar é a *Azospirillum amazonense*, que foi reclassificada como *Nitrospirillum amazonense*, a partir da combinação de dados genéticos, químicos, taxonômicos e fisiológicos (MAGALHÃES et al. 1983; LIN et al. 2014).

2.5.2. Gênero *Paraburkholderia*

Paraburkholderia (família *Burkholderiaceae*) é um gênero grande e ubíquo dentro do grupo das betaproteobacterias. Algumas espécies são relatadas como sendo patogênicas para humanos e animais, mas várias cepas dos complexos *B. cepacia*, *B. pseudomallei* e *B. mallei* (CHENGE; CURRIE, 2005), são de natureza ambiental e promovem o crescimento de plantas. Com base na afinidade filogenética, tem sido recentemente proposto dividir o gênero em dois grupos distintos: *Burkholderia* e *Paraburkholderia*. Enquanto o primeiro acomoda isolados

clínicos, este último engloba o grupo ambiental benéfico da planta (SAWANA; ADEOLU; GUPTA, 2014; DOBRITSA; SAMADPOUR, 2016).

A espécie desse gênero que participa da composição do inoculante para FBN em cana-de-açúcar é *Burkholderia tropica* (REIS et al., 2004), hoje denominada *Paraburkholderia tropica*, e os meios de cultivo utilizados no Brasil para isolamento destes microrganismos são: LGI-P e JMV semissólidos. A espécie tem a forma de bastão ligeiramente curvado e sua mobilidade é possível devido à existência de flagelos. Essas bactérias tem a capacidade de reduzir o acetileno a etileno em meio semissólido sem nitrogênio, e são, portanto, consideradas capazes de fixar nitrogênio atmosférico.

A temperatura ótima de crescimento é 30 °C, sendo possível a utilização de diversas fontes de carbono para esta bactéria incluindo açúcares e ácidos orgânicos (CABALLERO-MELLADO et al., 2007). Nas plantas, elas primeiro colonizam a superfície das raízes e depois, os espaços intercelulares, podendo também colonizar as plantas através dos pontos de crescimento de raízes laterais (BALDANI et al., 1997). Quando inoculadas em cana-de-açúcar apresentam melhores resultados quando em conjunto com *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Nitrospirillum amazonense* (OLIVEIRA et al., 2006; SCHULTZ et al., 2012; PEREIRA et al., 2013; CHAVES, 2014).

2.5.3. Gênero *Gluconacetobacter*

Dentre as bactérias descritas neste gênero, as espécies fixadoras de nitrogênio atmosférico são *G. diazotrophicus*, *G. azotocaptans* e *G. johannae*. *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi isolada por Cavalcante; Döbereiner (1988) a partir de tecidos de cana-de-açúcar cultivados nos estados brasileiros Alagoas, Pernambuco e Minas Gerais. Estudos de homologia DNA-RNA desenvolvidos por Gillis et al., (1989), possibilitaram sua reclassificação em *Acetobacter diazotrophicus*, mas foi incorporada ao gênero *Gluconacetobacter* (YAMADA; HOSHINO; ISHIKAWA, 1997).

A espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* possui poucos hospedeiros, mas é bastante encontrada em associação com plantas ricas em açúcar como a cana-de-açúcar, batata-doce e capim elefante (*Pennisetum purpureum*). Esta bactéria coloniza raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar em números de até 106 células

g⁻¹ de massa fresca (REIS et al., 1994; BODDEY et al., 1998), mas apresenta baixa diversidade genética (CABALLERO-MELLADO et al., 1995), por isso, sua população presente nos tecidos de cana-de-açúcar diminui consideravelmente com o avançar da idade da planta (SILVA, 1999; PERIN, 2003) e em condições favoráveis de nitrogênio (REIS JR et al., 2000).

Seus efeitos benéficos em cana-de-açúcar estão associados à FBN e à produção de substâncias promotoras de crescimento (LEE et al. 2004). E ainda, apresenta potencial para o controle biológico sobre determinados fitopatógenos como, por exemplo, *Xanthomonas albilineans* (BLANCO et al., 2005).

2.5.4. Gênero *Herbaspirillum*

Duas espécies do gênero *Herbaspirillum* fazem parte da composição do inoculante usado na cana-de-açúcar, *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al., 1986) e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* originalmente descrita como *Pseudomonas rubrisubalbicans* (GILLIS et al., 1991) e reclassificada por BALDANI et al. (1996). Estas espécies de bactéria diazotrófica são encontradas associadas à poaceas, como cana-de-açúcar, arroz, milho, sorgo e capim elefante e são conhecidas pela capacidade de fixar nitrogênio atmosférico.

A *H. seropedicae* foi a primeira espécie descrita do gênero e possui a maior distribuição e ocorrência dentre as espécies diazotróficas endofíticas estudadas. Já a *H. rubrisubalbicans* tem ocorrência mais restrita e é conhecida por causar a doença chamada "estria mosqueada" na variedade de cana-de-açúcar B3462.

Espécies de *Herbaspirillum* também podem contribuir para o crescimento vegetal através de outros fatores, além da FBN. Bastián et al., (1998) detectaram a produção de AIA e giberelinas A1 e A3 na espécie *H. seropedicae*. E Radwan et al. (2002) constataram a produção de indóis por estirpes de *H. rubrisubalbicans*. No entanto, a sua contribuição na promoção de crescimento vegetal é menor do que apresentada por outras bactérias. Mas estas duas espécies são capazes de colonizar nichos específicos no interior dos tecidos vegetais, podendo transferir mais eficientemente para planta os compostos nitrogenados produzidos e ainda não sofrerem limitações de substâncias ricas em carbono (OLIVARES et al., 1997).

3. METODOLOGIA GERAL

O trabalho de pesquisa foi desenvolvido na Embrapa Clima Temperado, onde foram realizados diversos experimentos. Com o intuito de alcançar os objetivos do trabalho, utilizaram-se as variedades de cana-de-açúcar RB867515, RB92579, RB966928 e RB975932, e substratos produzidos a partir da mistura de casca de arroz carbonizada e composto orgânico, além de um substrato de marca comercial.

Para a inoculação de bactérias foram utilizadas estirpes das espécies: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Burkholderia tropica*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Nitrospirillum amazonense*.

O primeiro experimento teve como objetivo estimar a sobrevivência das espécies de bactérias diazotróficas em cada um dos substratos utilizados no trabalho. Em um segundo momento, realizou-se o experimento com mudas a produzidas a partir de minitoletes e inoculadas com bactérias diazotróficas e avaliaram-se parâmetros relacionados à brotação, desenvolvimento de parte aérea e de raízes, além do acúmulo de nitrogênio.

Em cana-planta, no decorrer de 240 dias, observou-se a resposta das variedades à inoculação quanto ao perfilhamento, teor de clorofila, área foliar, acúmulo de biomassa, incremento de massa seca, teor de nitrogênio e fixação biológica.

E no cultivo *in vitro* foi avaliada a multiplicação das brotações e o crescimento de plântulas em frascos contendo meio semissólido e em biorreator de imersão temporária, também a resposta destas plantas à inoculação na fase de enraizamento e a aclimação em casa de vegetação, nos diferentes substratos.

4. CAPÍTULO 1. Produção de mudas de cana-de-açúcar a partir de minitoletes inoculadas com bactérias diazotróficas

4.1. Introdução

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, e a cultura possui ampla relevância no agronegócio nacional. Devido a sua importância e crescente expansão, é fundamental que se realize um plantio de qualidade e melhorias no setor, pois decisões tomadas neste momento repercutem por todo o ciclo produtivo.

O cultivo da cana-de-açúcar a partir de mudas (LANDELL et al., 2012) tem permitido a redução do volume gasto de colmos, pois proporciona uma alta taxa de multiplicação. Além disso, aumenta a sanidade das mudas e da uniformidade do plantio, com a escolha de gemas não deterioradas e livres de patógenos.

A qualidade das mudas influencia na percentagem de sobrevivência, na velocidade de crescimento e na produção final. Além disso, mudas de melhor qualidade, por terem maior potencial de crescimento, exercem um melhor controle da vegetação invasora, reduzindo os custos dos tratamentos culturais. Sanguino (2006) ressaltou a importância da qualidade das mudas na formação das lavouras. Alertou que a utilização de colmos como fonte de mudas facilita a propagação de doenças e reduz a vida útil dos canaviais, causando grandes prejuízos.

O substrato também é de extrema importância para a produção de mudas mais vigorosas e mais resistentes às adversidades climáticas. Sendo a formação das raízes, o fator determinante no pegamento e na sobrevivência das mudas após o transplante para o campo (ANDRADE et al., 2014).

A utilização de resíduos da produção agropecuária, domésticos e agroindustriais como substrato tende a diminuir os custos de produção e na região sul país, com a indústria arrozeira, são gerados resíduos cujas características sugerem a possibilidade de constituírem substratos adequados para a produção de mudas de cana-de-açúcar.

A associação de bactérias diazotróficas a mudas de cana-de-açúcar é uma atividade muito promissora, pois além do benefício obtido pela planta através da FBN, efeitos no crescimento vegetal promovido por microrganismos endofíticos estão relacionados também à síntese de substâncias reguladoras do crescimento vegetal, indução de resistência a doenças e aumento da disponibilidade de nutrientes. Além disso, a colonização vegetal por estas bactérias pode levar a um aumento tanto na densidade de pelos radiculares como na taxa de emissão de raízes secundárias e do aumento da superfície radicular. Estas alterações podem acarretar um aumento da absorção de água, nutrientes e resistência a estresses ambientais (CANUTO, 2008).

Neste sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar o desenvolvimento de mudas de cana-de-açúcar submetidas à inoculação de bactérias diazotróficas em diferentes substratos e a resposta destas após o transplante para o campo, quanto ao crescimento vegetativo e fixação biológica de nitrogênio.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Experimento 1: Sobrevivência de bactérias diazotróficas em substratos alternativos para plantio de cana-de-açúcar

Com o objetivo de identificar o(s) melhor(es) substratos para a produção de mudas de cana-de-açúcar, foi conduzido um experimento em condições de laboratório, onde foram testados seis inoculantes em seis substratos. O trabalho foi desenvolvido na Embrapa Agrobiologia localizada na cidade de Seropédica, no Rio de Janeiro. Os seis inoculantes consistiram nas estirpes: HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, HRC54 de *H. seropedicae*, PPe8 de *Paraburkholderia tropica*, PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, CBAmc de *Nitrospirillum amazonense*; além da mistura das cinco referidas estirpes.

Antes da inoculação, foi feita a contagem de bactérias diazotróficas nos inoculantes utilizando a metodologia descrita por Baldani et al., (2014) que consiste na diluição seriada e contagem pelo “Número Mais Provável” estimado pela tabela de MacCrady's. Os meios de cultivo semi-sólidos, semi-seletivos são os recomendados para a contagem de cada uma das espécies inoculadas, a saber: JNFb, LIG, LGI-P e JMV. Todos os inoculantes apresentaram contagens iniciais

acima de 109 células por grama de substrato. Para a contagem da população de bactérias diazotróficas nos 36 tratamentos amostras de 1g foram colocadas em 9mL de salina e feita a diluição seriada até a concentração 10^{-5} . Das três menores diluições foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e em seguida inserida em frascos de penicilina contendo 6mL de meio semi-sólido seletivo para as bactérias inoculadas.

Para os tratamentos com inoculação da estirpe *Herbaspirillum rubrisubalbicans* ou *H. seropedicae* o meio utilizado foi o JNFb, para o tratamento com a estirpe *B. tropica*, o meio JMV, para o tratamento com a estirpe *N. amazonense*, o meio LGI e para a estirpe *G. diazotrophicus*, o meio LGI-P.

Os substratos foram resultantes da combinação de casca de arroz carbonizada (CAC) com composto orgânico (CO) em cinco diferentes concentrações e um substrato comercial (SC). Substrato 1: 75% CAC + 25% CO; Substrato 2: 50% CAC + 50% CO; Substrato 3: 25% CAC + 75% CO; Substrato 4: 100% CO; Substrato 5: 100% CAC e Substrato 6: 100% SC.

Foi feita contagem de bactérias diazotróficas nos seis substratos e não foi detectada a presença de bactérias diazotróficas nos meios seletivos, por isso, tubos de ensaio (capacidade para 100 mL) foram preenchidos com cerca de 5g dos seis substratos e inoculados com 1g dos seis diferentes inoculantes com quatro repetições resultando em 144 tubos. Todos os tubos com substrato receberam entre 5 a 10 mL de água destilada estéril visando permitir uma melhor sobrevivência das estirpes bacterianas. E para fins de avaliação, foram feitas contagens de bactérias nos substratos, no período compreendido entre 17 de junho e 14 de julho de 2015.

4.2.2. Experimento 2: Utilização de minitoletes inoculados com bactérias diazotróficas na produção de mudas de cana-de-açúcar

O experimento foi instalado em setembro de 2015 e desenvolvido sob ambiente protegido na Embrapa Clima Temperado (sede), localizada no município de Pelotas, no Rio Grande do Sul, com latitude $52^{\circ}26'25''$ Oeste e $31^{\circ}40'41''$ Sul e altitude de 60 metros. A casa de vegetação onde se deu o trabalho é da marca Van der Hoeven, produzida em policarbonato alveolar, modelo duas águas, cujas dimensões são de 12,8m de largura e 12m de comprimento, mais antecâmara de acesso localizada em uma frontal da casa, que totalizam 165,6m². O manejo da temperatura foi feito através de sistema de resfriamento, ventiladores e do uso de

telas de sombreamento, mantendo-se a temperatura de 25°C. A umidade pode ser controlada através de nebulizadores e a irrigação foi realizada através do sistema de bandejas flutuantes e microaspersores.

4.2.2.1. Delineamento experimental

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), com nove repetições, onde cada planta representou uma unidade experimental ou parcela. Os fatores foram arrançados em esquema trifatorial, com o objetivo de testar quatro variedades de cana-de-açúcar, quatro substratos e a inoculação de bactérias diazotróficas (com inoculação e sem inoculação), totalizando 32 tratamentos.

As variedades de cana-de-açúcar utilizadas foram: RB966928 e RB975932 de ciclo precoce e RB867515 e RB92579 de ciclo médio-tardio. Os substratos para a brotação das gemas e desenvolvimento das mudas consistiram em três combinações de casca de arroz carbonizada (CAC) com composto orgânico (CO), em concentrações de 25, 50 e 75%, respectivamente, além do substrato comercial Turfa Fértil[®], utilizado como testemunha.

4.2.2.2. Preparo dos substratos

O composto orgânico usado foi produzido a partir de resíduos domésticos, vegetais, esterco bovino, cama de aviário, pó de rocha e serragem. O processo de decomposição dos materiais se deu de forma natural, sem adição de microrganismos, em composteira de alvenaria em uma propriedade privada no interior do município de Pelotas, no Rio Grande do Sul. E a casca de arroz utilizada nos substratos foi carbonizada e posteriormente lavada, na mesma propriedade.

O composto foi peneirado antes do preparo dos substratos e as misturas desse material com a casca de arroz carbonizada foram feitas com base no volume, chegando às proporções estipuladas para cada um dos tratamentos.



Figura 3 - Materiais utilizados na composição dos substratos a) casca de arroz e b) composto orgânico. (Fotos: Sergio Silva e Ester Schiavon Matoso)

Os substratos foram submetidos a análises físicas (Tabela 1), como densidade volumétrica, capacidade de retenção de água e porosidade conforme a metodologia descrita por Kämpf; Takane; Siqueira (2006). A porosidade foi obtida, com a utilização de uma proveta de 2000 mL, completada com 1L de água e em seguida acrescentou-se lentamente a amostra de 1L de substrato seco (ao ar por 24 horas) e após a imersão da amostra, fez-se a leitura do nível alcançado pela água.

A densidade (g L^{-1}) foi obtida através do peso de 1L de substrato (seco e peneirado), e calculada através da seguinte fórmula: $d = m/v$. Onde m é a massa (peso), dada em gramas, do substrato e v é o volume de substrato, dado em litros.

O volume de água retido ou capacidade de retenção foi obtido a partir da fórmula $\text{CRA}(\%) = (\text{Peso do substrato drenado} - \text{Peso do substrato seco}) / 100$. Para obtenção dos pesos, foi utilizado um vaso com capacidade de 1L completo com substrato (seco e peneirado), onde foi obtido o valor da massa (substrato+vaso), após o vaso com substrato foi colocado em um balde vazio e colocou-se água cuidadosamente até atingir a marca de 3 cm abaixo da borda. O substrato foi saturado lentamente com água para que todos os poros do substrato ficassem preenchidos, retirou-se o vaso de dentro do balde assim que se formou uma película de água na superfície do substrato, colocou-se o substrato para drenar o excesso de água de 3 a 5 minutos, sem incliná-lo, e após pesou-se o vaso com o substrato drenado.

Foi ainda verificado o teor umidade nos substratos, quando efetuado o plantio, pelo método da Estufa Padrão. Primeiramente separaram-se amostras dos

substratos foram distribuídas em Becker e em seguida, determinou o peso do Becker e do conjunto “becker-substrato”. Esse material foi levado para estufa, onde permaneceu por 48 horas e após isto, pesou-se novamente para determinar a quantidade água que evaporou. Com esses dados em mão, fez-se um cálculo da diferença da massa total antes de ir para estufa e da massa após retirar da estufa, obtendo, assim, a quantidade e percentual de água existente na amostra.

A determinação do pH foi feita seguindo-se o método descrito pelo MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Instrução Normativa nº 17 de 21 de maio de 2007 (MAPA, 2007), em solução de substrato extraída por diluição na proporção 1:5. Por meio da densidade volumétrica da amostra, tomou-se uma massa calculada, em balança com precisão de 1 g, equivalente a uma alíquota de 10 mL. Transferindo essa amostra para um frasco, adicionaram-se 50 mL de água e agitou-se por 1 hora em agitador mecânico pendular TECNAL, modelo TE – 240/1, em rotação de 110rpm. Passado esse tempo, a amostra permaneceu em repouso por 30 minutos, sendo posteriormente filtrada efetuando-se a leitura do pH na solução resultante em peagâmetro de bancada Quimis, modelo Q400MT.

E para a determinação do conteúdo de matéria orgânica e de cinzas, seguindo o procedimento utilizado em laboratório do Instituto Agrônomo (ABREU, 2007), pesou-se cerca de 10g da amostra de substrato em um recipiente de porcelana, levando-o à estufa a 110°C por 2 horas. Passado esse tempo, pesou-se a massa seca, levando-a à mufla para carbonização a 550°C para obtenção das cinzas.

Tabela 1 - Densidade, porosidade, capacidade de retenção de água (CRA), umidade, pH, matéria orgânica (M.O) e cinzas dos substratos compostos por misturas de casca de arroz carbonizada (CAC) e composto orgânico (CO), em três concentrações, e o comercial.

Substrato	pH	Densidade (g L ⁻¹)	Porosidade ----- % -----	CRA	Umidade	M.O	Cinzas
75CAC25CO	5,33	432	78	21	47	51,36	48,64
50CAC50CO	6,18	466	72	23	39	42,98	57,02
25CAC75CO	5,59	526	66	27	27	51,26	48,74
Comercial	6,48	630	46	42	40	78,07	21,93

Foi desenvolvida ainda, no Laboratório de Fertilidade do Solo da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, que pertence à Universidade Federal de Pelotas, uma

análise de rotina (macronutrientes), baseada em metodologias utilizadas para análise de solo (Tabela 2). Os conteúdos de nitrogênio e carbono orgânico total foram determinados por analisador elementar Perkin Elemer.

Na quantificação do fósforo (P) e potássio (K) disponíveis adotam-se dois procedimentos: extração do substrato, realizada com extrator Mehlich 1 (H_2SO_4 0,025 N + HCl 0,05 N) e determinação dos teores desses dois nutrientes, utilizando colorímetro (P) e fotômetro de chama (K). Já o cálcio (Ca) e o magnésio (Mg), são denominados trocáveis por estarem adsorvidos (ligados) às cargas negativas das argilas e estão em equilíbrio com a solução do solo. A extração desses elementos do solo é feita com uma solução de KCl na concentração de 1N e a determinação pode ser feita por titulometria ou espectrofotômetro de absorção atômica.

Tabela 2 - Análise de carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e relação C/N dos substratos compostos por misturas de casca de arroz carbonizada (CAC) e composto orgânico (CO), em três concentrações, e o comercial. Laboratório de Fertilidade do Solo da Universidade Federal de Pelotas. 2016.

Substrato	C/N	C	N	P	K	Ca	Mg
----- g.kg ⁻¹ -----							
75CAC25CO	79:1	267,19	3,39	0,71	3,56	1,53	0,93
50CAC50CO	63:1	263,3	5,53	0,59	3,5	5,69	1,69
25CAC75CO	47:1	259,41	7,68	0,47	3,45	9,86	2,44
COMERCIAL	42:1	268	6,4	0,34	2,2	2,19	1,02

4.2.2.3. Produção, tratamento e inoculação das mudas

As mudas foram produzidas a partir da utilização de minitoletes, baseado no manual desenvolvido na Índia pelo ICRISAT (2009) e semelhante à metodologia de Landell et al. (2012). Onde foram coletados colmos de cana-de-açúcar inteiros no campo com o auxílio de um “podão” e feita a despalha desses. Em seguida os colmos foram cortados em toletes de uma gema, também conhecidos como minitoletes ou minirrebolos, separando as gemas viáveis e sem o ataque de pragas. Para o corte e preparo destes minitoletes foi utilizado um sistema de guilhotina com lâmina dupla devidamente desinfestado (XAVIER et al., 2008).

A inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio foi feita com inoculante que consistiu em uma mistura de bactérias contendo as espécies: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *Burkholderia tropica*, *Gluconacetobacter*

diazotrophicus e *Nitrospirillum amazonense*. Este foi produzido na Embrapa Agrobiologia, no Rio de Janeiro, e cedido para o uso no experimento. O processo de elaboração se deu na multiplicação das bactérias em meio de cultura próprio e posterior adição à turfa, formando na verdade, cada espécie um inoculante turfoso de 250g, que foram diluídos juntos em 50 litros de água formando a solução bacteriana (REIS et al., 2009).



Figura 4 - Inoculantes à base de turfa para uso na cana-de-açúcar. (Foto: Ester Schiavon Matoso)

Antecipando a inoculação, com intuito de eliminar microrganismos já presentes na cana e para evitar uma possível interferência com as estirpes de bactérias, os minitoletes foram submetidos à termoterapia por 30 minutos a 52 °C (SANGUINO; MORAES; CASAGRANDE, 2006) e tratamento com fungicida de ação sistêmica a base de piraclostrobina por 3 minutos. Após os tratamentos, eles foram imersos em solução bacteriana por 30 minutos, sendo plantados em seguida em tubetes contendo substrato (PEREIRA et al., 2013). As bandejas de tubetes com volume de 180 cm³ cada, foram mantidas sob ambiente protegido por um período de aproximadamente 30 dias, para que ocorresse a brotação das gemas.

4.2.2.4. Avaliações

A partir do décimo dia após o plantio dos minitoletes, foram registradas a cada três dias, o número de mudas brotadas, com parte aérea formada, até o vigésimo dia quando houve estabilização da emergência, para determinação do Índice de Velocidade de Emergência (IVE), aqui chamado de Índice de Velocidade de Brotação (IVB). Esse foi calculado pela fórmula proposta por Maguire (1962): $IVB = E1/N1 + E2/N2 + \dots + En/Nn$ Onde: IVB = índice de velocidade de brotação. E1, E2,... En = número de plântulas normais computadas na primeira contagem, na segunda contagem e na última contagem. N1, N2,... Nn = número de dias da sementeira à primeira, segunda e última contagem. O trabalho contou com três repetições, sendo cada uma delas representada por 54 minitoletes.

Pela importância prática, avaliou-se a facilidade com que as mudas foram retiradas do tubete. Foram atribuídas, empiricamente, notas de 5 a 10 para a retirada das mudas, sendo as maiores notas para as mudas que permaneceram com o torrão firme e se soltaram facilmente. Já as menores notas foram atribuídas às mudas que apresentaram dificuldade para saírem do tubete e/ou o torrão não saiu íntegro.

Já para outras variáveis, aos 30 dias após a sementeira foram escolhidas nove mudas ao acaso e foi realizada uma única avaliação. Na oportunidade avaliaram-se a altura de parte aérea e o comprimento das raízes em centímetros (cm), medindo-se as mesmas com uma régua, o diâmetro do colmo em milímetros (mm) foi realizado com o auxílio de um paquímetro, na região mediana do primeiro nódo formado e a massa fresca das mudas (g) foi determinada em balança de precisão de 0,1 gramas. Em seguida, as mudas foram acondicionadas em sacos de papel e levadas à estufa, onde permaneceram por 48 horas sob a temperatura de 60°C para secagem e após foram feitas pesagens para avaliação da massa seca (g) das mesmas.

Para avaliação do teor de nitrogênio das mudas de cana-de-açúcar, as plantas secas foram passadas em malha de 2mm de um moinho de facas e em seguida, foram enviadas ao Laboratório de Pesquisa em Biotransformações de Carbono e Nitrogênio (Labcen), vinculado ao Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria.

4.2.2.5. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, à homocedasticidade pelo teste de Hartley e a independência dos resíduos foi verificada graficamente. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$) e para algumas variáveis foi necessário ser feita a retirada de dados atípicos. Em caso de significância estatística, compararam-se os efeitos das variedades pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), da inoculação pelo teste t ($p \leq 0,05$) e dos substratos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) comparando com a testemunha (substrato comercial).

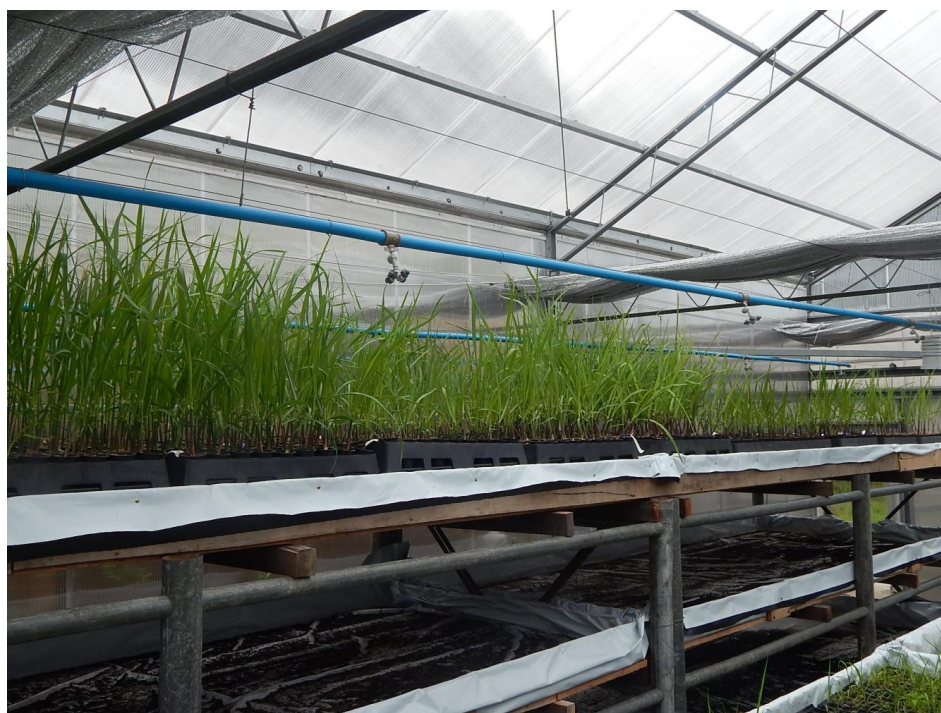


Figura 5 – Visão geral do experimento de mudas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas em ambiente protegido. (Foto: Ester Schiavon Matoso)

4.2.3. Experimento 3: desempenho de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas

O experimento foi desenvolvido de dezembro de 2015 a setembro de 2016, em uma propriedade rural localizada no Monte Bonito, interior do município de Pelotas, com latitude de 52°22'10" Oeste e 32°41'08" Sul e altitude de 50 metros.

4.2.3.1. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com três repetições, onde cada parcela foi representada por três linhas de três metros. Cada uma das linhas possuía sete plantas, espaçadas entre si em 0,5m e o espaçamento utilizado entre as linhas foi de 1,4m. No entanto, para fins de avaliação foi considerada apenas a linha do meio, sendo essa a área útil da parcela e as outras linhas utilizadas como bordaduras, que servem para evitar qualquer influência dos tratamentos aplicados nas parcelas vizinhas. Adotou-se o esquema trifatorial entre as variedades de cana-de-açúcar, os substratos utilizados na produção e aclimação das mudas e a inoculação de bactérias diazotróficas, sendo os tratamentos, os mesmos do primeiro experimento.

4.2.3.2. Produção e aclimação das mudas

As mudas de cana-de-açúcar foram provenientes de toletes de uma gema previamente tratados e inoculados com bactérias diazotróficas, que foram plantados em tubetes contendo diferentes substratos para brotação e crescimento. Após cerca de 30 dias mantidas em casa de vegetação climatizada, as mudas foram transferidas para tela de sombreamento (sombrite), para que ocorresse a primeira fase da aclimação e em seguida elas foram deixadas a céu aberto para finalizar a aclimação em pleno sol, num total de 15 dias.

4.2.3.3. Preparo do solo, adubação e calagem

O preparo do solo foi feito mecanicamente através de aração e gradagem para uniformizar o terreno e em seguida efetuou-se a abertura dos sulcos para plantio das mudas. De acordo com as recomendações oficiais de adubação e de

calagem adotadas nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO, 2004) foram adicionados manualmente, calcário dolomítico (PRNT 100%), superfosfato triplo e cloreto de potássio e em seguida os sulcos foram fechados para incorporação dos fertilizantes.

Anteriormente foi feita amostragem de solo com trado de rosca, em 10 pontos da área experimental, para fins de análise e possíveis correções. A análise de solo foi feita no Laboratório de Fertilidade do Solo da Embrapa Clima Temperado e os resultados da mesma se encontram na tabela 3.

Tabela 3 - Análise de solo da área experimental, localizada no Monte Bonito, interior de Pelotas, RS.

pH água	Índice SMP	Classe Textural	Argila -----%-----	M.O.	P	K	Na	S	Ca	Mg	H+Al	Al
								----- mg.dm ⁻³ -----				----- cmol _c .dm ⁻³ -----
5,5	5,7	4	19	1,9	2,9	70	--X--	--X--	1,4	0,7	6,3	0,4

4.2.3.4. Transplante de mudas e adubação de cobertura

As mudas foram transplantadas para o campo no final do mês de dezembro, sendo essa uma época tardia para o plantio no RS, que apresenta altas temperaturas e baixo volume de chuva nesse período. Devido a isso, foi necessário efetuar uma adubação de cobertura uréia cloretada, para ajudar no desenvolvimento inicial das plantas. Adicionou-se menos de 20% da dose de nitrogênio recomendada para a cultura, o que provavelmente não interferiu na avaliação da fixação biológica feita pelas bactérias associadas às plantas.

4.2.3.5. Precipitação, temperatura e evapotranspiração

Para efetuar a medição da precipitação na área experimental foi utilizado um comumente encontrado no comércio especializado em agricultura, que mede a chuva em milímetros por metro quadrado e possui uma boca de recepção de chuva de 15 centímetros quadrados, (5cm x 3cm = 15cm²). Já os dados de temperatura (°C) e Evapotranspiração (mm) foram atribuídos da estação meteorológica da Embrapa Clima Temperado.

Tabela 4 - Médias mensais de temperatura mínima, média e máxima (°C), evapotranspiração e precipitação (mm) da região de Pelotas, no Rio Grande do Sul, durante o período compreendido entre janeiro e setembro de 2016.

Meses	T min.	T média	T máx.	ET (mm)	Precipitação (mm)
Janeiro	19,2	23,5	29	4,15	161,2
Fevereiro	20	24,3	30,2	4,39	146,3
Março	17,3	20,9	25,3	2,35	321,5
Abril	16,9	19,8	23,8	1,69	339
Mai	10,8	13,6	17,5	1,3	153,8
Junho	7,5	10,6	15,3	1,49	29,4
Julho	9	12,6	17	1,4	131
Agosto	10,1	14,3	19,7	2,24	267,6
Setembro	10,3	13,9	18,6	2,69	141,6

4.2.3.6. Manejo de plantas daninhas

O manejo das plantas daninhas na área experimental foi feito através da passagem de enxada rotativa entre as linhas de plantio, capinas nas linhas e duas aplicações de 400 mL ha⁻¹ de herbicida seletivo e pós-emergente a base de Mesotriona.

4.2.3.7. Pragas e doenças

Não houve ataques severos de pragas e doenças durante o período de experimento, foi necessário apenas o controle de formigas cortadeiras com formicida granulado logo após o transplante das mudas. E ainda observou-se a ocorrência de ferrugem, mancha anelar e mancha parda nas folhas entre os meses de maio e julho, nos quais ocorre um maior acúmulo de água na planta devido à baixa temperatura, incidência de radiação solar e consequente baixa evapotranspiração.

4.2.3.8. Avaliações

No período compreendido entre o transplante das mudas e a colheita do experimento, foi feito um acompanhamento da área foliar e do teor de clorofila das plantas, através de avaliações feitas aos 60, 120 e 240 dias, ou seja, após o estabelecimento, na fase de perfilhamento máximo e antecipando a colheita. E ainda, aos 120 dias foi avaliado o perfilhamento das plantas, através da contagem do número de ramos laterais.

O teor de clorofila foi observado na porção intermediária das folhas +3, através do medidor de clorofila ClorofiLOG, da marca FALKER, modelo CFL 1030. Esse equipamento usa três faixas de frequência de luz, permitindo uma análise detalhada que pode ser visualizada instantaneamente ou armazenada no computador. A medição ótica analisa a absorção de luz pela folha, indicando a presença de clorofila em valores SPAD (Soil Plant Analysis Development).

A área foliar foi estimada a partir de contagens do número de folhas e medidas de comprimento e largura das folhas de um perfilho. Em seguida, os valores foram inseridos na equação descrita por Hermann; Câmara (1999), onde $AF = [C \times L \times 0,75 \times (NF + 2)]$. A fórmula leva em consideração o comprimento (C) e a largura (L) também da folha +3 e o número de folhas abertas com pelo menos 20% de área verde na planta (NF).

Aos 240 dias após o transplante foi feita a colheita do experimento manualmente. Na oportunidade foram pesadas duas touceiras de cana-de-açúcar por parcela, a fim de estimar a partir do peso de cana por metro linear, a produção de biomassa da parte aérea total por hectare. Também avaliou-se a porcentagem de massa seca, o acúmulo de nitrogênio de cada um dos tratamentos e para quantificar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio, foi efetuada a quantificação do ^{15}N , em espectrômetro de massas (IRMS) interfaceado com um analisador elementar de N, conforme método descrito em BARRIE; PROSSER (1996).

As amostras de folhas e colmos foram trituradas individualmente em um triturador de galhos e resíduos orgânicos, da marca Trapp, modelo TR 200. Amostras representativas foram pesadas e levadas à estufa, onde permaneceram a 60° até que estivessem totalmente secas. Após este período, que levou em torno de sete dias, as amostras foram homogeneizadas, pesadas para a obtenção da massa seca (%) e trituradas, porém dessa vez em moinho de facas, até atingir o tamanho de partícula ideal para análises em laboratório.

4.2.3.9. Análise estatística

Assim como no experimento anterior, foi efetuada a análise de pressupostos nos dados (normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, homocedasticidade pelo teste de Hartley e a independência dos resíduos foi verificada graficamente). Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Em

caso de significância estatística, compararam-se os efeitos pelo teste de Tukey, da inoculação pelo teste t e dos substratos pelo teste de Tukey e pelo teste de Dunnett comparando com a testemunha (substrato comercial), todos os testes ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).



Figura 6 - Transplante de mudas de cana-de-açúcar no Monte Bonito, interior de Pelotas, RS. (Foto: Ester Schiavon Matoso)

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Experimento 1: sobrevivência das estirpes de bactérias diazotróficas nos substratos para plantio

Após uma semana de ensaio não se observou diminuição significativa de nenhuma espécie de bactérias nos substratos. Apenas ocorreu uma leve queda na população de *Herbaspirillum seropedicae* no substrato comercial e de *Burkholderia tropica* no substrato 100% composto orgânico (Figura 8).

A estirpe PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a partir da segunda contagem apresentou uma diminuição significativa na população em todos os substratos. Já as outras espécies se encontravam em grande quantidade em todos os substratos, até a terceira contagem.

A espécie *B. tropica* apresentou uma menor população nas primeiras quatro contagens no substrato contendo apenas composto orgânico e o mesmo aconteceu com a *H. seropedicae*, porém, apenas nas três últimas contagens. Neste substrato, notou-se uma diferente consistência em relação à adição de água, mais úmida. Esta consistência conferiu maior anaerobiose, o que resultou numa menor população de todas as bactérias diazotróficas inoculadas desde a primeira contagem.

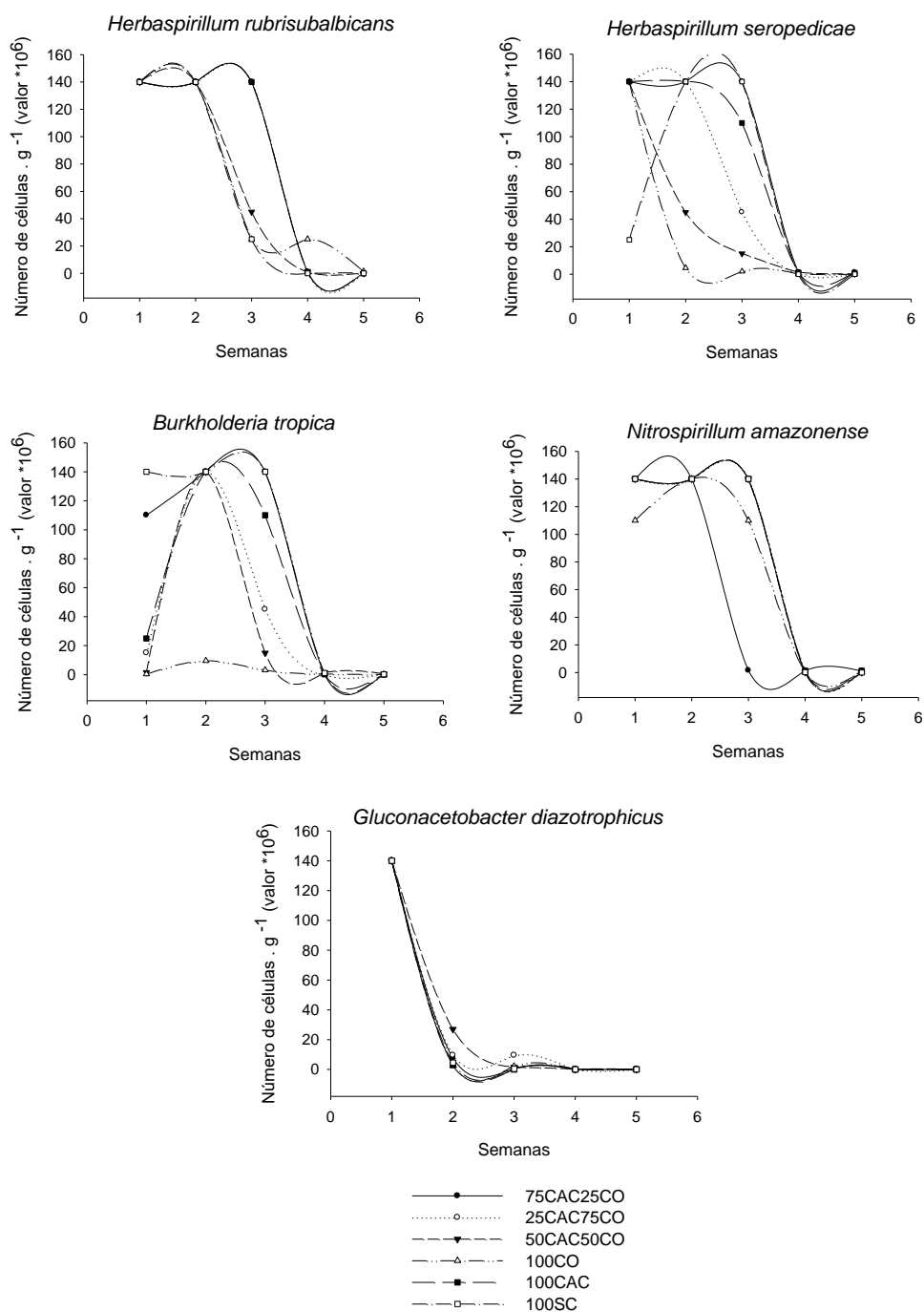


Figura 7 - Sobrevivência de bactérias diazotróficas inoculadas individualmente em diferentes substratos ao longo de cinco semanas.

Quando inoculadas em mistura, a espécie *Burkholderia tropica* apresentou uma queda em sua população em substrato comercial, a partir da primeira contagem (Figura 9).

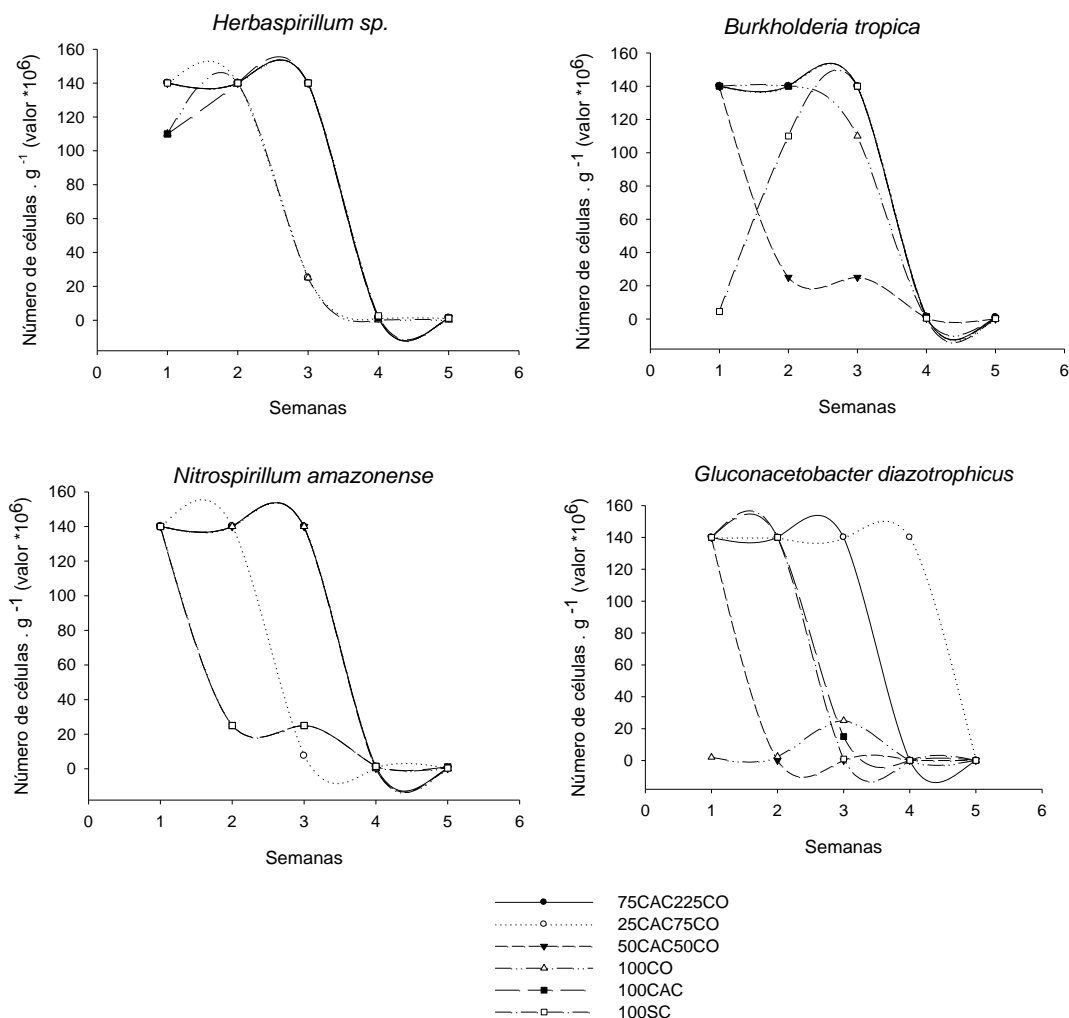


Figura 8 - Sobrevivência de bactérias diazotróficas inoculadas em mistura em diferentes substratos ao longo de cinco semanas.

