

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Instituto de Biologia**  
**Departamento de Botânica**  
**Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal**



Dissertação

**Uso de inoculantes microbiológicos para otimização do crescimento e desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar cultivadas sob déficit hídrico**

**Luize Silva Mascarenhas**

Pelotas, 2021

**Luize Silva Mascarenhas**

**Uso de inoculantes microbiológicos para otimização do crescimento e desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar cultivadas sob déficit hídrico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Luciano da Silva Pinto

Coorientador: Sérgio Delmar dos Anjos e Silva

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

M395u Mascarenhas, Luize Silva

Uso de inoculantes microbiológicos para otimização do crescimento e desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar cultivadas sob déficit hídrico / Luize Silva Mascarenhas ; Luciano da Silva Pinto, orientador ; Sérgio Delmar dos Anjos e Silva, coorientador. — Pelotas, 2021.

98 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

LUIZE SILVA MASCARENHAS

**Uso de inoculantes microbiológicos para otimização do crescimento e desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar cultivadas sob déficit hídrico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia Vegetal.

Data da defesa: 10 de setembro de 2021.

Banca examinadora:

Dr. Luciano da Silva Pinto (Orientador)

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Sidnei Deuner

Doutor em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Lavras

Dra. Simone Ribeiro Lucho

Doutora em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Cândida Raquel Scherrer Montero

Doutora em Fitotecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Isabel Lopes Vighi

Doutora em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas

A minha família e todos que fizeram  
parte desta caminhada.  
**DEDICO**

## **Agradecimentos**

À Deus por proporcionar saúde e permitir viver, diante de tudo que acontece no mundo neste período difícil. Por iluminar cada passo dado na minha chegada até aqui. Permitindo conhecer pessoas incríveis que fazem parte de toda essa jornada.

A minha família pelo carinho e por todo apoio durante todas as fases da minha vida, em especial a minha mãe, pelo exemplo de mulher, mãe e profissional. Aos meus avós, Zeila e Francisco, pelo amor e apoio incondicional, por serem incansáveis e sempre minha segunda casa. Aos meus irmãos Lucas e Lauren, que são meus exemplos, e que foram parte fundamental deste trabalho me apoiando nos momentos difíceis. Obrigada por apoiarem todas as minhas decisões e caminharem junto ao meu lado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto, pela oportunidade que me foi concedida, pelo exemplo de profissional e ser humano. E lembro com muito carinho, que junto a prof<sup>a</sup>. Luciana foram fundamentais para o meu ingresso no grupo Agroenergia em 2016, fato que me permitiu ao longo desses 5 anos viver diversas experiências e aprendizados, e por fim desenvolver este trabalho.

Ao meu coorientador Pesq. Dr. Sérgio Delmar dos Anjos e Silva, pela amizade, pela confiança, pelos ensinamentos, pelas oportunidades concedidas que me permitiram ir além da conclusão deste trabalho, e por fazer com que eu me sentisse em casa desde o primeiro dia no grupo Agroenergia.

A Embrapa Clima Temperado pela oportunidade, pela infraestrutura e pelos aprendizados e experiências vividas, neste local que foi minha segunda casa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal (PPGFV) por todo o conhecimento adquirido, por estarem sempre dispostos a ajudar. Em especial aos professores Sidnei, Eugênia e Gustavo, que me deram apoio e suporte quando precisei me afastar, tornando possível a conclusão deste trabalho e da minha formação.

Ao Lucas, meu namorado e melhor amigo. Obrigada por ser meu ponto de paz, pela compreensão, pelo companheirismo, por ser meu maior conselheiro, tu és fundamental para a conclusão desta etapa. Sou extremamente grata por tu escolher

viver a vida comigo, compartilhando todos os momentos bons ou mais difíceis, que possamos seguir a vida assim, atravessando todas as dificuldades impostas.

A família do meu namorado, em especial aos meus sogros, Maria Eulalia e Jorge, que me acolheram como uma filha, por terem me recebido com tanto amor e afeto em um período tão difícil. E aos meus cunhados Juliana, Paulo e Davi, por todo carinho, pela nossa amizade e por permitirem fazer parte da vida dessas crianças maravilhosas que eu considero meus sobrinhos e afilhados de coração. Gi e João, tenho certeza que vocês me fazem uma pessoa melhor.