A *Gluconacetobacter diazotrophicus* também diminuiu, porém, a partir da segunda contagem nos substratos 100CAC, 100CO e 100SC. E as demais espécies apresentaram bom comportamento nos substratos, até a terceira semana.

Pandey; Maheshwari, (2007) estudando uma bioformulação contendo diferentes espécies bacterianas como *Burkholderia sp*, estirpe MSSP, *Sinorhizobium meliloti* estirpe PP3, *Rhizobium leguminosarum* estirpe Pec e *Bacillus sp.* estirpe B1, verificaram que, a presença de outras bactérias na bioformulação não promoveu

efeito deletério para a viabilidade da estirpe MSSP de *Burkholderia* sp., o que leva a crer que o que causou a diminuição da espécie no estudo, seja alguma característica dos materiais utilizados.

Embora a sobrevivência de células em substratos utilizados como veículo de bactérias esteja relacionado com a composição do substrato e o metabolismo celular de cada microrganismo, devem ser consideradas as características de cada microrganismo no processo de maturação e estocagem do inoculante (ROUGHLEY; VINCENT, 1967).

Dentre os veículos de inoculação de bactérias diazotróficas, o turfoso é considerado o mais utilizado no Brasil. A turfa possibilita a viabilidade de um grande número de células e ao selecionar o veículo turfoso, para inoculante com estirpes previamente selecionadas de *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 (BR11417) e *Burkholderia* spp. Estirpe M130 (BR11340) e a associação de molibdênio, Guimarães; Baldani; Jacob-neto (2013) verificaram que o número de células viáveis ficou em torno de 10^8 células g^{-1} ou mL^{-1} aos 110 dias de armazenamento, confirmando que o tipo de matéria-prima no veículo está intimamente relacionado ao tempo em que as bactérias sobrevivem no mesmo.

A partir da quarta contagem, cerca de 30 dias após a inoculação, a população de bactérias inoculadas reduziu drasticamente, apontando que não é mais um bom momento para plantio de mudas. Nesta contagem, não foi mais detectada a *Gluconacetobacter diazotrophicus* em mistura, nem nos substratos 75CAC25CO, 25CAC75CO, 50CAC50CO E 100CAC, mas foi verificada em baixa concentração no substrato 100CO. A *Burkholderia tropica* também não foi verificada no substrato 75CAC25CO, embora estivesse na mistura.

Essa diminuição de algumas estirpes ao se aproximar dos 30 dias, que é verificada em maior parte nos substratos contendo composto orgânico, pode ser explicada, provavelmente pela presença de alguns microrganismos antagônicos, como o que foi encontrado por Figueiredo et. al. (1992). E trabalhos realizados por Roughley; Vincent (1967) e Burton (1991) comentam que, dependendo da característica dos veículos, tanto valores altos como baixos de umidade podem interferir na população antagônica pela competição de nutrientes, porém a níveis mais baixos são menos favorecidos. Existe uma relação bem definida entre a taxa de morte da bactéria e a taxa de perda de água do material.

4.3.2. Experimento 2: desempenho de mudas inoculadas com bactérias diazotróficas em casa de vegetação

Com a aplicação do teste F na análise da variância, identificou-se a significância da interação trifatorial (variedades x substratos x inoculação) para todas as variáveis avaliadas. Assim, os efeitos isolados dos fatores foram desconsiderados e analisaram-se detalhadamente as interações (Tabelas 5 até 12).

A inoculação de bactérias diazotróficas promoveu aumentos significativos no índice de velocidade de brotação (IVB) das quatro variedades estudadas (Tabela 5). Sendo que sem a inoculação, as variedades RB92579 e RB975932 obtiveram valores de IVB superiores à RB867515 e RB966928, e quando associadas às bactérias a diferença de brotação entre as variedades diminuiu. Isto mostra que as variedades RB867515 e RB966928 responderam mais à inoculação. Essas obtiveram um aumento de cerca de 50% no IVB quando inoculadas, enquanto que, nas demais o aumento não passou de 20%.

Resultados semelhantes em relação ao aumento da brotação de toletes da variedade RB867515 submetidos à inoculação mista de bactérias, foram encontrados por Chaves et al. (2015). Para a RB966928, Matoso et al. (2016) encontraram resultados promissores com a inoculação das estirpes de bactérias individualmente, onde a espécie *Herbaspirillum rubrisubalbicans* proporcionou maior aumento no IVB da variedade. Essa modificação na velocidade de obtenção de mudas é extremamente desejável, tendo em vista que o plantio de cana-de-açúcar atualmente preconiza a utilização de mudas pré-brotadas (LANDELL et al., 2012), ainda mais em variedades de alta importância econômica como as duas mais plantadas no país.

A interação entre plantas e microrganismos é determinada em parte pelo genótipo da planta (OLIVEIRA et al., 2006), portanto, é bastante provável que diferenças genéticas entre as variedades tenham modificado a resposta das plantas, uma vez que a inoculação e o cultivo dessas deram-se em condições idênticas.

Tabela 5 - Índice de velocidade de brotação (IVB) de mudas de cana-de-açúcar em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas^{1/}.

Substrato	RB867515		RB966928		RB92579		RB975932	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
	IVB							
Comercial	6,21	9,78	10,25	14,71	13,99	15,79	17,46	17,73
75CAC25CO	1,53 aB * ^α	7,80 aA ^α	2,67 aB * ^α	9,05 aA ^α	10,23 aA * ^β	14,19 aA ^α	10,89 cA * ^α	14,33 bA ^α
50CAC50CO	3,02 aB * ^α	8,09 aB ^α	3,28 aB * ^α	7,76 aB ^α	11,98 aA * ^β	16,17 aA ^β	13,80 bA ^{ns α}	16,88 aA ^β
25CAC75CO	3,50 aB * ^α	7,26 bB ^α	6,46 aB ^{ns β}	9,72 aB ^α	11,76 aA * ^β	15,78 aA ^β	17,19 aA ^{ns β}	16,25 aA ^β
CV (%)	11,9							

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando os substratos dentro de cada variedade e inoculação e as variedades dentro de cada substrato e inoculação, respectivamente. *,^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando a inoculação dentro de cada substrato e variedade. ^{α, β} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) comparando com a testemunha (substrato comercial).

Outros diversos fatores podem influenciar a brotação da cana, dentre eles, a temperatura e a umidade, além dos genéticos e fisiológicos como variedade, idade, tamanho e sanidade das gemas (SERAFIM et al., 2012) e também fitotécnicos, como o corte e preparo dos minitoletes. Este fato explica a diferença entre os substratos utilizados no trabalho, onde os maiores índices de brotação foram observados, para maior parte das variedades, na testemunha (substrato comercial) e nas misturas contendo 50 e 75% de composto orgânico. Esses materiais possuem uma maior retenção de água, promovendo umidade aos toletes durante o processo de brotação das gemas.

O período compreendido entre a semeadura ou plantio e a emergência das plântulas representa uma das fases críticas do ciclo de plantas, de modo que a uniformidade e a porcentagem de emergência assumem grande importância na produção e qualidade final do produto. A água é o fator que exerce a mais determinante influência sobre o processo de germinação de sementes e brotação de gemas (CARVALHO; NAKAGAWA, 1983), devendo estar disponível num teor adequado. E enquanto o sistema radicular se desenvolve, o solo é o responsável por manter as condições ideais para o desenvolvimento das plantas (MAGRO et al., 2011; MANHÃES et al., 2015), o que se aplica também ao substrato.

A casca de arroz carbonizada nas misturas também é importante para a brotação das gemas de cana-de-açúcar, pois sua presença aumenta a porosidade e deixa o substrato mais leve, diminuindo a resistência da camada superficial ao rompimento pelos brotos primários. Segundo Kämpf (2001), é imprescindível buscar valores entre 75 e 90% de porosidade, pois essa propriedade é responsável pelas trocas gasosas, bem como pela movimentação de água no recipiente. Além disso, a utilização deste material na composição de substratos influencia também na sobrevivência das bactérias diazotróficas, que como se pôde observar, promoveu um aumento no IVB das gemas. Por isso, conhecer a interação do substrato com as bactérias é essencial para o sucesso da produção de mudas de cana-de-açúcar inoculadas.

Na tabela 6 estão apresentadas as médias de altura de parte aérea das mudas de cana-de-açúcar, aos 30 dias após o plantio dos minitoletes. Na avaliação a variedade RB92579 apresentou mudas mais altas em relação às demais, as quais não diferiram estatisticamente umas das outras.

Tabela 6 - Altura de parte aérea (cm) de mudas de cana-de-açúcar em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas^{1/}.

Substrato	RB867515		RB966928		RB92579		RB975932	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Altura de parte aérea (cm)								
Comercial	49,00	59,67	65,67	70,11	85,78	100,78	72,67	60,22
75CAC25CO	48,67 aB ^{nsβ}	52,39 aB ^β	51,22 bB ^{nsα}	52,56 bB ^α	82,11 aA ^{*β}	96,00 aA ^β	54,67 aB ^{nsα}	60,00 aB ^β
50CAC50CO	52,33 aB ^{nsβ}	53,78 aC ^β	65,67 aB ^{nsβ}	70,11 aB ^β	84,89 aA ^{nsβ}	89,78 aA ^α	58,44 aB ^{nsα}	63,11 aB ^β
25CAC75CO	48,67 aB ^{nsβ}	52,39 aC ^β	52,89 bB ^{*α}	67,89 aB ^β	71,67 bA ^{*α}	85,67 aA ^α	58,78 aB ^{nsα}	57,78 aC ^β
CV (%)	15,9							

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando os substratos dentro de cada variedade e inoculação e as variedades dentro de cada substrato e inoculação, respectivamente. *,^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando a inoculação dentro de cada substrato e variedade. ^{α,β} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) comparando com a testemunha (substrato comercial).

Os tratamentos dessa variedade nos substratos 25CAC75CO e 75CAC25CO responderam à inoculação de bactérias, assim como a RB966928 no substrato 25CAC75CO, sendo, portanto, as mudas com inóculo mais altas que as do controle sem inoculação. Nos demais tratamentos não houve resultados significativos frente à inoculação de bactérias diazotróficas.

Este aumento na parte aérea da variedade RB92579 em relação à inoculação de bactérias foi confirmado por Chaves (2014). Apesar da altura das plantas de cana-de-açúcar ser uma característica genética, está sujeita a influência ambiental (SUGUITANI, 2006), portanto, a muda pode sofrer mudanças de acordo com as condições em que se encontra.

Em relação ao substrato, os tratamentos envolvendo a variedade RB867515 não apresentaram diferença entre si, tanto sem, quanto com inoculação. Nas demais variedades foram observadas algumas diferenças, sendo as mudas da RB966928 sem e com inoculação, assim como da RB92579 sem inoculação, maiores no substrato 50CAC50CO e na testemunha. Essa última, quando inoculada apresentou mudas maiores no substrato 75CAC25CO e na testemunha. Já a RB975932, sem inoculação apresentou melhor resultado apenas na testemunha, e quando inoculada, as alturas foram semelhantes em todos os substratos.

Os parâmetros biométricos de mudas de cana-de-açúcar produzidas a partir de minitoletes têm sido estudados por diversos autores, uma vez que, ainda não se sabe qual deles serve como atestado de qualidade para as mudas. Mas o potencial de acúmulo de sacarose por plantas de cana-de-açúcar está mais relacionado às medidas de dimensões lineares, como a altura e o diâmetro do colmo (MARAFON et al., 2012), por isso, são também importantes na fase inicial de muda.

A disponibilidade de nutrientes também está diretamente ligada ao desenvolvimento de parte aérea, confirmando a importância do substrato na produção de mudas. Santi et al. (2016) encontraram diferenças entre as alturas de mudas de RB867515 em diferentes substratos comerciais e De Marco et. al. (2016) constataram que substratos contendo casca de arroz carbonizada e composto orgânico, quando comparados com o substrato comercial Turfa Fértil, promovem maior crescimento na parte aérea de mudas desta variedade, assim como da RB975932.

Dentro deste mesmo âmbito, a inoculação de bactérias diazotróficas também promove o crescimento das mudas de cana-de-açúcar, pois torna os nutrientes mais

disponíveis para as plantas, além de produzir reguladores de crescimento. Embora neste trabalho, diante das interações entre as variedades e substratos, a inoculação tenha apresentado pouco resultado na promoção de crescimento da parte aérea das mudas.

Na avaliação do diâmetro do colmo (Tabela 7) as diferenças foram encontradas entre as variedades e substratos de plantio sem inoculação, sendo os maiores valores apresentados pelas mudas da variedade RB975932 em todos os substratos, assim como da RB92579 nos substratos 75CAC25CO, 50CAC50CO e na testemunha, da RB966928 no 25CAC75CO e testemunha e da RB867515 no 50CAC50CO e testemunha. E quando submetidas à inoculação não houve diferenças entre os tratamentos.

Segundo Landell; Silva (2004) o diâmetro de colmos é um dos principais componentes analisados para a formação do potencial agrícola, pois está relacionado à produtividade. E quando estamos falando de mudas, esta importância está ligada ao potencial de sobrevivência no campo após o transplante, estabelecimento do stand e conseqüentemente, produtividade desta muda no futuro.

Os substratos não tiveram grande influência sobre o diâmetro dos colmos, e onde houve diferença entre eles, os maiores valores foram encontrados nas mudas brotadas no substrato comercial e no 25CAC75CO. E a inoculação de bactérias diazotróficas não resultou no aumento do diâmetro dos colmos das mudas, porém, tornou os tratamentos mais uniformes, o que é desejável no plantio de cana-de-açúcar a partir de mudas (XAVIER et al., 2014).

O comprimento e a superfície das raízes podem controlar fatores de absorção de água e nutrientes, por isso é importante quantificá-los. No experimento foi medido apenas o comprimento das raízes das mudas de cana-de-açúcar, em centímetros, e os valores estão apresentados na tabela 8.

As variedades apresentaram diferenças entre si, conforme o substrato de plantio. Sem inoculação os maiores comprimentos de raízes foram encontrados na variedade RB867515 em todos os substratos, assim como na RB966928 no substrato 25CAC75CO, na RB92579 nos substratos 75CAC25CO e 50CAC50CO e a RB975932 nos substratos 75CAC25CO e 25CAC75CO. E com inoculação, os resultados superiores foram apresentados pela RB966928 quando em substrato 25CAC75CO, pela RB92579 nos substratos 25CAC75CO e 50CAC50CO e pela RB975932 em todos os substratos.

Tabela 7 - Diâmetro do colmo (mm) de mudas de cana-de-açúcar em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas^{1/}.

Substrato	RB867515		RB966928		RB92579		RB975932	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Diâmetro do colmo (mm)								
Comercial	5,82	4,88	6,83	5,71	6,13	4,74	6,62	4,11
75CAC25CO	5,10 aB ^{ns β}	5,25 aA ^β	5,29 bB ^{* α}	4,56 aA ^β	5,45 aAB ^{ns β}	4,55 aA ^β	6,27 aA ^{* β}	5,16 aA ^β
50CAC50CO	5,58 aA ^{ns β}	5,66 aA ^β	5,79 bB ^{* α}	4,96 aA ^β	6,49 aA ^{* β}	5,42 aA ^β	6,25 aA ^{* β}	5,15 aA ^β
25CAC75CO	5,08 aB ^{ns β}	5,22 aA ^β	6,21 aAB ^{ns β}	5,16 aA ^β	5,41 aB ^{ns β}	4,56 aA ^β	6,71 aA ^{* β}	4,86 aA ^β
CV (%)	17,1							

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando os substratos dentro de cada variedade e inoculação e as variedades dentro de cada substrato e inoculação, respectivamente. ^{*}, ^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando a inoculação dentro de cada substrato e variedade. ^α, ^β Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) comparando com a testemunha (substrato comercial).

Tabela 8 - Comprimento de raízes (cm) de mudas de cana-de-açúcar em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas^{1/}.

Substrato	RB867515		RB966928		RB92579		RB975932	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Comprimento de raízes (cm)								
Comercial	20,67	28,11	16,89	29,33	13,22	40,44	13,67	22,67
75CAC25CO	18,90 aA ^{* β}	24,67 aB ^β	13,56 bB ^{* β}	20,67 bB ^β	17,78 aAB ^{ns β}	21,56 bB ^α	19,33 aA ^{* α}	36,89 abA ^α
50CAC50CO	17,89 aA ^{* β}	24,67 aB ^β	12,99 bB ^{* β}	19,79 bB ^β	17,44 aA ^{* β}	41,89 aA ^β	14,78 aB ^{* β}	41,00 aA ^α
25CAC75CO	17,00 aAB ^{ns β}	21,44 aB ^β	20,67 aA ^{* β}	34,89 aA ^β	13,22 aB ^{* β}	26,78 bAB ^α	16,33 aAB ^{* β}	27,55 bAB ^β
CV (%)	29,7							

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando os substratos dentro de cada variedade e inoculação e as variedades dentro de cada substrato e inoculação, respectivamente. ^{*}, ^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando a inoculação dentro de cada substrato e variedade. ^α, ^β Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) comparando com a testemunha (substrato comercial).

Nota-se que todas as variedades tiveram suas raízes maiores quando inoculadas com as bactérias diazotróficas, muito embora, estatisticamente as variedades RB867515 no substrato 25CAC75CO e a RB92579 não tenham diferido dos controles sem inoculação. A RB867515 já é conhecida como uma variedade que responde à inoculação de bactérias diazotróficas (SCHULTZ et al. 2012; PEREIRA et al., 2013) e a RB92579 também tem apresentado resultados promissores quanto à emissão de raízes e crescimento de mudas inoculadas (CHAVES, 2014).

O comportamento das raízes das mudas nos substratos variou conforme a variedade de cana-de-açúcar, provavelmente porque, cada um dos materiais tem as suas necessidades e cada substrato a sua disponibilidade de nutrientes. A baixa disponibilidade de nutrientes no substrato restringe o crescimento e desenvolvimento das plantas. Por isso, as plantas desenvolveram mecanismos para conviver com este tipo de estresse, que incluem modificações na arquitetura do sistema radicular. As alterações das raízes modificam a capacidade de exploração do solo ou substrato e, portanto, o potencial para extração de nutrientes (SILVA; DELATORRE, 2009).

De forma geral, maior comprimento radicular proporciona melhores condições de absorção de água e nutrientes, e a limitação de nitrogênio, por exemplo, leva ao crescimento das raízes laterais e conseqüentemente raízes principais mais curtas. Isto pode ser observado nos substratos utilizados, pois o comercial e o 25CAC75CO por serem os que apresentam maior teor de nutrientes (Tabela 2), foram onde, na maioria das variedades, observamos as raízes de maior comprimento, porém, sem desenvolvimento lateral. No entanto, nos substratos contendo maior teor de casca de arroz carbonizada, as mudas desenvolveram raízes mais volumosas e mais estruturadas no tubete o que resultou em torrões íntegros (Figura 9; Tabela 9).

Foram atribuídas notas quanto à facilidade ou dificuldade que as mudas apresentaram na saída dos tubetes. Foi considerado muito satisfatório os substratos que apresentaram nota 9 ou acima, sendo necessária pouca força para retirar a muda do tubete e o torrão permaneceu íntegro, como as variedades RB92579 e RB975932 nos substratos 75CAC25CO e 50CAC50CO tanto com, quanto sem inoculação (Figura 10) e as variedades RB867515 e RB966928 apenas quando inoculadas.

Tabela 9 - Avaliação quanto à dificuldade de retirada das mudas do tubete em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas^{1/}.

Substrato	RB867515		RB966928		RB92579		RB975932	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Retirada do tubete (notas)								
Comercial	5,0	5,0	6,0	6,0	7,0	5,0	6,0	7,0
75CAC25CO	7,0aB * ^α	9,0aB ^α	8,0aAB * ^α	9,0aB * ^α	8,7aA * ^α	10,0aA ^α	8,7aA * ^α	10,0aA ^α
50CAC50CO	7,0aB * ^α	9,0aA ^α	7,7aAB * ^α	9,0aA * ^α	8,0aA * ^α	9,0aA ^α	8,0abA * ^α	9,7aA ^α
25CAC75CO	5,0bC * ^β	6,0bC ^α	6,0bB ^{ns β}	6,0bC ^β	6,7bAB ^{ns β}	7,0bB ^α	7,0bA * ^α	8,0bA ^α
CV (%)	3,1							

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando os substratos dentro de cada variedade e inoculação e as variedades dentro de cada substrato e inoculação, respectivamente. *,^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando a inoculação dentro de cada substrato e variedade. ^{α, β} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) comparando com a testemunha (substrato comercial).

As mudas com maior desenvolvimento de raízes laterais apresentaram maior facilidade para retirada do tubete e as mudas com maior comprimento de raiz não mantiveram o torrão íntegro. As menores notas foram atribuídas para os tratamentos com maior concentração de composto orgânico, assim como o substrato comercial, e para as duas últimas variedades sem a inoculação de bactérias diazotróficas. Este fato reforça a importância de uma alta porosidade, proporcionada pela presença de casca de arroz carbonizada no substrato (FREITAS et al., 2013).



Figura 9 - Desenvolvimento de raízes de mudas de cana-de-açúcar (Var. RB92579) no substrato 75CAC25CO, inoculadas com bactérias diazotróficas. (Fotos: Ester Schiavon Matoso)



Figura 10 - Mudanças da variedade RB92579 em diferentes substratos, com (à esquerda) e sem (à direita) inoculação de bactérias diazotróficas. (Foto: Ester Schiavon Matoso)

O mesmo foi avaliado por Lima (2016), ao testar resíduos da indústria sucroenergética como componentes de substratos para produção de mudas da variedade RB965902. O autor encontrou os piores resultados de retirada de torrões do tubete, nos tratamentos contendo maior concentração de cinzas, que possui partículas muito pequenas e conseqüentemente, resultou em uma baixa porosidade do substrato.

O resultado de uma boa condição de raízes reflete na parte aérea das plantas e isto foi visto na altura das mudas e ainda pode ser observado na massa fresca (Tabela 10). Nos tratamentos em que as raízes se desenvolveram melhor, também se obteve mudas mais altas e com maior massa fresca, ou seja, mudas com parte aérea mais desenvolvida.

Estes resultados promissores quanto à massa fresca das mudas foram observados na variedade RB92579 em todos os substratos, com e sem inoculação, assim como na variedade RB975932, com exceção do substrato 50CAC50CO. A RB966928 também apresentou mudas bem desenvolvidas quando inoculadas e nos substratos 25CAC75CO e 50CAC50CO. Já a RB867515 obteve os piores resultados, em todos os substratos, entretanto, foi a que mais respondeu à inoculação de bactérias. Em todos os substratos, a variedade quando inoculada se sobressaiu aos controles sem inoculação.

Oliveira et al. (2002) ao inocularem diferentes espécies de bactérias diazotróficas, isoladas e em mistura, em mudas de cana-de-açúcar, observaram a combinação de cinco espécies de bactérias apresentam um aumento significativo no acúmulo de massa fresca. Outros autores apresentaram resultados animadores de massa fresca de mudas de cana-de-açúcar em substratos alternativos, contendo materiais (CAC e CO) semelhantes aos utilizados no trabalho (DE MARCO et al., 2016). Resultados como estes corroboram com a hipótese de que a utilização de resíduos na composição de substratos para o plantio, assim como a inoculação de bactérias proporcionam melhorias na qualidade das mudas de cana-de-açúcar. E ainda, ressaltam a importância de se conhecer a interação entre estes dois fatores e as variedades de cana.

Tabela 10 - Massa fresca total (g) de mudas de cana-de-açúcar em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas^{1/}.

Substrato	RB867515		RB966928		RB92579		RB975932	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Massa fresca total (g)								
Comercial	6,62	5,61	7,86	9,60	8,80	10,18	9,54	7,34
75CAC25CO	4,51 aB * ^α	8,09 aB ^α	4,98 aB ^{ns α}	5,15 bB ^α	7,31 bA ^{ns α}	8,55 aA ^β	6,45 aA * ^α	8,45 aA ^β
50CAC50CO	4,11 aC * ^α	7,11 aB ^β	4,30 aC * ^α	8,15 aA ^β	9,72 aA ^{ns β}	10,31 aA ^β	7,84 aB ^{ns β}	7,59 aB ^β
25CAC75CO	3,67 aB * ^α	5,39 aB ^β	5,52 aAB * ^α	8,68 aA ^β	6,41 bAB * ^α	8,51 aA ^β	6,64 aA ^{ns α}	7,01 aAB ^β
CV (%)	27,4							

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando os substratos dentro de cada variedade e inoculação e as variedades dentro de cada substrato e inoculação, respectivamente. *,^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando a inoculação dentro de cada substrato e variedade. ^{α, β} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) comparando com a testemunha (substrato comercial).

No que diz respeito ao teor de massa seca das mudas, os valores médios, em porcentagem, alcançados pelos diferentes tratamentos podem ser observados na tabela 11. Os maiores valores em mudas sem inoculação foram apresentados pelas variedades RB92579, RB975932 e RB966928 no substrato 75CAC25CO, 25CAC75CO e 50CAC50CO. No entanto, as duas últimas variedades não diferiram da RB867515, a qual apresentou o menor acúmulo de massa seca (MS), em todos os substratos.

Entre os substratos, não houve diferenças significativas, com exceção do 25CAC75CO que proporcionou maior incremento de MS à variedade RB92579 sem inoculação. E quanto à inoculação de bactérias, essa promoveu um efeito negativo no acúmulo de MS das variedades RB92579, RB975932 e RB966928. Sendo a RB867515, a única variedade a responder positivamente à inoculação. A redução no incremento de massa seca nestas variedades de cana-de-açúcar já foi observada com a inoculação das bactérias utilizadas neste estudo, inclusive na RB867515 (CHAVES et al., 2013, 2014; MARQUES JUNIOR et al., 2008; OLIVEIRA, et al., 2002), indicando que existe uma interação complexa entre as bactérias, a planta e o ambiente, podendo em alguns casos levar a resultados indesejados.

Em torno de 1% da massa seca da cana-de-açúcar é representada pelo nitrogênio, que foi quantificado nas mudas, através de um analisador elementar (Tabela 12). Mais uma vez a variedade RB867515 foi a única a responder à inoculação de bactérias diazotróficas, obtendo incrementos significativos no teor de nitrogênio quando inoculadas. Nos tratamentos sem inoculação, os teores de nitrogênio também foram superiores nesta variedade, mas a mesma não diferiu da RB866928 nos substratos 75CAC25CO e 50CAC50CO. Características ligadas ao genótipo tais como a eficiência fotossintética, exigências nutricionais e resistência às condições adversas podem apresentar influencia na eficiência da fixação de nitrogênio pelas bactérias (REIS et al., 2009).

Ao analisar o teor de nitrogênio nas mudas, com relação ao substrato utilizado, com inoculação esses não diferiram entre si. Já quando não houve a inoculação, os maiores valores de N foram encontrados na testemunha e no substrato que contém maior concentração de composto orgânico (25CAC75CO). Outro fato que pode ser explicado pela disponibilidade de nutrientes nesses materiais.

Tabela 11 - Massa seca (%) de mudas de cana-de-açúcar em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas^{1/}.

Substrato	RB867515		RB966928		RB92579		RB975932	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Massa seca (%)								
Comercial	25,56	29,29	31,09	27,51	29	27,87	29,18	25,23
75CAC25CO	21,00 aB * β	35,42 aA β	29,56 aA ^{ns} β	24,76 aA β	31,61 abA ^{ns} β	28,43 aA β	30,31 aA ^{ns} β	25,56 aA β
50CAC50CO	22,40 aB * β	30,62 aA β	30,99 aA * β	27,48 aA β	24,16 bAB * β	30,01 aA β	24,16 aAB ^{ns} β	28,57 aA β
25CAC75CO	21,06 aB * β	34,16 aA β	31,18 aAB * β	28,46 aAB β	44,83 aA * α	24,21 aAB β	34,49 aAB * β	21,68 aB β
CV (%)	26,5							

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando os substratos dentro de cada variedade e inoculação e as variedades dentro de cada substrato e inoculação, respectivamente. *^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando a inoculação dentro de cada substrato e variedade. α , β Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) comparando com a testemunha (substrato comercial).

Tabela 12 - Teor de nitrogênio (%) de mudas de cana-de-açúcar em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas^{1/}.

Substrato	RB867515		RB966928		RB92579		RB975932	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Teor de nitrogênio (%)								
Comercial	1,58	1,80	1,49	1,39	1,45	1,29	1,32	1,47
75CAC25CO	1,32 bA * α	1,60 aA β	1,53 aA ^{ns} β	1,40 aB β	1,18 aB ^{ns} β	1,16 aC β	1,24 aAB ^{ns} β	1,29 aB β
50CAC50CO	1,40 aA ^{ns} β	1,61 aA β	1,38 bA ^{ns} β	1,40 aB β	1,18 aB ^{ns} β	1,18 aC β	1,20 aB ^{ns} β	1,33 aB β
25CAC75CO	1,41 aA * β	1,88 aA β	1,28 aB ^{ns} β	1,38 aB β	1,13 aB ^{ns} α	1,24 aB β	1,16 aB ^{ns} α	1,33 aB β
CV (%)	8,4							

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando os substratos dentro de cada variedade e inoculação e as variedades dentro de cada substrato e inoculação, respectivamente. *^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando a inoculação dentro de cada substrato e variedade. α , β Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) comparando com a testemunha (substrato comercial).

3.3.3. Experimento 3: desempenho em cana-planta de variedades inoculadas com bactérias diazotróficas

Assim como no experimento 2, neste ensaio identificou-se a significância da interação trifatorial (variedades x substratos x inoculação) para todas as variáveis avaliadas, com a aplicação do teste F na análise da variância. Por isso, os efeitos isolados dos fatores foram desconsiderados e analisaram-se detalhadamente as interações (Tabelas 13 até 19). É importante salientar que, no momento do transplante das mudas para o campo, não se obteve mudas suficientes de quatro tratamentos, portanto, nesses não foi possível determinar os resultados das variáveis.

Após o período de brotação e desenvolvimento das gemas, inicia-se a emissão de colmos na planta de cana-de-açúcar que recebem a denominação de perfilhos (SILVA et al., 2004), e no caso de mudas, isto ocorre após o transplante e estabelecimento das mudas no campo. Diola; Santos (2010) descrevem que o perfilhamento inicia-se em torno de 40 dias após o plantio e pode durar até 120 dias, sendo um processo fisiológico de ramificação subterrânea contínua das juntas nodais compactadas ao broto primário. Ele proporciona ao cultivo o número de colmos necessário para uma boa produção.

Diante disto, a avaliação do número de perfilhos (Tabela 13) foi realizada aos 120 dias após o transplante (DAT) das mudas para o campo. Ao avaliar as variedades sem inoculação de bactérias diazotróficas, não houve diferenças no número de perfilhos. Enquanto, com inoculação a variedade RB867515 foi superior às demais, mas apenas no tratamento em que as mudas foram produzidas no substrato 25CAC75CO. Esse tratamento, assim como a mesma variedade no substrato 50CAC50CO foram os únicos que responderam à inoculação, com o aumento do perfilhamento em relação ao controle sem inoculação.

Em relação aos substratos em que as mudas foram produzidas, não se observou muitas diferenças entre os tratamentos, o que permite se fazer uma estimativa dos resultados dos tratamentos não determinados. Provavelmente a variedade RB867515 no substrato 75CAC25CO também responderia à inoculação de bactérias e a variedade RB966928 no substrato 50CAC50CO tanto com, quanto sem inoculação apresentaria em torno de 11 perfilhos por planta.

Tabela 13 - Número de perfilhos em plantas de cana-de-açúcar aos 120 dias após o transplante em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas^{1/}.

Substrato	RB867515		RB966928		RB92579		RB975932	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Número de perfilhos								
Comercial	8,78	11,56	11,22	11,55	8,22	8,78	9,78	16,11
75CAC25CO	nd	nd	10,89 aA ^{nsβ}	9,67 aA ^β	9,33 aA ^{nsβ}	9,89 aA ^β	11,22 aA ^{nsβ}	12,11 aA ^β
50CAC50CO	8,11 aA ^{*β}	14,56 bA ^β	nd	nd	10,11 aA ^{nsβ}	10,00 aA ^β	10,56 aA ^{nsβ}	11,22 aA ^β
25CAC75CO	9,00 aA ^{*β}	19,22 aA ^α	10,78 aA ^{nsβ}	11,11 aB ^β	9,11 aA ^{nsβ}	11,22 aB ^β	12,11 aA ^{nsβ}	13,33 aB ^β
CV (%)	32,9							

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando os substratos dentro de cada variedade e inoculação e as variedades dentro de cada substrato e inoculação, respectivamente. ^{*}, ^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando a inoculação dentro de cada substrato e variedade. ^α, ^β Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) comparando com a testemunha (substrato comercial).
nd = não determinado.



Figura 11 - Experimento de cana-planta aos: a) 60; b) 120 e c) 240 dias após o transplante. (Fotos: Ester Schiavon Matoso)

Similarmente aos resultados obtidos por Gírio (2014), verificou-se que bactérias diazotróficas influenciam positivamente na produção de perfilhos em cana-de-açúcar. Isso ocorre porque o principal nutriente utilizado pela cana no perfilhamento é o nitrogênio. O N absorvido pelas raízes ou fixado da atmosfera aumenta a atividade meristemática da parte aérea, resultando em maior perfilhamento (OLIVEIRA et al., 2007) e estes microrganismos são responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio e pelo aumento da absorção do nutriente do solo.

De forma geral, todos os tratamentos apresentaram um bom desempenho na formação de perfilhos, provavelmente devido à época do ano em que ocorreu o perfilhamento. O alto desenvolvimento da cana nos primeiros meses do ano é explicado, principalmente pelas condições de temperatura (Tabela 4) e luminosidade ótimas no período, tendo em vista que se trata de uma planta com metabolismo C4, altamente eficiente na conversão de energia luminosa em energia química através do processo fotossintético (BIONDO et al., 2011).

Além da luminosidade e da temperatura, outros fatores como umidade do solo e produção de auxinas também influenciam no perfilhamento de cana-de-açúcar (JADOSKI et al., 2010; MANHÃES et al. 2015). E o fato dos minitoletes utilizados na produção de mudas terem sido inoculados com bactérias amplamente reconhecidas como indutoras de substâncias que promovem o crescimento, explica as diferenças entre os tratamentos (CASSÁN; ANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014).

E fatores genéticos como variedade também estão intimamente ligados à emissão de perfilhos, além de interferir na resposta da cana à inoculação, o que explica apenas uma variedade ter demonstrado influência das bactérias no perfilhamento. Biondo et al., (2011) ao avaliar o perfilhamento de oito genótipos de cana-de-açúcar (RB925211, RB925345, RB965911, RB965902, RB966923, RB935581, RB975932 e RB 986419), afirmaram que o número de perfilhos variou entre os genótipos, confirmando a influência genética nesta fase do ciclo da planta.

O estudo da área foliar em variedades de cana-de-açúcar permite correlacioná-la com o seu potencial produtivo, seja em massa seca, quantidade de açúcar ou taxas de crescimento. A folha é a estrutura responsável pela produção da maior parte dos carboidratos essenciais ao crescimento e desenvolvimento dos vegetais (HERMANN; CÂMARA, 1999). Por isso foi avaliada a área foliar dos tratamentos aos 60, 120 e 240 dias após o transplante das mudas e os resultados do índice de área foliar (IAF) podem ser observados na tabela 14.

Aos 60 dias foram observadas poucas diferenças entre os tratamentos. Em relação às variedades de cana-de-açúcar sem inoculação de bactérias, os piores valores foram encontrados na RB966928 no substrato 25CAC75CO e também nas variedades RB975932 e RB92579 no substrato 50CAC50CO. E com inoculação os resultados foram semelhantes, onde os piores resultados estão atribuídos às mesmas variedades, porém, todas no substrato 25CAC75CO. Portanto, de forma geral, nesta avaliação a variedade RB867515 foi superior às demais e a inoculação não promoveu o crescimento da área foliar em nenhuma das variedades.

As variedades RB867515 e RB92579, aos 120 dias, apresentaram um crescimento semelhante, não havendo diferença no IAF dos tratamentos envolvendo estas, enquanto que a RB966928 e a RB975932 apresentaram menores índices de área foliar. Esse fato pode ser explicado por características desses materiais, que apresentam folhas mais estreitas que as outras variedades. Além disso, nesta avaliação observou-se que dois tratamentos apresentaram aumento significativo no IAF quando inoculados com bactérias diazotróficas, que foram a RB966928 quando proveniente do substrato 25CAC75CO e a RB92579 no substrato 75CAC25CO.

E no final da safra, aos 240 dias, a variedade RB867515 apresentou valores de IAF bem superiores às demais, principalmente quando inoculada com as bactérias diazotróficas. No substrato 75CAC25CO, em que não foram determinados os valores desta variedade, não houve diferença entre as demais. A inoculação promoveu o aumento significativo do IAF da variedade RB867515 em todos os substratos, da RB92579 no 50CAC50CO e da RB975932 no 25CAC75CO. Os substratos por sua vez, não apresentaram diferenças entre si, tampouco quando comparados com a testemunha. Confirmando que a sua importância se dá no desenvolvimento inicial das plantas, pois a qualidade do substrato reflete na qualidade da muda e no arranque inicial dela no campo após o transplante.

Tabela 14 - Índice de área foliar (IAF) de plantas de cana-de-açúcar aos 60, 120 e 240 dias após o transplante em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas^{1/}.

Substrato	RB867515		RB966928		RB92579		RB975932	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Índice de área foliar aos 60 dias								
Comercial	1,18	1,03	0,91	0,86	0,87	0,86	0,95	0,94
75CAC25CO	nd	nd	0,86 aA ^{ns β}	0,75 aA ^β	1,04 aA ^{ns β}	0,92 aA ^β	0,93 aA ^{ns β}	0,75 aA ^β
50CAC50CO	1,28 aA ^{ns β}	0,94 aA ^β	nd	nd	1,00 aAB ^{ns β}	0,90 aA ^β	0,88 aB ^{ns β}	0,81 aA ^β
25CAC75CO	0,97 aA ^{ns β}	1,28 aA ^β	0,63 aB ^{ns β}	0,67 aB ^β	0,83 aA ^{ns β}	0,72 aB ^β	0,97 aA ^{ns β}	0,92 aAB ^β
CV (%)	26,0							
Índice de área foliar aos 120 dias								
Comercial	2,73	2,68	2,30	2,54	2,81	2,66	1,26	1,37
75CAC25CO	nd	nd	2,28 aA ^{ns β}	2,07 bB ^α	2,18 aA ^{* β}	2,60 aA ^β	1,44 aA ^{ns β}	1,14 aB ^β
50CAC50CO	2,67 aA ^{ns β}	2,10 bA ^β	nd	nd	2,45 aA ^{ns β}	2,68 aA ^β	1,37 aB ^{ns β}	1,16 aB ^β
25CAC75CO	2,91 aA ^{ns β}	2,75 aA ^β	1,98 aB ^{* β}	2,47 aB ^β	2,57 aAB ^{ns β}	2,78 aA ^β	1,10 aB ^{ns β}	1,26 aB ^β
CV (%)	27,1							
Índice de área foliar aos 240 dias								
Comercial	3,29	4,14	2,47	2,73	3,44	3,38	2,40	3,27
75CAC25CO	nd	nd	2,44 aA ^{ns β}	1,92 aB ^α	2,46 aA ^{ns β}	2,92 aA ^β	2,74 aA ^{ns β}	2,50 aA ^α
50CAC50CO	3,16 aA ^{* β}	4,93 aA ^β	nd	nd	2,76 aA ^{* β}	3,52 aB ^β	2,61 aA ^{ns β}	2,43 aB ^α
25CAC75CO	3,26 aA ^{* β}	5,04 aA ^β	1,86 aB ^{ns β}	2,26 aB ^β	2,97 aAB ^{ns β}	3,00 aB ^β	2,08 aB ^{* β}	2,72 aB ^β
CV (%)	25,9							

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando os substratos dentro de cada variedade e inoculação e as variedades dentro de cada substrato e inoculação, respectivamente. *,^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando a inoculação dentro de cada substrato e variedade. ^{α, β} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) comparando com a testemunha (substrato comercial).

nd = não determinado

Como a fotossíntese depende da área foliar, para Pereira; Machado (1987) o rendimento da cultura será maior quanto mais rápido a planta atingir o IAF máximo e quanto mais tempo a área foliar permanecer ativa. A inoculação de bactérias diazotróficas tem um papel importante no aumento da área foliar, devido à fixação biológica de nitrogênio, pois quando há deficiência de N pode haver reduções no alongamento foliar das plantas (HAWKESFORD et al., 2012).

Leme; Maniero; Guidolin (1984) apresentaram alguns valores de IAF para cana-de-açúcar, para os autores na maturação o IAF gira em torno de 3,56 e o IAF ótimo está entre 9 e 12. Silva et al. (2001), avaliando modelos de crescimento de cana-de-açúcar, observaram vigor vegetativo elevado, com IAF atingindo 7,5 a 9,5. O valor mínimo encontrado por Machado et al. (1982) foi de 3,7, não decrescendo mais a partir deste valor. E ainda, Oliveira et al. (2004), avaliando o desenvolvimento de diversas variedades de cana-de-açúcar, encontraram valores máximos variando entre 4 e 6.

O índice de área foliar ótimo não é necessariamente o máximo índice registrado, mas aquele no qual as folhas inferiores fotossinteticamente ativas sejam mantidas ligeiramente acima do ponto de compensação. De acordo com Machado (1987), para a cana-de-açúcar, o índice de área foliar próximo a 4,0 é suficiente para interceptar 95% da radiação solar incidente. Essa diversidade de valores de IAF reflete a heterogeneidade entre variedades, condições edafoclimáticas e de manejo de cada local, confirmam Fagundes et al. (2012) e Chaves (2014) ao encontrar valores semelhantes ao do presente estudo, onde a variedade RB867515 apresentou IAF superior às demais variedades.