Ao Adílson, por todo incentivo, carinho e paciência, e principalmente por ser o mentor deste trabalho, por participar de cada etapa desde o planejamento até a conclusão. Sou extremamente grata pela nossa amizade e pela oportunidade de trabalharmos juntos.

A Cândida por todos ensinamentos, pela amizade, pelos momentos de descontração, por todo auxílio desde o período como IC até este momento.

A Thaís e a Lili, duas mulheres incríveis, companheiras dessa trajetória, cuja a força me inspira. Obrigada por fazerem parte da minha formação e da condução deste trabalho. Agradeço por permanecerem sempre ao meu lado, por todas as palavras de apoio e incentivo, e principalmente pelas lembranças compartilhadas.

Aos colegas que passaram pelo grupo Agroenergia ao longo desses 5 anos, pelos aprendizados e pela amizade. Em especial ao William Antunes, William Osterkamp e Jorge, obrigada por todo o auxílio no desenvolvimento dos meus trabalhos, pelos momentos que vivemos e pelas memórias que compartilhamos.

Aos colegas Isabel Vighi, Amilton Seixas Neto, Alessandra Neis, Chrislaine Yonara, Simone Lucho, obrigada pelos momentos divididos, troca de experiências, pelos conselhos e por todo auxílio nas análises deste trabalho.

A Prof<sup>a</sup>. Luciana BiccaDode, minha primeira orientadora, pelas oportunidades e incentivo que me trouxeram até aqui. Pela nossa amizade e mais ainda pela nossa conexão, que transcende o que é explicável. Por todos os ensinamentos que sempre irão além dos “muros da Universidade”. Eu sempre serei grata pela nossa amizade e por toda a tua contribuição e incentivo na minha vida acadêmica, pessoal e profissional.

As minhas amigas, Alice, Hanelore, Rafaela e Victoria, que apesar da distância sempre se fizeram presentes, por todo carinho e incentivo de sempre.

A todos que de alguma forma contribuíram para o meu amadurecimento pessoal e profissional, e fizeram parte dessa caminhada, meus mais sinceros agradecimentos.

**Muito obrigada!**

*“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós!”*

Chico Xavier

## Resumo

MASCARENHAS, Luize Silva. **Uso de inoculantes microbiológicos para otimização do crescimento e desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar cultivadas sob déficit hídrico.** 2021. 98f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das culturas de maior importância agroindustrial no cenário nacional. A deficiência hídrica afeta negativamente o desempenho produtivo da espécie, principalmente na fase vegetativa. A utilização de microrganismos como inoculantes é uma estratégia importante para mitigar os efeitos de diferentes tipos de estresse no crescimento e desenvolvimento das plantas. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de inoculantes microbiológicos no desenvolvimento inicial de genótipos de cana-de-açúcar sob déficit hídrico. Dessa forma, foram conduzidos dois experimentos: (i) o primeiro objetivou verificar a resposta de genótipos de cana-de-açúcar frente a inoculação com bactérias diazotróficas e rizobactéria promotora do crescimento vegetal; (ii) o segundo teve como objetivo avaliar o efeito dos inoculantes no desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar sob déficit hídrico. Para tal, foram utilizados três genótipos de cana-de-açúcar, sendo estes: RB867515, RB966928 e RB016916, combinados a três inoculantes: Inoculante 1: Aprinza® (*Nitrospirillum amazonense*); 2: coquetel com cinco estirpes de bactérias diazotróficas (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *Burkholderia tropica*, *Gluconacetobacte rdiazotrophicuse*, *Nitrospirillum amazonense*); 3: rizobactéria (*Exiguobacterium acetylicum*). Foram avaliadas as seguintes variáveis: massa fresca e seca da parte aérea e massa fresca e seca total; comprimento e altura de planta; diâmetro do colmo; número de folhas verdes; área foliar; índice de clorofila; parâmetros fotossintéticos; peso seco de folhas, peso seco de colmos e peso seco total. Na fase de mudas observou-se interação entre genótipo x inoculantes, com combinações específicas que permitem a substituição do uso de nitrogênio como fertilizante, a inoculação promove ganhos significativos em características importantes como comprimento e altura de planta, diâmetro do colmo, área foliar e índice de clorofila. Em relação a tolerância ao déficit hídrico as respostas mais relevantes foram observadas para o inoculante composto pela mistura de bactérias diazotróficas (inoculante 2), que promoveu o maior índice de clorofila para todos os genótipos no déficit hídrico. Foi observada de forma expressiva a interação na combinação entre inoculante comercial Aprinza® (inoculante 1) e genótipo RB966928, sendo que este inoculante apresentou destaque no regime irrigado para a maioria das variáveis avaliadas. De modo geral, a inoculação promove o crescimento das plantas de cana-de-açúcar e influência na tolerância ao déficit hídrico.