O teor de clorofila representado pelo índice SPAD (Tabela 15) aos 60 dias, nas variedades variou de 47 a 54 entre a RB867515, a RB966928 e a RB92579 em todos os substratos. No entanto, a RB975932 apresentou os menores valores tanto com, quanto sem inoculação de bactérias. Os valores de clorofila nessa variedade variaram entre 39 a 46. Esses resultados corroboram com Fonseca et al. (2012) que encontraram 45,12 de teor de clorofila, como valor ótimo, em folhas de cultivares do milho AGR 9010 YG, aos 61 dias.

A inoculação proporcionou o aumento do teor de clorofila da variedade RB867515 nos substratos 25CAC75CO e 50CAC50CO e da RB966928 no substrato 25CAC75CO.

Tabela 15 - Teor de clorofila (índice SPAD) em plantas de cana-de-açúcar aos 60 dias após o transplante em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas^{1/}.

Substrato	RB867515		RB966928		RB92579		RB975932	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Teor de clorofila aos 60 dias								
Comercial	52,47	51,08	49,52	42,73	49,21	48,18	39,48	47,17
75CAC25CO	nd	nd	47,89 aA ^{ns β}	48,24 bA ^β	51,37 aA ^{ns β}	53,22 aA ^β	41,62 bB ^{ns β}	43,32 bB ^β
50CAC50CO	49,92 aA ^{* β}	53,93 aA ^β	nd	nd	50,02 aA ^{ns β}	53,32 aA ^β	46,9 aB ^{ns α}	46,15 aB ^β
25CAC75CO	47,04 aA ^{* β}	54,92 aA ^β	48,72 aA ^{* β}	53,69 aA ^α	49,80 aA ^{ns β}	51,52 aA ^β	40,0 bB ^{ns β}	42,47 bB ^β
CV (%)	26,0							
Teor de clorofila aos 120 dias								
Comercial	48,47	47,08	45,52	38,73	45,21	44,18	35,48	43,17
75CAC25CO	nd	nd	43,89 aAB ^{ns β}	44,24 aAB ^β	47,37 aA ^{ns β}	49,22 aA ^β	37,62 bB ^{ns β}	39,32 aB ^β
50CAC50CO	45,92 aA ^{* β}	49,93 aA ^β	nd	nd	49,92 aA ^{ns β}	46,02 aAB ^β	40,27 aB ^{ns α}	42,16 aB ^β
25CAC75CO	43,04 aA ^{* β}	50,92 aA ^β	43,69 aA ^{ns β}	44,72 aA ^β	45,80 aA ^{ns β}	47,52 aA ^β	36,02 bB ^{ns β}	38,47 aB ^β
CV (%)	13,2							
Teor de clorofila aos 240 dias								
Comercial	22,86	28,83	26,09	33,13	33,38	29,62	30,40	27,88
75CAC25CO	nd	nd	29,27 aA ^{ns β}	28,91 aA ^β	26,90 aA ^{ns α}	31,48 aA ^β	30,14 aA ^{ns β}	29,28 aA ^β
50CAC50CO	31,31 aA ^{ns β}	33,16 aA ^β	nd	nd	30,66 aA ^{ns β}	30,31 aA ^β	29,69 aA ^{ns β}	30,10 aA ^β
25CAC75CO	28,13 aA ^{ns β}	33,66 aA ^β	27,90 aA ^{ns β}	26,93 aA ^β	30,43 aA ^{ns β}	31,17 aA ^β	29,80 aA ^{ns β}	27,69 aA ^β
CV (%)	25,9							

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando os substratos dentro de cada variedade e inoculação e as variedades dentro de cada substrato e inoculação, respectivamente. *,^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando a inoculação dentro de cada substrato e variedade. ^{α, β} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) comparando com a testemunha (substrato comercial).

nd = não determinado.

Nos substratos se observou que o 50CAC50CO proporcionou um maior teor de clorofila na variedade RB975932 sem inoculação, assim como o 25CAC75CO na variedade RB966928 com inoculação e ambos superaram a testemunha, o substrato comercial. Biologicamente a explicação mais plausível para este resultado, está no conteúdo de nitrogênio do composto orgânico presente nestes substratos (Tabela 2), pelo fato de haver correlação significativa entre o teor de clorofila e com a concentração de N na folha (PÔRTO et al., 2011). Entretanto, como se pode observar na tabela 12, não houve diferença entre os substratos nos resultados de teor de nitrogênio das mudas.

Na avaliação realizada aos 120 dias se observou uma leve queda nos teores de clorofila dos tratamentos, sendo os maiores valores encontrados nas variedades RB867515, RB966928 e RB92579, onde os valores variaram entre 38 e 49 e os menores valores variaram entre 35 e 43 na variedade RB975932. Em relação à inoculação, somente a variedade RB867515 apresentou aumento positivo na clorofila com a associação às bactérias.

E aos 240 dias houve uma queda maior no teor de clorofila das plantas. O índice SPAD indica a intensidade da coloração verde na folha e como a clorose ficou mais evidente ao longo do tempo, os valores deste índice também foram reduzidos, tanto com, quanto sem inoculação de bactérias. Os valores variaram de 28 a 33 e não houve diferença entre os tratamentos.

De acordo com Martuscello et al. (2009) o teor de clorofila está relacionado à maior produção de massa seca, e essa diminuição evidencia o efeito de diluição do N absorvido pelas plantas, em razão do maior acúmulo da MS com o tempo. O que é desejável ao se aproximar da colheita, pois o excesso de N prolonga o crescimento vegetativo e retarda a maturação da cana-de-açúcar.

Resultados semelhantes foram encontrados por Gírio (2014) quando utilizado o inoculante na variedade RB867515 e para Fagundes et. al. (2012) o índice de clorofila não chegou a 30 na variedade sem inoculação de bactérias. Garcia et. al., (2013) avaliaram a eficiência da fixação biológica de nitrogênio no desenvolvimento inicial da mesma variedade e encontraram, aos 120 dias após o plantio, os maiores teores de clorofila nos tratamentos onde houve a inoculação das bactérias diazotróficas.

Por ocasião das avaliações finais do ensaio, após a colheita foram pesadas duas touceiras de cana-de-açúcar, a fim de conhecer o peso fresco de parte aérea por metro linear e com isso fazer a estimativa da produtividade de biomassa da parte aérea, em toneladas, dos tratamentos em um hectare. Os resultados da avaliação se encontram na tabela 16.

Comparando as variedades entre si, sem inoculação a RB867515, a RB966928 e a RB975932 foram superiores à RB92579. Já quando inoculadas o resultado variou conforme o substrato de plantio das mudas, sendo as maiores produtividades encontradas pela variedade RB867515 nos substratos 25CAC75CO e 50CAC50CO, na RB966928 no substrato 75CAC25CO e na RB975932 no 75CAC25CO e no 50CAC50CO. A inoculação de bactérias promoveu o aumento significativo da produtividade de biomassa de cana-de-açúcar em todos os tratamentos. Quanto aos substratos os melhores resultados foram encontrados no 25CAC75CO para as variedades RB867515, RB966928 e RB92579 e no 50CAC50CO para a RB975932, tanto com, quanto sem inoculação. Quando comparados à testemunha, todos os substratos foram semelhantes ou superiores.

As variedades RB867515 e RB975932 inoculadas obtiveram ganhos de produtividade de aproximadamente 20 t ha^{-1} , quando comparado ao controle não inoculado. Esse aumento é bastante significativo, tendo em vista que a produtividade média do Rio Grande do Sul é 40 t ha^{-1} e é considerada baixa se comparada à produtividade média do país que é de 75 t ha^{-1} e de 82 t ha^{-1} em São Paulo, estado maior produtor (CONAB, 2016). Reis et al. (2009) desenvolveram estudos de inoculação com o coquetel de bactérias diazotróficas em três localidades no Estado do Rio de Janeiro, e observaram em um dos ensaios aumento significativo de produtividade na variedade RB867515. E ainda, Pereira et al. (2013) avaliaram o acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas e encontraram aumentos de produtividade nas variedades RB867515 e RB92579 semelhantes à testemunha com aplicação de 100 kg ha^{-1} de nitrogênio.

Quanto à massa seca (Tabela 17), houve resposta significativa à inoculação em todas as variedades. As que mais se destacaram foram novamente a RB867515 e a RB975932, pois em todos os tratamentos envolvendo elas, as bactérias promoveram o incremento de massa seca. Porém, respostas positivas também foram encontradas na variedade RB966928 no substrato 25CAC75CO e na RB92579 no substrato 50CAC50CO.

Tabela 16 – Biomassa da parte aérea total (t ha⁻¹) de plantas de cana-de-açúcar aos 240 dias após o transplante em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas^{1/}.

Substrato	RB867515		RB966928		RB92579		RB975932	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Biomassa da parte aérea total (t ha ⁻¹)								
Comercial	38,93	52,85	39,71	37,38	23,93	31,07	38,57	47,85
75CAC25CO	nd	nd	37,14 bA * ^β	41,43 bA ^β	21,07 cB * ^β	30,71 bB ^β	37,85 cA * ^β	45,00 cA ^β
50CAC50CO	39,28 bA * ^β	52,78 bA ^β	nd	nd	27,14 bB * ^β	36,43 abB ^β	41,78 aA * ^β	58,22 aA ^α
25CAC75CO	40,0 aAB * ^β	68,55 aA ^α	45,83 aA * ^α	55,35 aB ^α	37,97 aB * ^α	42,15 aD ^α	39,76 bAB * ^β	48,95 bC ^β
CV (%)	15,3							

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05) comparando os substratos dentro de cada variedade e inoculação e as variedades dentro de cada substrato e inoculação, respectivamente. *,^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste t (p≤0,05) comparando a inoculação dentro de cada substrato e variedade. ^{α,β} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste de Dunnett (p≤0,05) comparando com a testemunha (substrato comercial).

nd = não determinado.

Tabela 17 - Massa seca (%) de plantas de cana-de-açúcar aos 240 dias após o transplante em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas^{1/}.

Substrato	RB867515		RB966928		RB92579		RB975932	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Massa seca (%)								
Comercial	16,05	30,43	21,99	22,28	22,91	22,04	16,55	22,66
75CAC25CO	nd	nd	22,56 aA ^{nsβ}	21,69 aB ^β	20,66 aA ^{nsβ}	23,00 aB ^β	19,18 aA * ^β	27,00 aA ^α
50CAC50CO	21,27 aA * ^α	33,09 aA ^β	nd	nd	20,62 aA * ^β	28,36 aA ^α	21,01 aA * ^β	27,84 aA ^α
25CAC75CO	20,80 aA * ^α	30,23 aA ^β	18,43 aA * ^β	23,31 aB ^β	23,24 aA ^{nsβ}	23,61 aB ^β	18,33 aA * ^β	26,47 aA ^α
CV (%)	15,2							

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05) comparando os substratos dentro de cada variedade e inoculação e as variedades dentro de cada substrato e inoculação, respectivamente. *,^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste t (p≤0,05) comparando a inoculação dentro de cada substrato e variedade. ^{α,β} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste de Dunnett (p≤0,05) comparando com a testemunha (substrato comercial).

nd = não determinado.

As variedades sem inoculação não apresentaram diferenças entre si em relação ao teor de massa seca. E quando inoculadas, os maiores valores, que chegaram à cerca de 30% de MS, estão atribuídos às variedades RB867515 e RB975932 em todos os substratos, assim como à RB92579 no substrato 50CAC50CO. O incremento de massa seca promovido pela inoculação nestas variedades variou de 24 a 36%, quando comparados aos controles não inoculados. E os substratos de forma de geral não influenciaram na massa seca dos tratamentos, pois não apresentaram diferenças entre si e quando comparados à testemunha, foram semelhantes ou superiores.

Similarmente aos resultados obtidos por Muthukumarasamy et al. (2006) e Girio (2015), verificou-se que bactérias diazotróficas influenciam positivamente a produção de massa seca. Estes efeitos positivos na massa seca têm sido atribuídos aos efeitos benéficos promotores de crescimento (PEREIRA et al., 2013; SCHULTZ et al., 2012, 2014) e possibilitam a redução no uso de fertilizantes nitrogenados na cultura da cana-de-açúcar (GOSAL e al., 2012).

O teor de nitrogênio (Tabela 18) variou conforme o tratamento. As variedades quando inoculadas não apresentaram diferenças entre si, já nos controles sem inoculação se pode observar algumas variações, sendo os menores teores de nitrogênio encontrados nas variedades RB966928, RB92579 e RB975932 no substrato 25CAC75CO. Em relação à inoculação de bactérias, apenas a RB966928 não respondeu positivamente. A associação das bactérias promoveu o aumento no teor de nitrogênio das demais variedades nos substratos 25CAC75CO e 50CAC50CO, sendo, portanto, 75CAC25CO o pior substrato na interação com as bactérias.

O aumento no teor de nitrogênio pode ser o reflexo do incremento de massa seca promovido pelas bactérias. Resultados estatisticamente superiores ao controle sem inoculação para o teor de N da variedade RB867515 foram obtidos por Chaves (2014), porém, quando feita a inoculação das espécies de bactérias individualmente. No entanto, Pereira et al. (2013) ao avaliarem a contribuição da inoculação com bactérias diazotróficas nas variedades RB867515 e RB92579, não observaram diferença entre tratamentos no acúmulo de nitrogênio total.

Por fim, os tratamentos foram avaliados quanto aos valores do isótopo ^{15}N , a fim de averiguar se houve ou não fixação de nitrogênio por parte das bactérias diazotróficas inoculadas na cana-de-açúcar (Tabela 19).

Tabela 18 - Teor de nitrogênio (%) de plantas de cana-de-açúcar aos 240 dias após o transplante em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas^{1/}.

Substrato	RB867515		RB966928		RB92579		RB975932	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Teor de nitrogênio (%)								
Comercial	0,83	0,84	0,71	0,89	0,63	0,78	0,91	0,92
75CAC25CO	nd	nd	0,67aA ^{ns β}	0,64aA ^β	0,73aA ^{ns β}	0,77aA ^β	0,79aA ^{ns β}	0,82aA ^β
50CAC50CO	0,66aA ^{* β}	0,86aA ^β	nd	nd	0,65aA ^{* β}	0,89aA ^β	0,67aA ^{* β}	0,83aA ^β
25CAC75CO	0,85aA ^{* β}	1,04aA ^β	0,71aB ^{ns β}	0,81aA ^β	0,62aB ^{* β}	0,93aA ^β	0,58aB ^{* α}	0,77aA ^β
CV (%)	14,7							

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando os substratos dentro de cada variedade e inoculação e as variedades dentro de cada substrato e inoculação, respectivamente. ^{*}, ^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando a inoculação dentro de cada substrato e variedade. ^α, ^β Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) comparando com a testemunha (substrato comercial).

nd = não determinado.

Tabela 19 - Valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de plantas de cana-de-açúcar aos 240 dias após o transplante em função de quatro substratos, quatro variedades, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas^{1/}.

Substrato	RB867515		RB966928		RB92579		RB975932	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰)								
Comercial	3,97	5,62	4,61	5,92	4,65	6,82	2,78	4,48
75CAC25CO	nd	nd	2,61bB ^{* α}	4,33aA ^β	4,49aA ^{ns β}	4,41aA ^α	4,53aA ^{* α}	3,34aA ^β
50CAC50CO	4,34aA ^{ns β}	4,38aA ^β	nd	nd	5,00aA ^{* β}	3,94aA ^α	4,01aA ^{ns β}	3,63aA ^β
25CAC75CO	4,39aA ^{ns β}	4,33aA ^β	4,48aA ^{ns β}	4,73aA ^β	5,13aA ^{* β}	4,37aA ^α	3,85aA ^{ns β}	3,19aA ^β
CV (%)	17,3							

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando os substratos dentro de cada variedade e inoculação e as variedades dentro de cada substrato e inoculação, respectivamente. ^{*}, ^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando a inoculação dentro de cada substrato e variedade. ^α, ^β Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) comparando com a testemunha (substrato comercial).

nd = não determinado.

Quando ocorre a fixação biológica do nitrogênio, estes valores nas plantas inoculadas devem ser inferiores aos observados no controle sem inoculação (UNKOVICH et al., 2008; URQUIAGA et al, 2012).

Isto ocorreu nas variedades RB92579 nos substratos 25CAC75CO e 50CAC50CO e na RB975932 no substrato 75CAC25CO, sendo que nos demais substratos essas mesmas variedades também apresentaram valores de ^{15}N menores quando inoculadas, mas as diferenças não foram significativas. Confirmando dessa forma, que nessas variedades a inoculação de bactérias estimulou a FBN.

Entretanto, o oposto foi verificado para a variedade RB966928, pois onde foi feita a inoculação, os valores do isótopo foram maiores do que nos controles sem inoculação. O mesmo foi encontrado por Schultz et al. (2016) para a variedade RB867515, que no presente estudo não apresentou diferenças em relação à FBN, mas respondeu positivamente à inoculação na promoção de crescimento. A superioridade dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ no tratamento inoculado, em comparação com o controle não inoculado, pode estar associada ao maior aproveitamento do N disponível no solo pela promoção do crescimento do sistema radicular pela inoculação (GÍRIO et al., 2015).

São observadas variações entre as respostas à inoculação e nas interações entre as bactérias, variedades de cana-de-açúcar e neste caso, substratos para o plantio de mudas. Mas estes grupos de microrganismos têm demonstrado contribuição significativa quando inoculados na cultura, seja pela capacidade de fixar nitrogênio ou por outros benefícios como promoção do crescimento. Então ainda que sejam necessários novos estudos para a obtenção de respostas à inoculação nas principais variedades cultivadas no Brasil, foi demonstrado neste estudo, que esta prática promove ganhos de produtividade, incremento de massa seca e manutenção do teor de nitrogênio em variedades que ocupam considerável área plantada nos canaviais, o que pode substituir total ou parcialmente a adubação nitrogenada e assim, refletir em ganhos econômicos e ambientais.

3.4. Conclusões

- i) Substratos utilizando a combinação de casca de arroz carbonizada e composto orgânico mantém melhor a sobrevivência de bactérias diazotróficas.
- ii) As variedades RB867515, RB92579, RB966928 e RB975932 respondem à inoculação de bactérias diazotróficas.
- iii) O substrato 50CAC50CO é a mistura mais indicada para a produção de mudas inoculadas com bactérias diazotróficas.
- iv) Em cana-planta, a variedade RB867515 apresenta maior índice de respostas à inoculação.
- v) A inoculação de bactérias diazotróficas promove a FBN nas variedades RB92579 e RB975932.

5. CAPÍTULO 2. Multiplicação de mudas de cana-de-açúcar através de micropropagação

5.1. Introdução

A cana-de-açúcar sempre teve grande importância econômica para a agricultura no Brasil e agora mais ainda graças à utilização do etanol em escala mundial. Devido a isso, atualmente novas variedades estão sendo desenvolvidas e sua disponibilização tem sido acelerada por meio da biotecnologia, através da micropropagação.

A recomendação técnica no cultivo de cana-de-açúcar sugere que 20% do canavial sejam renovados anualmente, para otimização do seu rendimento. Isto significa que 1,8 milhões de ha devem ser renovados, e conseqüentemente gerando uma demanda de 30 milhões de mudas/ano. Um dos gargalos da cadeia de produção sucroalcooleira é a disponibilidade de mudas de alta qualidade genética e fitossanitária, alto rendimento a campo e resistentes a pragas e doenças.

A propagação *in vitro* de plantas oferece vantagens em relação aos outros métodos comumente empregados, dentre elas a propagação de um grande número de plantas em pequeno espaço físico e em um curto espaço de tempo, uniformidade e padronização do lote (mudas idênticas geneticamente), desenvolvimento uniforme, possibilitando a programação do plantio e da colheita. Além disso, as plantas obtidas são livres de pragas e de doenças, garantindo a melhor qualidade da muda, resultando em aumento de produtividade e qualidade do produto (OLIVEIRA et al., 2010).

A aclimatização constitui uma etapa fundamental na produção de mudas obtidas por cultura de tecidos, uma vez que, as condições de cultura “*in vitro*” modificam características bioquímicas, anatômicas e morfológicas das plantas, alterando os processos fisiológicos normais (LUCAS et al., 2002). Na fase de aclimação, as mudas são retiradas do meio de cultivo e transferidas para

recipientes contendo substratos. Esses substratos podem influenciar as respostas das mudas através de suas características químicas, físicas e biológicas (GONÇALVES, 1995). A escolha e o manejo correto dos mesmos são de suma importância para a obtenção de mudas de qualidade.

A contaminação é uma das maiores barreiras para o cultivo *in vitro* de tecidos de plantas, afirmaram Pinho et al. (2012). Sendo assim, a assepsia dos explantes é uma das etapas cruciais da micropropagação, pois é responsável pela eliminação superficial de microrganismos epifíticos e endofíticos antes de sua inoculação no meio nutritivo (SOUZA; JUNGHANS, 2006). Entretanto, além de eliminar os microrganismos patogênicos, também promove a eliminação das bactérias diazotróficas endofíticas (MORAES; TAUK TORNISIELLO, 1997).

Bactérias endofíticas possuem, da mesma forma que patógenos, a capacidade de penetrar na planta e colonizar sistematicamente o hospedeiro, podendo habitar o apoplasto, vasos condutores e ocasionalmente o meio intracelular (ANDREOTE, 2007), podendo atuar em processos essenciais para o desenvolvimento vegetal, como por exemplo, auxílio na obtenção de nutrientes, promovendo o crescimento vegetal por meio de produção de fitormônios, como auxinas. Auxinas são substâncias que têm em comum a capacidade de atuar na expansão e no alongamento celular, ajudando também na divisão celular em culturas de tecidos, principalmente no enraizamento (KRIKORIAN, 1991).

O uso de biorreatores de imersão temporária (BIT), sobretudo na fase de alongamento e enraizamento de cana-de-açúcar, permite a obtenção de mudas de alta qualidade sanitária, em meio de cultura líquido, e apresenta inúmeras vantagens em comparação ao processo convencional, como a redução significativa dos custos com mão-de-obra, além de acelerar o ciclo de produção e aumentar a produtividade (TEIXEIRA, 2006).

Pesquisas já têm demonstrado resultados positivos na associação de bactérias diazotróficas a mudas micropropagadas de cana-de-açúcar, contudo, ainda existem muitas respostas a serem respondidas. Diante disto, o trabalho teve como objetivos: (i) avaliar o desempenho de quatro variedades de cana-de-açúcar quanto à taxa de multiplicação e crescimento *in vitro*; (ii) avaliar os efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas na fase de enraizamento e aclimação de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar; e (iii) avaliar a influência dos substratos na sobrevivência de mudas durante a aclimação.

5.2. Material e métodos

4.2.1. Local de realização, material de origem, assepsia e indução da brotação

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado (sede), localizado em Pelotas, no Rio Grande do Sul. Foram utilizadas quatro variedades de cana-de-açúcar, sendo elas: RB867515, RB92579, RB966928 e RB975932.

Para o cultivo *in vitro*, colmos inteiros foram coletados no campo e destes foram retirados os palmitos com aproximadamente cinco centímetros de comprimento. Esses foram submetidos à desinfestação visando eliminar fungos e bactérias, com imersão em álcool 70% por 2 minutos, em hipoclorito de sódio (2%) por 15 minutos, e realizada tríplice lavagem com água deionizada autoclavada, seguindo a metodologia descrita por Dutra et al. (2011).

Posteriormente, em ambiente asséptico, foram extraídos os meristemas com pinças e bisturi enquanto imersos em água autolavada. Em seguida eles foram inoculados em tubos de ensaio contendo sais do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) adicionado de hormônios para a multiplicação do material sugeridos por Lee (1987) e 6,0 g L⁻¹ de ágar. Ao extrair os meristemas, tomou-se o cuidado de deixá-los ainda envoltos em alguns discos foliares e de inocula-los com o ápice virado para baixo, imersos no meio de cultura, para diminuir os riscos de oxidação fenólica. Após cerca de 10 dias os explantes foram trocados de meio, virados e retiraram-se as folhas que se formaram em volta deles. Foram estabelecidos 10 meristemas de cada variedade, que nos novos tubos de ensaio permaneceram por mais 15 dias.



Figura 12 - Meristemas apicais inoculados em meio de cultura. (Foto: Ester Schiavon Matoso)

4.2.2. Multiplicação das brotações

Para a multiplicação das brotações utilizou-se o meio de cultura MS, semissólido, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 mL L⁻¹ de cinetina, 0,2 mL L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e 7,5 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Utilizou-se 30 mL de meio em frascos de 200 mL de volume, onde foram inoculados três explantes. Esses permaneceram em câmara de crescimento sob 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 27 mmol m⁻² s⁻¹ até o momento em que foi feita a próxima repicagem.

Visando multiplicar e quantificar a taxa de multiplicação das variedades de cana-de-açúcar, foi realizado cinco repicagens, em média a cada 20 dias. Durante as repicagens contou-se o número de brotações que cada explante inoculado emitiu, obtendo-se a taxa de multiplicação. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e compararam-se os efeitos das variedades pelo teste de Tukey (p≤0,05).



Figura 13 – Multiplicação de cana-de-açúcar *in vitro*. (Fotos: Ester Schiavon Matoso)

4.2.3. Multiplicação em biorreator de imersão temporária (BIT)

Para a multiplicação e alongamento das plântulas de cana-de-açúcar em biorreator de imersão temporária, foi utilizado o equipamento FOTO-BIT da marca TECNAL com sistema de iluminação de LED integrado.

Antecipando a inoculação dos explantes, os frascos de cultivo do biorreator passaram pelo processo de desinfestação por imersão completa durante 2 minutos

em álcool 70% e mais 2 minutos em hipoclorito de sódio (2,5%) e as mangueiras de condução de meio foram autoclavadas a 120°C por 20 minutos.

Em uma das garrafas com capacidade para 5 litros, devidamente desinfestada, foi adicionado 1L de meio de cultura MS líquido e na outra, foram inoculados 20 explantes de aproximadamente cinco centímetros de comprimento e contendo de 3 a 5 folhas. Em seguida os conjuntos de garrafas e mangueiras foram alocados no biorreator e submetidos a diodos emissores de luz (LED) em uma faixa de 70% vermelha e 30% azul (MALUTA et al., 2013). A imersão do meio de cultura foi feita a cada 6 horas, permanecendo por 5 minutos no frasco das plantas, a aeração foi a cada hora e o fotoperíodo foi de 16 horas.

Cada um dos tratamentos contou com três repetições e os explantes eram provenientes da cultura de meristemas e estavam no sexto subcultivo. O material foi mantido por 21 dias no biorreator e ao final deste período avaliou-se o número de brotações e comprimento de plântulas (cm).

Paralelamente ao BIT foi realizada a multiplicação em frascos de 200 mL contendo meio de cultura semissólido, sob as mesmas faixas de luz do biorreator, com o objetivo de avaliar a diferença entre o meio semissólido e o meio líquido na multiplicação de cana-de-açúcar. Foram utilizados três repetições para cada variedade e três explantes por repetição. Após 21 dias foi avaliado também o número de brotações e comprimento das plântulas.

Os fatores foram arrançados no esquema bifatorial (4 variedades x 2 meios de cultura), os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e compararam-se os efeitos das variedades pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e dos meios de cultura pelo teste t ($p \leq 0,05$).

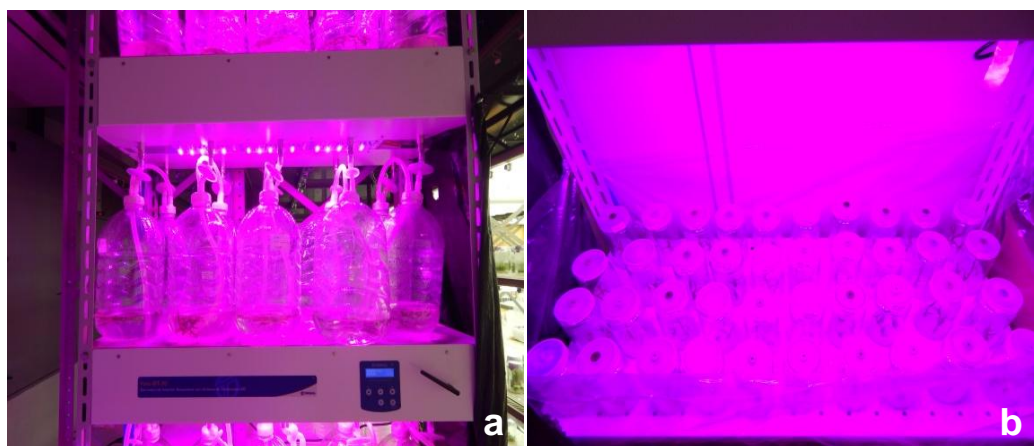


Figura 14 - Multiplicação de cana-de-açúcar em: a) biorreator de imersão temporária; b) frascos contendo meio semissólido. (Fotos: Ester Schiavon Matoso)

4.2.4. Contaminação bacteriana, fúngica e oxidação fenólica

Apesar de todos os benefícios, a micropropagação apresenta desafios como a contaminação por fungos e bactérias nas fases iniciais de estabelecimento do material vegetal e na manutenção do cultivo *in vitro*, o que ocorre também com o uso de biorreatores (MÁXIMO, 2014). Outro grande problema deste cultivo é a oxidação, pois *in vitro* a cana-de-açúcar libera exsudatos derivados da oxidação de compostos fenólicos. Esses são oxidados pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas, inibindo o crescimento dos explantes, podendo levar a morte, além de escurecer o meio de cultura.

Diante destes obstáculos, é importante apresentar as perdas de materiais causadas por eles durante os experimentos. Portanto, observou-se o número de explantes perdidos ao longo dos subcultivos e as diferenças entre as variedades de cana-de-açúcar.

4.2.5. Inoculação de bactérias diazotróficas na fase de enraizamento das plântulas

As bactérias das espécies *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *Paraburkholderia tropica*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Nitrospirillum amazonense*, foram enviadas da Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia. O material estava liofilizado e foi repicado em meio de cultura Dyg's (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA; VICTOR, 1986) de forma individualizada, no laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado.

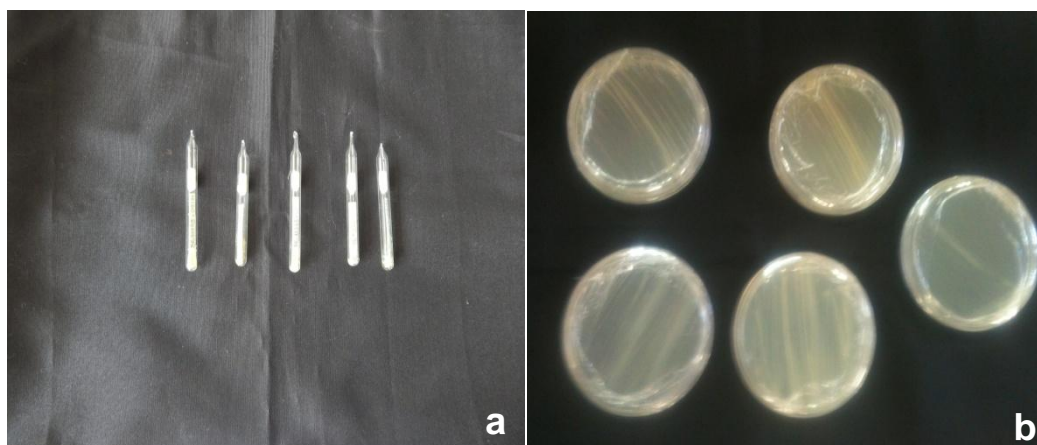


Figura 15 - a) âmpolas contendo as estirpes de bactérias diazotróficas liofilizadas; b) colônias das bactérias em placas de Petri após o crescimento em B.O.D. (Fotos: Ester Schiavon Matoso)

Após a repicagem, as placas de Petri foram mantidas em câmara incubadora do tipo B.O.D., à 28°C. Após as bactérias atingirem D.O. 1 a 550 nm foi feita a suspensão do inóculo em meio de cultura MS enfraquecido (REIS et al., 1999) e sem adição de hormônios. Para o enraizamento foram utilizados explantes que estavam no sexto subcultivo e o processo se deu em biorreator de imersão temporária, onde cada frasco recebeu 1L de meio de cultura e 2 mL de inoculante (CANUTO, 2003).

O experimento foi desenvolvido no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, sendo a unidade experimental representada por um frasco contendo 20 explantes. O objetivo do experimento foi testar o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas no enraizamento de plântulas de cana-de-açúcar, quando comparado aos tratamentos sem inoculação.

Após 20 dias em biorreator os tratamentos foram avaliados quanto à percentagem de mudas enraizadas e desenvolvimento de parte aérea. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e compararam-se os efeitos das variedades pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e da inoculação pelo teste t ($p \leq 0,05$).

4.2.6. Aclimação das plântulas

Após o enraizamento as plantas foram retiradas dos recipientes e foram plantadas em copos plásticos de 150 mL, contendo substrato. Os substratos utilizados foram três combinações de casca de arroz carbonizada com composto orgânico (25, 50 e 75%) e o substrato Turfa Fértil[®]. Os copos com as plantas foram colocados em bandejas plásticas contendo uma lâmina de água no fundo e cobertos com plástico para manutenção da umidade nos primeiros sete dias após a retirada do ambiente *in vitro*.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições de cada tratamento e cinco mudas por repetição. Os fatores foram arrançados no esquema trifatorial (4 variedades de cana-de-açúcar x 4 substratos x com e sem inoculação de bactérias diazotróficas). Foi avaliada a sobrevivência das plantas nos diferentes tipos de substratos, aos 7, 14 e 21 dias após o plantio. Os dados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$) e em caso de significância estatística, compararam-se os efeitos das variedades pelo teste de Tukey, da

inoculação pelo teste t e dos substratos pelos testes de Tukey e de Dunnett, comparando com a testemunha (substrato comercial).



Figura 16 - Substratos utilizados na aclimação das mudas. (Foto: Luize Mascarenhas)

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Taxa de multiplicação das brotações

Ao comparar as taxas de multiplicação das variedades de cana-de-açúcar ao longo de cinco subcultivos, através da contagem do número de brotos emitidos por cada explante (Tabela 20), puderam-se observar diferenças entre os materiais em todas as avaliações. Os melhores resultados foram apresentados pela RB975932, com excessão do 4º subcultivo, em que a RB867515 superou as demais. Ao mesmo tempo em que a RB92579 apresentou as menores taxas de multiplicação em todas as avaliações, assim como a RB966928 nos subcultivos 1 e 5.

Tabela 20 - Número de brotações de plântulas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro*, de quatro variedades e número de explantes obtidos ao final de cinco subcultivos^{1/}.

Variedade	Número de meristemas	Subcultivo					Explantes obtidos
		1º	2º	3º	4º	5º	
RB867515	1	3,5 b	5,0 c	7,0 c	10,0 a	8,5 b	10.412*
RB92579	1	3,0 c	3,0 d	4,0 d	6,0 d	7,0 c	1.512*
RB966928	1	3,0 c	6,0 b	8,0 b	9,0 b	7,0 c	9.072*
RB975932	1	4,5 a	7,5 a	10,0 a	8,0 c	10,0 a	27.000*

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando as variedades em cada um dos subcultivos.

*Valores estimados

A constituição base do meio de cultura, o tipo e a concentração dos reguladores de crescimento são fatores determinantes para a obtenção de altas taxas de multiplicação, mas o genótipo também tem grande influência. A variedade RB975932 é conhecida pelo seu excelente perfilhamento (CHAPOLA, 2013), o que justifica seu desempenho na brotação dos explantes. A RB92579 também possui bom perfilhamento (FRANZÉ et al., 2014), no entanto, quando cultivada *in vitro* apresenta plântulas alongadas e com pouco desenvolvimento lateral.

Observou-se também que na primeira repicagem todas as variedades apresentaram poucas brotações, o que aumentou nas próximas repicagens. O aumento no número de subcultivos *in vitro* resulta em maior produção de brotações e também em melhor qualidade do material (GOMIDE, 2004).

O número de explantes que foram obtidos ao final dos subcultivos, ou seja, após as cinco repicagens de um único meristema, é um resultado bastante promissor. Tendo em vista que, há a possibilidade de formar um hectare de cana-de-açúcar utilizando menos de 10 mil mudas (AFERRI; XAVIER; PEREIRA, 2016).



Figura 17 - Repicagem de explantes da variedade RB975932. (Fotos: Ester Schiavon Matoso)

5.3.2. Multiplicação e comprimento de plântulas em BIT x meio semissólido

Durante o sexto subcultivo, as plântulas de cana-de-açúcar foram multiplicadas em biorreator de imersão temporária e também em frascos contendo meio de cultura semissólido, ambos em condições de luminosidade ideais para a multiplicação. Maluta et al. (2013) afirmam que 70% de luz vermelha e 30% de azul evitam a formação de plântulas estioladas, induzindo dessa forma, a brotação lateral das mesmas.

Foi realizada uma única avaliação das plântulas e para ambos os parâmetros ocorreu interação bifatorial entre os fatores (variedade x meio de cultura), com isso os efeitos isolados foram desconsiderados e analisaram-se detalhadamente as interações (Tabela 21).

Em relação ao número de brotações, no biorreator de imersão temporária com meio líquido, a variedade RB975932 apresentou melhor desenvolvimento, enquanto que a RB966928 emitiu o menor número de brotos. No entanto, quando cultivadas de forma convencional em meio semissólido, essas variedades não diferenciaram entre si, apresentando as melhores taxas de multiplicação. A RB966928 se desenvolveu melhor em meio semissólido e as demais no biorreator.

Quanto ao comprimento, todas as variedades apresentaram plântulas mais longas no meio semissólido. Nesse tipo de meio a RB92579 e a RB966928 apresentaram os maiores comprimentos e no líquido apenas a última.

Tabela 21 - Número de brotações e comprimento (cm) de plântulas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* no sexto subcultivo, em função das variedades e dos tipos de meio de cultura^{1/}.

Variedade	Número de brotações		Comprimento de plântula (cm)	
	Líquido	Semissólido	Líquido	Semissólido
RB867515	10,5 bA	4,5 bB	4,4 bB	7,3 bA
RB92579	8,0 cA	4,0 bB	4,2 bB	10,3 aA
RB966928	4,0 dB	6,6 aA	7,0 aB	9,7 aA
RB975932	14,0 aA	7,5 aB	5,0 bB	7,5 bA
CV (%)	9,9		7,3	

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, respectivamente, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando as variedades dentro de cada tipo de meio de cultura e pelo teste t ($p \leq 0,05$) quando comparado o tipo de meio dentro de cada variedade.

Estes resultados confirmam a importância da utilização do meio de cultivo adequado para a cultura de interesse. Para a cana-de-açúcar indicam-se meios semissólidos para o estabelecimento e meios líquidos para a etapa de multiplicação (FRANCA, 2016). O biorreator possibilita a renovação do ar durante o cultivo e o monitoramento de oxigênio dissolvido, pH, concentração de íons e temperatura (TEIXEIRA, 2002), além da agitação da cultura e maior contato dessa com o meio de cultivo, o que resulta na perda de dominância apical e proporciona o desenvolvimento de maior número de brotações nos explantes (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; OLIVEIRA et al., 2011).

5.3.3. Contaminação e oxidação dos explantes

A oxidação fenólica, como pode-se observar na Figura 19, ocorreu em todas as fases do cultivo *in vitro*, porém seus danos causaram perdas apenas na fase de estabelecimento dos meristemas. Durante a multiplicação em frascos e em BIT, sempre que o meio se tornou oxidado, as plântulas foram transferidas para recipientes contendo novo meio de cultura. O estabelecimento inicial é prejudicado pela oxidação, pois algumas enzimas ao oxidar os fenóis formam quinonas, as quais são responsáveis pela coloração marrom das culturas, além de causarem a inibição do crescimento e a morte dos explantes (MONACO et al., 1977).

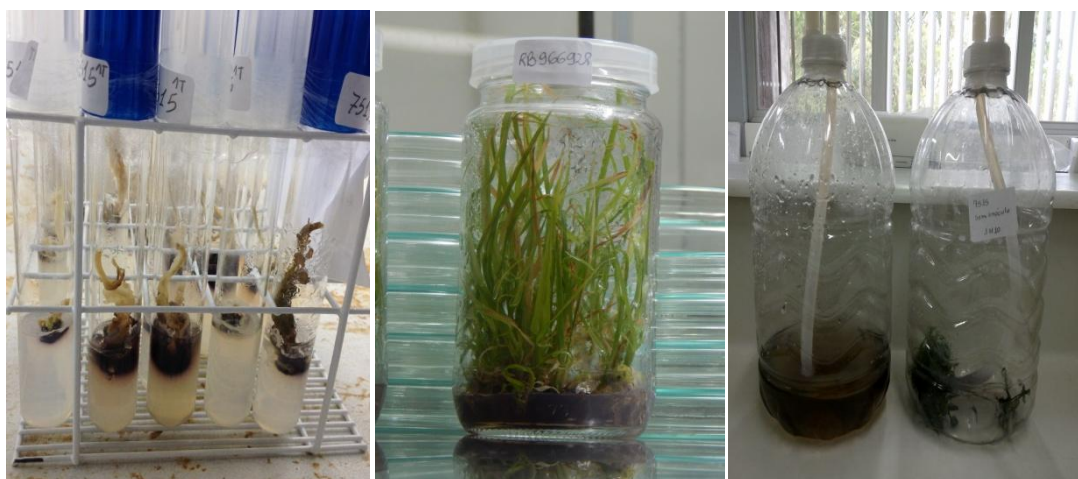


Figura 68 - Oxidação fenólica dos explantes durante as fases de estabelecimento e multiplicação *in vitro*. (Fotos: Ester Schiavon Matoso e Gustavo Fehrenbach)

Dentre as variedades utilizadas no estudo, a RB867515 e a RB966928 foram as que mais tiveram perdas, portanto, houve a necessidade de efetuar a inoculação de um maior número de meristemas destes dois materiais. A oxidação fenólica é altamente dependente do genótipo e também do tipo de explante utilizado. Explantes jovens em geral oxidam menos que os mais velhos (TEIXEIRA, 2005).

A oxidação pode ser minimizada pela redução de danos mecânicos e químicos no explantes, pela modificação do ambiente e pelo uso de antioxidantes. (MONACO et al., 1977). A redução da luminosidade na câmara de fluxo laminar durante a excisão dos explantes e a manutenção da cultura no escuro no início do cultivo também são consideradas benéficas, pois a luz induz à produção de fenóis na planta (MARKS; SIMPSON, 1990).

A contaminação por sua vez, causou as maiores perdas durante a multiplicação em biorreator (Figura 20), pois em cada recipiente contaminado, foram perdidos 20 explantes, que ao se multiplicar, iriam formar um número maior ainda de mudas. Entretanto, ela ocorreu em todas as fases do cultivo *in vitro*, houve infestações de fungos e de bactérias também no estabelecimento e na multiplicação em frascos, mas as perdas não foram consideráveis.



Figura 19 - Contaminação fúngica e bacteriana durante a fase de multiplicação em biorreator de imersão temporária. (Fotos: Ester Schiavon Matoso e Gustavo Fehrenbach)

As fontes de contaminação basicamente estão ligadas à origem do explante, ao meio nutritivo, ao ambiente e à habilidade do operador. Outros fatores relacionados à contaminação na propagação *in vitro* de cana-de-açúcar são a variedade e a idade do material, meristemas mais jovens tendem a ser isentos de patógenos. A variedade RB966928 foi a que apresentou um maior número de explantes contaminados por bactérias endofíticas no estabelecimento dos meristemas e no biorreator de imersão temporária. Na multiplicação em frascos nenhuma variedade sofreu perdas significativas por contaminação bacteriana, tampouco fúngica.