**Palavras-chave:** *Saccharum* spp.; bactérias diazotróficas; rizobactéria; estresse abiótico.

## Abstract

MASCARENHAS, Luize Silva.. 2021. 98f. Use of microbiological inoculants to optimize the growth and development of sugarcane plants cultivated under water deficit. Dissertation (Master's degree) – Post-Graduation Program in Plant Physiology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

Sugarcane (*Saccharum* spp.) is one of the most important agro-industrial crops in the national scenario. Water deficit negatively affects the productive performance of the species, especially in the vegetative phase. The use of microorganisms as inoculants is an important strategic tool to mitigate the effects of different types of stress on plant growth and development. In this sense, the aim of this study was to evaluate the effect of microbiological inoculants on the initial development of sugarcane genotypes under water deficit. Thus, two experiments were carried out: (i) the first objective was to verify the response of sugarcane genotypes to inoculation with diazotrophic bacteria and plant growth-promoting rhizobacteria; (ii) the second aimed to evaluate the effect of inoculants on the development of sugarcane plants under water deficit. For this purpose, three sugarcane genotypes were used, namely: RB867515, RB966928 and RB016916, combined with three inoculants: Inoculant 1: Aprinza® (*Nitrospirillumamazonense*); 2: cocktail with five strains of diazotrophic bacteria (*Herbaspirillumrubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *Burkholderiatropica*, *Gluconacetobacterdiazotrophicus* and *Nitrospirillumamazonense*); 3: rhizobacteria (*Exiguobacteriumacetylicum*). The following variables were evaluated: aerial fresh and dry mass and total fresh and dry mass; plant length and height; stem diameter; number of green leaves; leaf area; chlorophyll index; photosynthetic parameters; leaf dry weight, stem dry weight and total dry weight. In the seedling phase an interaction was observed between genotype x inoculants, with specific combinations that allow the substitution of the use of nitrogen as fertilizer, inoculation promotes significant gains in important characteristics such as plant length and height, thatch diameter, leaf area and chlorophyll index. Regarding tolerance to water deficit, the most relevant responses were observed for the inoculant composed by the mixture of diazotrophic bacteria (inoculant 2), which promoted the highest chlorophyll index for all genotypes in water deficit. The interaction between the commercial inoculant Aprinza® (inoculant 1) and the genotype RB966928 was significantly observed, and this inoculant stood out under irrigation for most of the variables evaluated. In general, inoculation promotes sugarcane plant growth and influences tolerance to water deficit.

**Keywords:** *Saccharum* spp.; diazotrophic bacteria; rhizobactéria; abiotic stress.

## Lista de Figuras

- Figura 1-** Massa fresca de parte aérea (MFPA, g) e massa seca de parte aérea (MSPA, g) para três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes, 30 dias após a inoculação (DAI). C (Controle sem Inoculação); I1 (Inoculante 1- *Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- Rizobactéria *Exiguobacterium acetylicum*). .....41
- Figura 2-** Massa fresca total (MFT, g) e massa seca total (MST, g) para três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes, 30 dias após a inoculação (DAI). C (Controle sem Inoculação); I1 (Inoculante 1- *Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- Rizobactéria *Exiguobacterium acetylicum*). .....42
- Figura 3-** Comprimento de planta (cm) de três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes microbiológicos aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI). C (Controle sem Inoculação); CN (Controle com Nitrogênio); I1 (Inoculante 1- *Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- Rizobactéria *Exiguobacterium acetylicum*). .....44
- Figura 4-** Altura de planta (cm) de três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes microbiológicos aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI). C (Controle sem Inoculação); CN (Controle com Nitrogênio); I1 (Inoculante 1- *Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- Rizobactéria *Exiguobacterium acetylicum*). .....46
- Figura 5-** Diâmetro do colo (mm) de três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes microbiológicos aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI). C (Controle sem Inoculação); CN (Controle com Nitrogênio); I1 (Inoculante 1- *Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- Rizobactéria *Exiguobacterium acetylicum*). .....47
- Figura 6-** Área foliar (cm<sup>2</sup>) de três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes microbiológicos aos 60 e 90 dias após a inoculação (DAI). C (Controle sem Inoculação); CN (Controle com Nitrogênio); I1 (Inoculante 1-

*Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- Rizobactéria *Exiguobacterium acetylicum*). .....49

**Figura 7-** Índice de clorofila (SPAD) de três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes microbiológicos aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI). C (Controle sem Inoculação); CN (Controle com Nitrogênio); I1 (Inoculante 1- *Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- Rizobactéria *Exiguobacterium acetylicum*). .....51

**Figura 8-** Número de folhas verdes e teor de clorofila (CLF, SPAD) para três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes e regimes hídricos. C (Controle sem Inoculação); CN (Controle com Nitrogênio); I1 (Inoculante 1- *Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- Rizobactéria *Exiguobacterium acetylicum*).....61

**Figura 9-** Taxa de assimilação líquida (A -  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), transpiração (E -  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e condutância estomática (gs -  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) para três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes e regimes hídricos. C (Controle sem Inoculação); CN (Controle com Nitrogênio); I1 (Inoculante 1- *Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- Rizobactéria *Exiguobacterium acetylicum*).....63

**Figura 10-** Altura de plantas (cm), número de folhas verdes e área foliar ( $\text{cm}^2$ ) para três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes e regimes hídricos. C (Controle sem Inoculação); CN (Controle com Nitrogênio); I1 (Inoculante 1- *Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- Rizobactéria *Exiguobacterium acetylicum*). .....66

**Figura 11-** Peso seco do colmo (PSC, g), peso seco de folhas (PSF, g), peso seco de planta (PSP, g), avaliados em três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes e regimes hídricos. C (Controle sem Inoculação); CN (Controle com Nitrogênio); I1 (Inoculante 1- *Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- Rizobactéria *Exiguobacterium acetylicum*).....68

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1-</b> Variedades de cana-de-açúcar indicadas para cultivo no Rio Grande do Sul. .....	21
<b>Tabela 2-</b> Descrição da metodologia de preparo das soluções para imersão dos minitoletes. ....	37
<b>Tabela 3-</b> Resumo da análise de variância para variáveis MFPA, MSPA, MFT e MST avaliadas em três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes. .....	39
<b>Tabela 4-</b> Resumo da análise da variância para taxa de assimilação líquida (A), transpiração (E), condutância estomática (gs), clorofila (CLF) e número de folhas verdes (NFV) para três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes e regimes hídricos. ....	60
<b>Tabela 5-</b> Resumo da análise da variância para altura de planta (ALT, cm), área foliar (AF), e número de folhas verdes (NFV), para três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes e regimes hídricos.....	65
<b>Tabela 6 -</b> Resumo da análise da variância para peso seco do colmo (PSC, g), peso seco de folhas (PSF, g), peso seco de planta (PSP, g), avaliados em três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes e regimes hídricos. ....	67

## Sumário

<b>2. Revisão bibliográfica</b> .....	19
<b>2.1. Cana-de-açúcar</b> .....	19
<b>2.2. Estresse abiótico</b> .....	21
<b>2.2.1 Déficit hídrico</b> .....	22
<b>2.3. Bactérias promotoras do crescimento vegetal</b> .....	25
<b>2.3.1 Gênero <i>Gluconacetobacter</i></b> .....	30
<b>2.3.2 Gênero <i>Herbaspirillum</i></b> .....	31
<b>2.3.3 Gênero <i>Azospirillum</i></b> .....	31
<b>2.3.4 Gênero <i>Burkholderia</i></b> .....	32
<b>4. CAPÍTULO I. Desenvolvimento de mudas de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes bactérias promotoras de crescimento</b> .....	35
<b>4.1 Introdução</b> .....	35
<b>4.2 Metodologia</b> .....	36
<b>4.3 Resultados</b> .....	39
<b>4.4 Discussão</b> .....	52
<b>4.5 Conclusões</b> .....	55
<b>5. CAPÍTULO II. Efeito do uso de inoculantes microbiológicos na tolerância ao déficit hídrico em plantas de cana-de-açúcar</b> .....	56
<b>5.1 Introdução</b> .....	56
<b>5.2 Metodologia</b> .....	58
<b>5.3 Resultados</b> .....	60
<b>5.4 Discussão</b> .....	70
<b>5.4 Conclusões</b> .....	74
<b>6. Considerações finais</b> .....	75
<b>7. Referências</b> .....	77