O sucesso da micropropagação depende da sequência de fases ou etapas, em que o êxito de cada uma é necessário para o êxito da próxima e a introdução do explante no meio de cultivo, depende de uma eficiente assepsia dos explantes a serem estabelecidos (GEORGE, 1993). Para minimizar a contaminação microbiana, inúmeros protocolos de esterilização são apresentados por diversos autores. Estes relatam o uso de substâncias, como hipoclorito de sódio (PEREIRA et al, 2009).

A devida desinfestação dos explantes e dos materiais utilizados no manuseio, pode eliminar a presença de fungos e bactérias exógenas, mas geralmente nos casos de contaminação bacteriana, essa é proveniente de bactérias endofíticas já presentes nos materiais. A utilização de antibióticos para o controle e erradicação destes microrganismos contaminantes é frequente, no entanto, o uso destes pode apresentar níveis consideráveis de toxicidade ao tecido vegetal. Sem contar que na cana-de-açúcar, pode eliminar também as bactérias promotoras de crescimento e fixadoras de nitrogênio que são associadas à cultura e importantes pelo seu caráter endofítico obrigatório (BALDANI et al., 1997).

5.3.4. Enraizamento e desenvolvimento de parte aérea de plântulas inoculadas com bactérias diazotróficas

Aos 30 dias a média de plântulas enraizadas foi de 90% nas variedades RB867515, RB92579 e RB966928 e 80% na RB975932 sem inoculação de bactérias diazotróficas (Figura 21). Nos tratamentos em que houve a inoculação apenas a RB966928 apresentou mudas enraizadas, em uma média de 20%. Nestes mesmos tratamentos, o crescimento das plântulas foi bastante inferior aos controles sem inoculação. Não houve multiplicação das brotações e as plântulas apresentaram estiolamento (Figura 22).

Estes resultados apontam que durante o enraizamento em biorreator de imersão temporária não é um bom momento para a inoculação. Até mesmo porque, o interesse dessa prática na fase de enraizamento, é proporcionar um aumento na emissão de raízes, o que ocorreu nas plântulas que não foram inoculadas.

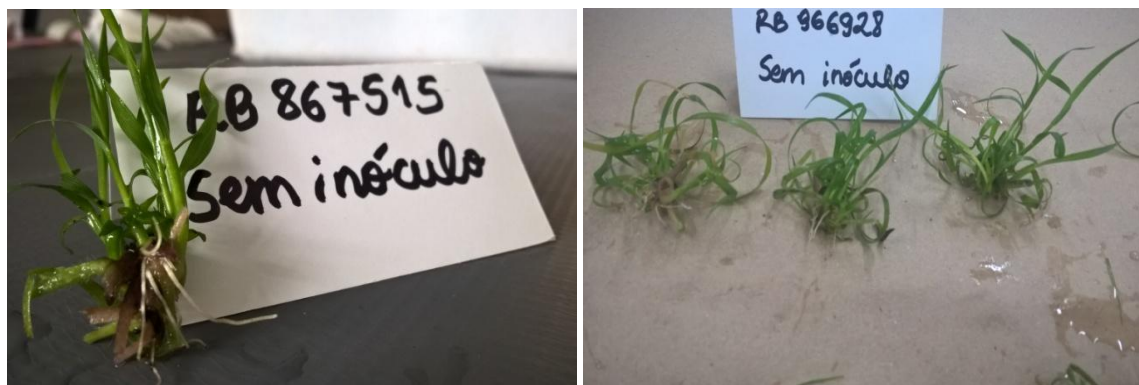


Figura 20 - Aparência das raízes de plântulas de cana-de-açúcar das variedades RB867515 e RB966928 aos 30 dias de cultivo. (Fotos: Luíze Mascarenhas)



Figura 21 - Aparência das plântulas de cana-de-açúcar em frascos do BIT e após a retirada, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas. (Fotos: Luíze Mascarenhas)

No entanto, a reintrodução de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar tem auxiliado os estudos da associação entre as plantas e as bactérias diazotróficas, e tem permitido avaliar o potencial de FBN e de promoção de crescimento devidos à inoculação destas bactérias (REIS et al, 1999; OLIVEIRA et al., 2002; CANUTO et al.; 2003; SCHULTZ et al., 2012). Os autores Muñoz-Rojas; Caballero-Mellado (2003), em um experimento de curta duração, constataram que a inoculação de estirpes bacterianas proporcionou maiores ganhos na parte aérea e sistema radicular de mudas micropropagadas, porém, em frascos contendo meio semissólido.

Diante destes resultados e das vantagens do uso de biorreator para multiplicação, alongamento e enraizamento de mudas de cana-de-açúcar, se fazem necessários, novos estudos sobre a inoculação de bactérias diazotróficas em biorreator de imersão temporária.

5.3.5. Sobrevivência das mudas na fase de aclimação

Durante a aclimação das mudas de cana-de-açúcar retiradas do biorreator de imersão temporária, foi monitorada a sobrevivência destas nos diferentes substratos, durante três semanas. Ocorreu a interação trifatorial entre os fatores, por isso analisou-se as interações, como se pode observar na tabela 22.

Tabela 22 – Sobrevivência de mudas (%) de cana-de-açúcar na fase de aclimação, em função de quatro variedades, quatro substratos, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas^{1/}.

Substrato	RB867515		RB966928		RB92579		RB975932	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
% de mudas vivas aos 7 dias								
Comercial	100	60	100	40	100	40	100	40
75CAC25CO	100aA * ^β	40aA ^α	80bB * ^α	0cC ^α	100aA * ^β	20aB ^α	100aA * ^β	20aB ^α
50CAC50CO	100aA * ^β	40aA ^α	80bB * ^α	40bA ^β	100aA * ^β	0bB ^α	100aA * ^β	0bB ^α
25CAC75CO	100aA * ^β	20bB ^α	100aA ^{ns β}	100aA ^α	100aA * ^β	0bC ^α	100aA * ^β	0bC ^α
CV (%)	6,0							
% de mudas vivas aos 14 dias								
Comercial	80	0	20	20	20	0	20	0
75CAC25CO	100aA * ^α	0aB ^β	0bC ^{ns α}	0bB ^α	0cC * ^α	20aA ^α	20bB * ^β	0aB ^β
50CAC50CO	80bA * ^β	0aB ^β	0bC * ^α	20aA ^β	40bB * ^β	0bB ^β	60cB * ^α	0aB ^β
25CAC75CO	100cA * ^α	0aA ^β	40aB * ^α	0bA ^α	40aB * ^α	0bA ^β	100aA * ^α	0aA ^β
CV (%)	17,3							
% de mudas vivas aos 21 dias								
Comercial	80	0	20	20	20	0	20	0
75CAC25CO	100aA * ^α	0aB ^β	0bC ^{ns α}	0bB ^α	0cC * ^α	20aA ^α	20bB * ^β	0aB ^β
50CAC50CO	80bA * ^β	0aB ^β	0bC * ^α	20aA ^β	40bB * ^β	0bB ^β	60cB * ^α	0aB ^β
25CAC75CO	100cA * ^α	0aA ^β	40aB * ^α	0bA ^α	40aB * ^α	0bA ^β	100aA * ^α	0aA ^β
CV (%)	17,3							

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando os substratos dentro de cada variedade e inoculação e as variedades dentro de cada substrato e inoculação, respectivamente. *,^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando a inoculação dentro de cada substrato e variedade. ^{α, β} Significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) comparando com a testemunha (substrato comercial).

Aos sete dias de aclimação observou-se que 100% das mudas das quatro variedades sem inóculo permaneciam vivas em todos os substratos, com exceção da RB966928, que apresentava 80% de sobrevivência nos substratos 75CAC25CO e 50CAC50CO. No entanto, uma parte significativa das que foram inoculadas morreram, já na primeira semana de aclimação. A testemunha apresentou os melhores índices de sobrevivência dessas mudas e no substrato 75CAC25CO sobreviveram apenas 40% das mudas da RB867515 e 20% da RB92579 e RB975932. No 25CAC75CO, 20% da RB867515 e 100% da RB966928 e no 50CAC50CO, 40% dessas últimas variedades. Isto provavelmente aconteceu porque as mudas que foram inoculadas no BIT, saíram das condições de laboratório já um tanto debilitadas.

Na avaliação feita aos 14 dias a perda de mudas foi bastante expressiva, sendo que entre as inoculadas, permaneceram vivas apenas 20% da variedade RB966928 no substrato 50CAC50CO e na testemunha e a mesma porcentagem da RB92579, porém, no 75CAC25CO. Nas sem inoculação, a RB867515 foi a que apresentou maior sobrevivência de mudas, nos quatro substratos, seguida da RB975932 e da RB92579. A partir desta data todas as mudas permaneceram vivas, não tendo, portanto, diferenças na avaliação feita aos 21 dias de aclimação.

A sobrevivência de um maior número de mudas nos substratos 25CAC75CO e comercial pode estar relacionada com a capacidade de retenção de água desses materiais. Dentre os fatores que podem concorrer para o insucesso na aclimação de mudas micropropagadas, Hoffmann (2002) cita a perda excessiva de água como um dos principais, devido a pequenas quantidades de cera epicuticular e ao lento mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos, sendo o uso de um substrato que mantenha melhor a umidade, um fator favorável na aclimação.

Outro fato que prejudicou a sobrevivência foi a exposição das mudas a 100% de luz após uma semana, pois a aclimação deve ser feita em casas de vegetação ou telado, sob baixa intensidade luminosa e alta umidade relativa do ar. Indica-se que as plântulas sejam mantidas em ambientes com 50 a 60% de sombreamento por no mínimo 3 semanas (SCARANARI; LEAL; PELLEGRINO, 2008). Alcantara et al. (2014) aclimataram plantas de cana-de-açúcar das cultivares RB855156 e RB722454 utilizando substrato comercial Plantmax® e cobertura de sacos de plástico e obtiveram 100% de sobrevivência.

5.4. Conclusões

- i) As variedades RB867515 e RB975932 apresentam excelente desenvolvimento *in vitro*, tanto em meio de cultura semissólido, quanto em líquido, enquanto que a RB92579 se desenvolve melhor em semissólido e a RB966928 em líquido.

- ii) O biorreator de imersão temporária é um meio eficiente de micropropagação de mudas de cana-de-açúcar.

- iii) A inoculação de bactérias diazotróficas é ineficiente quando utilizada na fase de enraizamento de plântulas em biorreator.

- iv) O substrato 25CAC75CO é o mais indicado para a aclimação de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A casca de arroz carbonizada e o composto orgânico podem ser usados na produção de mudas de cana-de-açúcar, sendo que a implantação de lavouras de cana-de-açúcar utilizando a produção de mudas proporciona a economia de material de propagação e garante um stand ideal de plantas e um bom desenvolvimento inicial no campo.

A micropropagação de cana-de-açúcar também é de fato uma alternativa viável ao plantio convencional, porque apresenta taxas de multiplicação altas, chegando algumas variedades a produzir cerca de 30 mil mudas a partir de um meristema apical. Esse número de explantes aumenta ainda mais com a multiplicação em biorreator de imersão temporária. No entanto, a fase de aclimatação das plântulas é uma das mais delicadas no processo e se não for bem encaminhada pode-se perder todo o material conseguido *in vitro*.

A inoculação de bactérias diazotróficas promove o crescimento das plantas, aumenta o tamanho e a qualidade das raízes, o que resulta em uma maior absorção de água e nutrientes, e ainda, desenvolvem a fixação biológica do nitrogênio atmosférico. Entretanto, algumas variedades respondem mais que outras a esta prática, e quando desenvolvida na fase de enraizamento em biorreator de imersão temporária, pode prejudicar a qualidade das plântulas. Necessitando desta forma, mais estudos envolvendo diferentes variedades de cana-de-açúcar e métodos de propagação.

A associação de bactérias diazotróficas às mudas de cana-de-açúcar e ao uso de substratos alternativos, resulta em ganhos produtivos, diminui os custos de produção, além de tornar o cultivo mais sustentável, dependendo do ambiente de cultivo. Salientando, portanto, a importância de se observar a interação entre a variedade, o substrato, a inoculação de bactérias e o ambiente, no cultivo de cana-de-açúcar.

7. REFERÊNCIAS

ABAD, M. Los sustratos hortícolas y técnicas de cultivo sin suelo. In: **Rallo, L.; Nuez, F. La horticultura Española en la C.E**, Réus: Horticultura S.L., p.271-280, 1991.

ABAD, M.; MARTINEZ, P. F.; MARTINEZ, J. Evaluación agrónomica de los sustratos de cultivo. **Actas de Horticultura**, Villaviciosa, Espanha, v. 11, p. 141-154, 1993.

ABREU, M.F.; ABREU, C.A.; SARZI, I.; PADUA JUNIOR, A.L. Extratores aquosos para a caracterização química de sustratos para plantas. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 184-187, 2007.

AFERRI, G.; XAVIER, M. A.; PEREIRA, M. A. A. Custo de produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar – MPB. **Pesquisa & Tecnologia**, vol. 13, n. 2, 2016.

ALCANTARA, G. B.; MACHADO, M. P.; RIBEIRO, D. S.; WIPPEL, H. H.; FILHO, J. C. B.; OLIVEIRA, R. A; DAROS, E. Multiplicação, alongamento e enraizamento de brotações in vitro de clones de cana-de-açúcar submetidos a diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e ácido giberélico. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Tocantins, v. 5, N,1: p.20-25, Fev. 2014.

ANDRADE, CAO; CARNEIRO, JSS; FREITAS, GA; LEITE, RC; SANDI, F; MACIEL, CJ; CERQUEIRA, FB. Produção de mudas de tomate cv. santa cruz sob diferentes sustratos. Amazon Soil – I Encontro de Ciência do Solo da Amazônia Oriental, p. 186-193. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Núcleo Regional Amazônia Oriental, **Anais...** Trabalhos completos, Gurupi-TO, 2014.

ANDREOTE, F. D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 2007. 184 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade de São Paulo / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2007.

ANTUNES, W. R.; SILVA, S. D. dos A. e; TATTO, F. R.; CAMPOS, A. D. S. de.; EICHOLZ, M. D. Avaliação de brotação e posição de plantio de minitoletes na

produção de mudas de cana-de-açúcar (*Saccharum* SPP.) no sistema de mudas pré-brotadas, em Pelotas-RS, safra 2012/13. **Anais...** Simpósio Estadual de Agroenergia e a 5ª Reunião Técnica de Agroenergia. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2014.

BACCHI, O. O. S. Botânica da cana-de-açúcar. In: ORLANDO FILHO, J. **Nutrição e adubação da cana-de-açúcar no Brasil**. Instituto do Alcool e do Açúcar/Planalsucar. Piracicaba, SP. p. 25-37. 1983.

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

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

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F.L.; HORSTE, B.; KERSTERE, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M. & DOBEREINER, J. Inclusion of "*Pseudomonas*" *rubrisulbalbicans*, a mild plant pathogen within the genus *Herbaspirillum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 46, p. 802 – 810, 1996.

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

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v.384, p.413-431, 2014.

BARRIE, A.; PROSSER, S.J. Automated analysis of light-element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. In: BOUTTON, T.W.; YAMASAKI, S. (Ed.). **Mass spectrometry of soils**. New York: Marcel Dekker, 1996. p.1-46.

BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-butyric acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**. v. 24, p. 7 – 11. 1998.

BIONDO, J. C.; MORAIS, K. P.; MEDEIROS, S. L. P.; BANDEIRA, A. H.; SILVA, S. D. A. e; DIAS, F; S. Avaliação de perfilhamento em diferentes genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) em Jaguari-RS. **Anais...** Congresso Brasileiro de Agrometeorologia, 2011.

BLACKMER, T.M.; SCHEPERS, J.S. Techniques for monitoring crop nitrogen status in corn. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.25, p.1791-1800, 1994.

BLANCO, Y.; BLANCH, M.; PIÑON, D.; LEGAZ, M-E.; VICENTE, C. Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (Pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.99, p. 366-371, 2005.

BODDEY, L. H.; DART, P.; GOI, S. R. & BALDANI, J. I. Ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas no cultivar Q151 de cana-de-açúcar cultivada na Austrália. In: **Anais...** Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, 23. Reunião Brasileira sobre Micorrizas, 7. Simposio Brasileiro de Microbiologia do Solo, 5., Reunião Brasileira de Biologia do Solo, 2., Caxambu. p. 809. 1998.

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

BRAUNBECK, O. A.; MAGALHÃES P. S. G. Avaliação tecnológica da cana-de-açúcar. In: CORTEZ, L. A. B. (Org.). **Bioetanol de Cana-de-Açúcar, P&D para Produtividade e Sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, p. 451-464, 2010.

BURTON, J. D. *Rhizobium* inoculant for developing countries. **Tropical Agriculture**, London, v.58, n.4, p.291-303, 1991.

CABALLERO-MELLADO, J.; FUENTES-RAMIREZ, L. E.; REIS, V. M.; MARTINEZROMERO, E. Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group. **Applied and Environmental Bacteriology**. v. 61, n. 8, p. 3008 – 3013, 1995.

CABALLERO-MELLADO, J.; ONOFRE-LEMUS, J.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. MARTÍNEZ-AGUIAR, L. The tomato rhizosphere an Environment rich in nitrogen-fixing Burkholderia species with capabilities of interest of agriculture and bioremediation. **Applied and Environmental Microbiolog**, v. 73, p.5308-5319, 2007.

CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; VITTI, A. C. Nitrogênio e enxofre na cultura da cana-de-açúcar. In: Simpósio sobre nitrogênio e enxofre na agricultura Brasileira, 2006, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: International Plant Nutrition Institute, 2007. p.355-392.

CANUTO, E. de L. **Metodologias de inoculação e prospecção de compostos secretados por bactérias diazotróficas endofíticas na promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Rio de Janeiro, 2008.

CANUTO, E. de L.; SALLES, J. F.; OLIVEIRA, A. L. M.; PERIN, L. REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. **Agronomia**, v. 37, nº 2, p. 67 - 72, 2003.

CARVALHO, M. F. C. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. Fatores inerentes à micropropagação. **Embrapa Algodão**. Campina Grande, 2013.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. Germinação. In: CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes - ciência, tecnologia e produção**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1983. Cap.7, p.107-143.

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

CASSÁN, F.; ANDERLEYDEN, J; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-bacterias-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **J Plant Growth Regulat.**, v.33, p. 440-459, 2014.

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

CHAPOLA, R. G. **Censo varietal, Variedades e Clones Potenciais RB Recomendações de Uso**. PMGCA/RIDESA/UFSCar. 88p. 2013.

CHAVES, V. A. **Desenvolvimento inicial e acúmulo de nutrientes em três variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do solo. 76 p. Rio de Janeiro, 2014.

CHAVES, V. A.; MAGALHÃES JÚNIOR, H. X.; SOUZA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; MACHADO, D. O. de; REIS, V. M. Resposta da variedade de cana-de-açúcar RB867515 a doses de nitrogênio associadas à inoculação de bactérias diazotróficas. In: XXXIV Congresso Brasileiro de Ciência do solo, **Anais...** Florianópolis-SC, 2013.

CHENG A.C.; CURRIE B. J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. **Clin Microbiol Ver.** v.18: p383–416. 2005.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC. **Manual de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina.** 10. ed. Porto Alegre, 2004.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acomp. safra bras. cana**, v. 3 - Safra 2016/17, n. 2 - Segundo levantamento, agosto de 2016.

COSTA, L. A. M.; COSTA, M. S. S. M.; PEREIRA, D. C.; BERNARDI, F. H.; SÍLVIA M. Avaliação de substratos para a produção de mudas de tomate e pepino. **Revista Ceres**, 60: 675-682, 2013.

COUTO, S. **A Importância da cana-de-açúcar no Brasil.** Grupo de Mecatrônica da USP, São Paulo, 2013.

CSPMA – Canadian Sphagnum Peat Moss Association. **Harvesting Peat.** Disponível em: <<http://www.peatmoss.com/index.php>>. Acesso em: 31 dez. 2016.

DE MARCO, E.; MATOSO, E. S.; TATTO, F. R.; BOELTER, J. H.; SILVA, S. D. A. Utilização de resíduo agroenergético em substratos para a produção de mudas de cana-de-açúcar. **Anais...** X Encontro sobre substratos para plantas, Campinas, SP. 2016.

DE WEERT, S. et al. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.15, p.1173-1180, 2002.

DIAS, F. L. F. **Relação entre a produtividade, clima, solos, e variedades de cana-de-açúcar na Região Nordeste do Estado de São Paulo.** Dissertação de Mestrado. ESALQ - USP, Piracicaba, 64 p. 1997.

DIOLA, V.; SANTOS, F. Fisiologia. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. (Ed.) **Cana-de-açúcar: Bioenergia, açúcar e álcool: Tecnologias e perspectivas**. Viçosa: [S.n.], 2010. 577 p.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa – SPI; Itaguaí, RJ: Embrapa-Agrobiologia, 60 p. 1995.

DOBRITSA A.P.; SAMADPOUR M. Transfer of eleven *Burkholderia* species to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov., a new genus to accommodate twelve species of *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2016.

DONZELI, V.P. **Atividade de alguns componentes da comunidade microbiana do solo e microrganismos diazotróficos endofíticos sob influência do nitrogênio na cultura do milho**. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002. 84p.

DUTRA, L. F.; DONINI, L. P.; SILVA, S. D. A. E.; SILVA, N. D. G; THIEL, F. B.; VITÓRIA, J. M.; ZACARIAS, F. M. **Protocolo de micropropagação de cana-de-açúcar**. Embrapa Clima Temperado. Rio Grande do Sul, 2011.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de Eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n.58, p. 49-59, 2009.

ECKERT, B. et al. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.17-26, 2001.

ENSINAS, S.C.; MAEKAWA JUNIOR, M.T.; ENSINAS, B.C. Desenvolvimento de mudas de rúcula em diferentes combinações de substrato. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, 18: 1-7, 2011.

ESTRADA, G.A.; BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, D.M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and Soil**, v.369, p.115129, 2013.

FAGUNDES, E. A. A. **Desenvolvimento inicial de variedades de cana-de-açúcar em LATOSSOLO do cerrado mato-grossense submetidas a níveis de**

compactação do solo. Dissertação (Mestrado), Pós- Graduação em Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Mato Grosso. Rondonópolis, MT. 75p. 2012.

FIGUEIREDO, M. V. B.; STAMFORD, N. P.; VIDOR, C.; VILAR, J. J.; FILHO, E. C. O. Sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. em substratos alternativos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.27, n.11, 1992.

FONSECA, R.B.; FERNANDES, M.G.; DUTRA, F.; SOUZA, T.A.; PONTIM, B.C.A. Uso do SPAD-502 na avaliação dos teores foliares de clorofila, em híbridos de milho BT e Isogênico. **Revista Verde**, Mossoró – RN. v.7, n.1, p. 56 – 60. 2012.

FORTES, C.; OCHEUZE TRIVELIN, P. C.; VITTI, A. C.; OTTO, R.; JUNQUEIRA FRANCO, H. C.; FARONI, C. E. Stalk and sucrose yield in response to nitrogen fertilization of sugarcane under reduced tillage. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 48, n. 1, p. 88–96, 2013.

FRANCA, M. A. **Micropropagação de cana-de-açúcar cultivar RB966928.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. 64f. Curitiba, 2016.

FRANCO, H. C. J. TREVELIN, P. C. O.; FARONI, C. E.; VITTI, A. C.; OTTO, R. Stalk yield and technological attributes of planted cane as related to nitrogen fertilization. **Scientia Agrícola**, v. 67, p. 579-590, 2010.

FRANZÉ, R. V.; TEZORE, J. V.; QUEIROZ, A. L. P.; VESCOVE, H. V.; MADALENO, L. L. Perfilamento em cana-de-açúcar sob diferentes manejos hídricos. **Anais... II Simpósio de Tecnologia Sucoenergética e de Biocombustíveis. Ciência & Tecnologia: Fatec-JB, Jaboticabal**, v. 6, p. 89-94, 2014.

FREITAS, G. A.; SILVA, R. S.; BARROS, H. B.; VAZ-DE-MELO, A.; ABRAHÃO, A. P. Produção de mudas de alface em função de diferentes combinações de substratos. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 44, n.1, p. 159-166. 2013.

GALDOS, M. V.; CERRI, C. C.; LAL, R.; BERNOUX, M.; FEIGL, B.; CERRI, C. E. P. Net greenhouse gas fluxes in Brazilian ethanol production systems. **GCB Bioenergy**, v. 2, n. 1, p. 37–44, fev. 2010.

GARCIA, J.; VITORINO, R.; AZANIA, C. A. M.; SILVA, D.; BELUCI, L. R. Inoculação de bactérias diazotróficas no desenvolvimento inicial de cana-de-açúcar, variedade RB 867515. **Nucleus**, v.10, n.1, P.99-108. 2013.

GASCHO, G. J.; SHIH, S. F. Sugarcane. In: TEARE, I.D.; PEET, M. M. **Crop-water Relations**. New York: John Wiley. 1983. 547 p.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: the Technology**. 2nd ed London: Hardcover, p.98-165, 1993.

GEORGE, E. F. The Components of Plant Tissue Media II. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Netherlands, Springer. V.1,p.115-174, 2008.

GILLIS, M.; DOBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERSTERS, K. Taxonomic relationships between (*Pseudomonas rubrisubalbicans*, some clinical isolates (ef group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and (*Aquaspirillum autrophicum*. **Abstract** In: nitrogen fixation (M, POLSINELLI, R; MATERASSI AND M. VICENZI, EDS), kluwer academic publishers. p. 292 – 294, 1991.

GILLIS, M.; KERSTERS, K.; HOET, D. B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R. M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K. R. S.; DOBEREINER, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp nov., a acetic acid bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 39, p. 361 – 364, 1989.

GÍRIO, L. A. S. **Eficiência agronômica de bactérias diazotróficas na cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Unesp. Jaboticabal, SP. 60p. 2014.

GÍRIO, L.A. da S.; 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.

GOMIDE, D. W. G. **Influência do número de subcultivos na multiplicação *in vitro* e na aclimatização de plantas micropropagadas de morangueiro**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Passo Fundo. 93p. 2004.

GONÇALVES, A.L. recipientes, embalagens e acondicionamento de mudas de plantas ornamentais. In: MINAMI, K. (Ed.) **Produção de mudas de alta qualidade em horticultura**. São Paulo: T.A Queiroz, 1995. 18p.

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

GRATTAPAGLIA, D.; MAHADO, M. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa - CNPH, 1998. p. 183-260.

GRUSZYNSKI, C. **Resíduo agro-industrial "Casca de Tungue" como componente de substrato para plantas**. 2002. 99f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L.; JACOB-NETO, J. Viabilidade do inoculante turfoso produzido com bactérias associativas e molibdênio. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 1, p. 10-15, 2013.

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

HERMANN, E. R.; CÂMARA, G. M. S. Um método simples para estimar a área foliar de cana-de-açúcar. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 17, n. 1, p. 32-34, 1999.

HOFFMANN, A. Aclimação de mudas produzidas in vitro e in vivo. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 216, p. 21-24, 2002.

HUERGO, L.F. **Regulação do metabolismo do nitrogênio em *Azospirillum brasilense***. 2006. Tese (Doutorado) Ciências Bioquímicas, Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2006. 170 p.

ICRISAT – International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. Sustainable Sugarcane Initiative. **Training Manual**. Andhra Pradesh, Índia, 2009.

JADOSKI, C.J.; TOPPA, B.E.V.; JULIANETTI, A.; HULSBOF, T.; ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. Physiology development in the vegetative stage of sugarcane. **Pesquisa aplicada e agrotecnologia**, [S.l.], v. 3, n. 2, 2010.

JORIS, H. A. W. **Nitrogênio na produção de cana-de-açúcar: aspectos agrônômicos e ambientais**. Tese (Doutorado) Instituto Agrônômico de Campinas. Campinas, SP. 2015. 135 p.

KAMPF, N. A. Análise física de substratos para plantas. **Boletim Informativo – Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 1, p. 5-7, 2001.

KÄMPF, N. A.; TAKANE, R. J.; SIQUEIRA, P. T. V. **Floricultura: técnicas de preparo de substratos**. Brasília - DF, LK Editora e Comunicação, 2006.

KANASHIRO, S. **Efeito de diferentes substratos na produção da espécie *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker em vasos**. 1999. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1999.

KLEINGESINDS, C. K. **Efeito da inoculação de uma bactéria endofítica fixadora de nitrogênio (*Acinetobacter* sp. IC117) no desenvolvimento da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. variedade SP791011)**. Dissertação (Mestrado) - Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

KRIKORIAN, A.D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W.M.; MROGINSKY, L.A. (Eds.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p.41-77.

LANDELL, M.G.A.; SILVA, M.A. As estratégias de seleção da cana em desenvolvimento no Brasil. *Visão Agrícola*, v.1, 18- 23, 2004.

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

LEE, T. S. G. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.10, p. 47-55, 1987.

LEE, S.; FLORES-ENCARNACIÓN, M.; CONTRERAS-ZENTELLA, M.; GARCIAFLORES, L.; ESCAMILLA, J. E; KENNEDY, C. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations

in cytochrome c biogenesis genes. **Journal of Bacteriology**. v. 186, n. 16, p. 5384 – 5391, 2004.

LEME, E. J. A.; MANIERO, M. A.; GUIDOLIN, J. C. Estimativa da área foliar da cana-de-açúcar e sua relação com a produtividade. **Caderno Planalsucar**, Piracicaba, v. 2, n. 1, p. 322, 1984.

LEMOS, E. E. P. Micropropagação da cana-de-açúcar. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. p. 279-308.

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

LIN, S. Y.; HAMEED, A. SHEN, F. T.; LIU, Y. C.; HSU, 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. 1149-62. 2014.

LIMA, C. J. G. S.; OLIVEIRA, F. A.; MEDEIROS, J. F.; OLIVEIRA, M. K. T.; GALVAO, D. C.; Avaliação de diferentes bandejas e substratos orgânicos na produção de mudas de tomate cereja. **Ciência Agrônômica**, 40: 123-128, 2009.

LIMA, E. do V. et al. Adubação NK no desenvolvimento e na concentração de macro-nutrientes no florescimento do feijoeiro. **Scientia Agrícola**, v.58, p.125-129, 2001.

LIMA, F. B. F. **Resíduos da indústria sucroenergética como componentes de substratos para produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado) – Ciência do Solo, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2016.

LORENZO, J. C.; GONZALES, B. L.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in a improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.54, n. 197-200, 1998.

LUCAS, M.A.K.; SAMPAIO, N.V.; KOHN, E.T.; SOARES, P.F.; SAMPAIO, T.G. Avaliação de diferentes composições de substratos para a aclimação de mudas de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch). **Revista Cient. Rural**, v.8, n.1, p. 16-23, 2002.

MACHADO, E. C. Fisiologia de produção de cana-de-açúcar. p. 56-87. In: PARANHOS, S. B. (Coord.). **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. Fundação Cargill, Campinas, v. 1, cap. 1, 1987. 432 p.

MACHADO, E. C.; PEREIRA, A. R.; FAHL, J. I.; ARRUDA, H. V.; CIONE, J. Índices biométricos de duas variedades de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n.1, p. 1323-1329. 1982.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. In: **Acad. Bras. Ciênc.** v. 55, p. 417-430.1983.

MAGRO, F.J.; TAKAO, G.; CAMARGO, P.E.; TAKAMATSU, S.Y. **Biometria em cana-de-açúcar**. [Trabalho de] LPV0684: Produção de Cana-de-Açúcar, USP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, 2011.

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

MALAVOLTA, E. **Manual de Nutrição Mineral de Plantas**. Sao Paulo: Ceres, p. 638, 2006.

MALUTA, F. A.; BORDIGNON, S. R.; ROSSI, M. L.; AMBROSANO, G. M. B.; RODRIGUES, P. H. V. Cultivo in vitro de cana-de-açúcar exposta a diferentes fontes de luz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n. 9, p. 1303-1307, 2013.

MANHÃES, C. M. C.; GARCIA, R. F.; FRANCELINO, F. M. A. HELENILSON, H. O.; COELHO, F. C. Fatores que afetam a brotação e o perfilhamento da cana-de-açúcar. **Vértices**, v.17, n.1, p. 163-181, 2015.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 17, de 21 de maio de 2007**. Aprova os Métodos Analíticos Oficiais para Análise de Substratos e Condicionadores de Solos, na forma do Anexo à presente Instrução Normativa. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=v isualizar&id=17762>. Acesso em: 03 dez. 2017.

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

MARKS, T.R.; SIMPSON, S.E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation in vitro following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. **Journal of Horticultural Science**, Ashford Kent, v.65, n.2, p.103-111, 1990.

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

MARTUSCELLO J. A.; JANK, L.; GONTIJO NETO, M. M.; LAURA, V. A.; CUNHA, D. N. F. V. Produção de gramíneas do gênero *Brachiaria* sob níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa – MG. Vol. 38, n 7, 2009

MATOSO, E. S.; DE MARCO, E.; BELLÉ, C; RODRIGUES, T. A.; SILVA, S. D. A. Desenvolvimento inicial de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **Revista Congrega Urcamp**, v.13, p. 419 – 432. 2016.

MATSUOKA, S. Botânica e ecofisiologia da cana-de-açúcar. **Apostila**: Curso de qualificação em plantas industriais – Cana-de-açúcar. Maringá: UFPR/Senar, 1996. 34p.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. Melhoria da cana-de-açúcar. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Ed. da UFV, 2005. p. 205-251.

MÁXIMO, W. P. F. **Propagação de um híbrido comercial de Eucalyptus urograndis em biorreator de imersão temporária (BIT)**. Dissertação (Mestrado) - Biotecnologia Vegetal. Universidade Federal de Lavras. 83f. Lavras, 2014.

MONACO, L.C.; SÖNDAHL, M.R.; CARVALHO, A. et al. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, p.109-126, 1977.

MORAES, V. A. **Efeito da inoculação da *Acetobacter diazotrophicus* na produtividade da cana-de-açúcar variedade SP 70-1143.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP, 112p. 1995.

MORAES, V. A.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Efeito da inoculação de *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) variedade SP70-1143, a partir de cultura de meristemas. **Anais...** XIX Congresso Brasileiro de microbiologia. Rio de Janeiro, 1997. 215 p.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen , v. 15, p. 473-497, 1962.

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**, n. 161, p.238-245, 2006.

OLIVARES, F. L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum*.** Tese (Doutorado) - Ciência do Solo – UFRRJ. 328p. 1997.

OLIVEIRA, M. L. Multiplicação in vitro de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semissólido e em biorreator de imersão temporária. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, 39, n. 91, p. 309-315, 2011.

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

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant Soil**, v.242, n.2, p. 205-215, 2002.

OLIVEIRA, G.; ANDRADE, L. F. **Bactérias Endofíticas**. Universidade Estadual de Montes Claros, Fisiologia das Plantas Cultivadas. Janaúba – MG, 2010.

OLIVEIRA, M. W.; FREIRE, F. M.; MACÊDO, G. A. R.; FERREIRA, J. J. Nutrição mineral e adubação da cana-de-açúcar. **Informe Agropecuário**, v.28, n.239, p.30-43, 2007.

OLIVEIRA, R. A.; DAROS, E.; ZAMBON, J. L. C.; WEBER, H.; IDO, O. T.; ZUFFELLATO RIBAS, K. C.; KOEHLER, H. S.; SILVA, D. K. T. Crescimento e desenvolvimento de três cultivares de cana-de-açúcar, em cana-planta, no estado do Paraná. **Scientia Agrária**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 87-94, 2004.

PANDEY, P.; MAHESHWARI, D. K. Bioformulation of *Burkholderia* sp. MSSP with a multispecies consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, CA, v.53, n. 2, p. 213-22, fev. 2007.

PENATTI, C. P. **Adubação da cana-de-açúcar - 30 anos de experiência**. 1. ed. Itu, SP, Brazil: Editora Ottoni, 347p. 2013.

PEREIRA, A. R.; MACHADO, E. C. **Análise quantitativa do crescimento de comunidades vegetais**. Campinas: IAC, 1987. 33 p. (IAC. Boletim Técnico, 114).

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

PEREIRA, G. A.; RIBEIRO, B. V.; MARCÍLIO, H. C.; SANTAELLA, M. B. Desinfestação e estabelecimento in vitro de explantes de bananeira 'IAC 2001' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.3, n.2, p.43-46, 2009.

PERIN, L. **Ecologia e diversidade de isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados à cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)** Dissertação (Mestrado) - Ciências do Solo – UFRRJ. Seropédica, 68 p. 2003.

PINHO, K. da C. **Esterilização química de meio de cultura para micropropagação de cana-de-açúcar [*Saccharum* spp.]**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia. Campos de Goytacazes – RJ, 2012. 48 p.

PÔRTO M. L. A. **Adução nitrogenada e diagnóstico do estado de nitrogênio nas culturas de abobrinha, abóbora tipo “Tetsukabuto” e pepino.** (Tese doutorado). Viçosa: UFV. 2011.

PRADO, H. Ambientes de produção em cana-de-açúcar. **Informações Agronômicas**, v. 110, Julho, 2005. Encarte Especial.

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

REIS, V.M. et.al. Eficiência agronômica do inoculante de cana-de-açúcar aplicado em três ensaios conduzidos no Estado do Rio de Janeiro durante o primeiro ano de cultivo. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 45, 22 p, 2009.

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

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

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; OLIVEIRA, A. L. M.; REIS, Jr., F. B.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants with *Acetobacter diazotrophicus*. **Plant and soil**, v. 206, p. 205–211, 1999.

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

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA, J.R.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Suma Phytopathologica**, v.12, p.16, 1986.

ROUGHLEY, R. J.; VINCENT, J. M. Growth and survival of *Rhizobium* spp. In peat culture. **The Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, UK, v.30, n. 2, p.362-376, aug.1967.

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

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

SANTI, P. H. P.; SCAVAZZA, A. L.; BELLONI, A. L.; SOARES, M. R.; CASAGRANDE, J. C.; SANTORIO, S. D.; ROCHA, K. S. S.; LAVORENTI, J. A. L.; SANTANA, C. A.; FERREIRA, J. A.; ZINA, A. C. S. Desenvolvimento de mudas pré-brotadas (MPB) de cana-de-açúcar em diferentes substratos. **Anais... X Workshop de Agroenergia Matérias-Primas**. Ribeirão Preto, SP. 2016.

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

SAWANA A.; ADEOLU M; GUPTA R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containin pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. **Front Genet**. v.5. 2014.

SCARANARI, C.; LEAL, P. A. M.; PELLEGRINO, G. Q. Estudo de simulações de microclimas em casas de vegetação visando à aclimação de mudas micropropagadas de bananeira cv Grande Naine. **Revista Brasileira de Fruticultura**. vol.30 no.4 Jaboticabal Dec. 2008.

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

SCHULTZ, N.; SILVA, J. A. DA; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; OLIVEIRA, R. P.; CHAVES, V. A.; PEREIRA, W.; SILVA, M. F. DA; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 2, p. 407–414, 2014.

SERAFIM, L.G.F. STOLF, R.; SILVA, J. R.; SILVA, L. C. F.; MANIERO, M. A. Influência do plantio mecanizado no índice de brotação da cana-de-açúcar. In: Congresso Latino Americano y Del Caribe de Ingeniería Agrícola, 10., 2012, Londrina.

Congresso Brasileiro De Engenharia Agrícola – CLIA/CONBEA, 41. 2012, Londrina. **Anais...** Londrina, p. 1- ,4, 2012.

SILVA, A. A. O. et al. Ação do *Azopirillum brasiliense* no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV 95033). **Conscientiae Saúde**, v.3, p.29-35, 2004.

SILVA, A. A. S.; DELATORRE, C. A. Alterações na arquitetura de raiz em resposta à disponibilidade de fósforo e nitrogênio. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. Lages, v.8, n.2, p. 152-163, 2009

SILVA, F. C.; BERGAMASCO, A. F.; VENDITE, L. L.; CESAR, M. A. A; SILVA, A. F. S. da. **Modelo de crescimento da cana-de-açúcar sob adubação de composto de lixo urbano**. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 2001. 4 p.

SILVA, L. G. **Estudos de colonização em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) por *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae* utilizando técnicas imunológicas**. Dissertação (Mestrado), UFRJ, Seropédica, 144 f, 1999.

SILVA, J. P. N.; SILVA, M. R. N. Noções da cultura da cana-de-açúcar. **Caderno**: Instituto Federal de Goiás, Inhumas, GO. 2012. 105 p. : il. ; 21.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotechnologia do solo**: fundamentos e perspectivas. Brasília: MEC/ABEAS; Lavras: ESAL/Faepe, 1988. p. 125-178.

SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152 p.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores: Biorreatores para células, tecidos e órgãos vegetais - Produção de mudas em larga escala. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, nº24, p. 36-41. 2002.

TEIXEIRA, J.B. **Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas**. 2005. Disponível em: <<http://www.redbio.org>> Acesso em: 24 jan. 2017.

TEIXEIRA, J.B. **Produção de mudas clonais em biofábricas e uso de biorreator**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 27p.

UFSCAR - Universidade Federal de São Carlos. **Censo varietal 2016**. São Paulo, 2016. Disponível em: <http://pmgca.dbv.cca.ufscar.br/downloads>. Acesso em: dez. 2016.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. **Levantamento da safra 2015/2016**. Disponível em: <http://www.unica.com.br/> Acesso em: 26 de dezembro de 2016.

UNKOVICH, M.; HERRIDGE, D.; PEOPLES, M.; CADISCH, G.; BODDEY, R.; GILLER, K.; ALVES, B.; CHALK, P. **Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural, 2008. 258p. (ACIAR monograph, 136).

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

VERISSIMO, M. A. A. **Desempenho agrônômico de genótipos de cana-de-açúcar no estado do Rio Grande do Sul**. Dissertação (Mestrado) Programa de PósGraduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar. Universidade Federal de Pelotas. 2012.81p.

WASKOM, R.M. et al. Monitoring nitrogen status of corn with a portable chlorophyll meter. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.27, p.545-560, 1996.

XAVIER, M. A.; LANDELL, M. G.; CAMPANA, M. P; et al. **Fatores de desuniformidade e kit de pré-brotação IAC para sistema de multiplicação de cana-de-açúcar – mudas pré-brotadas (MPB)**. Documentos IAC, n.º 113. Instituto Agrônômico, Campinas, SP. .22 p, 2014.

XAVIER, M.A.; de MENDONÇA, J.R.; SANGUINO, A. Viveiros de mudas. In: DINARDOMIRANDA, L. L; VASCONCELOS, A. C. M; LANDELL, M. G. A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, p.535-546, 2008.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K. I.; ISHIKAWA, T. The phylogeny of acetic acid based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. **Bioscience Biotechnogy and Biochemistry**, v. 61, n. 8, p. 1244 -1251,1997.

ZORZETO, T. **Caracterização física e química de substratos para plantas e sua avaliação no rendimento do morangueiro (*Fragaria X ananassa* Duch.)**. Dissertação (Mestrado). Instituto Agrônômico de Campinas. Campinas, SP, 2011.