## 1. Introdução

As previsões climáticas apontam para o aumento do aquecimento global nas próximas décadas e conseqüentemente um cenário com aumento da frequência e intensidade dos períodos de seca (IPCC, 2018). Este é um dos fenômenos naturais que mais impactam a produtividade agrícola, sendo um fator ambiental limitante ao desenvolvimento das plantas.

A cana-de-açúcar é uma das culturas com maior destaque mundial, apresentando grande importância econômica, social e ambiental, é uma das principais commodities agrícolas em termos de produção (DEVOS, 2010). O grande diferencial da espécie está associado as diversas aptidões, podendo ser utilizada, tanto para produção de açúcar, quanto para a produção de biocombustíveis. A partir desse ponto de vista, destaca-se principalmente pela produção de etanol, um combustível renovável com crescente potencial de utilização, visando a substituição dos combustíveis fósseis. Além disso, o potencial energético da cana-de-açúcar não se limita apenas a produção de etanol, podendo ser utilizado também para cogeração de energia (TROMBETA; CAIXETA FILHO, 2017).

Os principais fatores que influenciam o desenvolvimento e a produtividade da cana-de-açúcar são a temperatura do ar, disponibilidade hídrica e radiação solar (VIANNA; SENTELHAS, 2014), apresentando algumas exigências quanto às condições meteorológicas, na fase de brotação (temperatura ideal), perfilhamento (disponibilidade de água e intensidade de luz) e crescimento (estimulado por luz, umidade e calor) (BRUNINI, 2008). Em relação a maturação, para o maior acúmulo de sacarose, as condições climáticas (déficit hídrico e frio) contribuem para que haja repouso fisiológico e acúmulo de sacarose nos colmos (ANDRADE, 2006).

A baixa disponibilidade hídrica desencadeia alterações em parâmetros de crescimento das plantas, afetando negativamente o desenvolvimento e o desempenho produtivo das mesmas, sendo apontada como a principal causa da redução da produtividade dos cultivos agrícolas. A dimensão do impacto causado pelo déficit hídrico na produtividade agrícola ocorre conforme a fase de desenvolvimento da planta (RESENDE et al., 2008). Segundo Almeida et al. (2008) e Gava et al., (2011), a necessidade hídrica da cana-de-açúcar altera-se

de acordo com o período de sua fase vegetativa de desenvolvimento e é influenciada pelas condições ambientais, pelo genótipo, manejo agrícola e período de plantio. O déficit hídrico na espécie pode reduzir em até 60% a produtividade de colmos e de açúcar (BASNAYAKE et al., 2015).

Dados recentes apontam para uma queda na produção de cana-de-açúcar no Brasil em função dos efeitos climáticos adversos da estiagem durante o ciclo produtivo da cana-de-açúcar, bem como das baixas temperaturas registradas em junho e julho deste ano. Como consequência a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2021) indica que deve ocorrer uma redução de aproximadamente 10% na produção de cana-de-açúcar, com estimativa que sejam colhidos 592 milhões de toneladas.

A região sul do Brasil apresenta diferenciação climática bem definida entre as estações do ano. O Rio Grande do Sul possui clima temperado úmido, com chuvas bem distribuídas ao longo do ano, entretanto nas últimas décadas tem sofrido com períodos significativos de escassez hídrica (SILVA, 2015). Nesse sentido, os períodos de deficiência hídrica concentram-se especialmente no verão, onde a precipitação pluvial não atende à demanda evaporativa da atmosfera. Dessa forma, o período de escassez hídrica no Rio Grande do Sul coincide com o período de maior demanda hídrica da cana-de-açúcar (HÄRTER, 2018).

Diversos trabalhos apontam que a utilização de microrganismos como inoculantes pode ser considerada uma ferramenta estratégica importante para mitigar os efeitos de diferentes tipos de estresse que acometem o crescimento e desenvolvimento das plantas (DIMKPA; WEINAND; ASCH, 2009; YANG; KLOEPPER; RYU, 2009; GROVER et al., 2011; KASIM et al., 2013; FUKAMI; CERZINI; HUNGRIA, 2018). Dessa forma, microrganismos benéficos podem melhorar o desempenho das plantas em condições de estresse e consequentemente aumentar a produtividade dos cultivos (MARANHÃO et al., 2019).

As bactérias promotoras do crescimento vegetal atuam através de mecanismos como produção de fitormônios, solubilização de fosfatos, produção de sideróforos, além da fixação biológica de nitrogênio. Tais características influenciaram a utilização de diversas bactérias diazotróficas como inoculantes

em cultivos de importância agronômica como cana-de-açúcar (SCHULTZ et al., 2012; VARGAS et al., 2014; MATOSO et al., 2020) milho (VASCONCELOS et al., 2016; ALVES; SOBRAL; REIS, 2020), trigo (NABTI et al., 2010), arroz (JARDIM et al., 2018).

Diante do exposto, verifica-se a importância de estudos sobre a interação benéfica entre microrganismos e plantas, e seus efeitos nos mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares para tolerância ao déficit hídrico. Baseado neste contexto, este trabalho considera como hipóteses que (I) a inoculação de bactérias diazotróficas e rizobactérias otimiza o crescimento e desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar; e (II) a inoculação com bactérias diazotróficas e rizobactérias promovem maior tolerância ao déficit hídrico.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas de importância econômica mundial e é destaque no cenário agroindustrial nacional. O cultivo da espécie foi introduzido no país durante o século XVI, sendo utilizada principalmente para produção de açúcar (VERISSÍMO, 2012). O Brasil é historicamente o maior produtor de cana-de-açúcar, sendo atualmente o líder na produção da cultura. Segundo dados disponibilizados CONAB (2021), a cana-de-açúcar apresentou área colhida estimada em 8,62 milhões de hectares e rendimento médio de 76t ha<sup>1</sup> na safra 2020/21, com produção total de 654,8 milhões de toneladas.

A cana-de-açúcar é uma gramínea de clima tropical pertencente à família *Poaceae*, desenvolve-se na forma de touceiras, com formação de perfilhos (SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008). A parte aérea é constituída por colmos (segmentados em nós e entrenós), folhas e inflorescências, e por uma parte subterrânea, constituída por raízes e rizomas (MARAFON, 2012). Devido a estrutura tipo rizoma sob o rés do solo, a cana rebrota sempre que a parte aérea for cortada, sendo a nova brotação conhecida como soqueira (MATSUOKA, 1996; IDO, 2003; ANTUNES, 2015).

O metabolismo da cana-de-açúcar é do tipo C4, com alta eficiência para produção de fitomassa e no uso de recursos como água e nitrogênio (SMIT; SINGELS, 2006; SAGE et al, 2013). Na fotossíntese C4 ocorre a separação espacial da aquisição e redução do carbono em dois tipos de células: as células do mesófilo e as células da bainha. As plantas com este tipo de metabolismo, apresentam um mecanismo de concentração de CO<sub>2</sub> nas células do mesófilo, inicialmente fixados pela fosfoenolpiruvatocarboxilase (PEPcase), mobilizando o CO<sub>2</sub> e transportando-o na forma de compostos orgânicos de quatro carbonos (MARIN; NASSIF, 2013). Os ácidos C4 são transportados para as células da bainha, onde são descarboxilados e o CO<sub>2</sub> liberado entra no metabolismo C3, via ribulose 1-5-bifosfato (RuBP) (MACHADO et al., 2013).

A crescente preocupação com a questão ambiental e a valorização de fontes alternativas para substituição de combustíveis fósseis, associado a utilização e valorização dos subprodutos industriais do processamento da cana-

de-açúcar, influenciam forte expansão do cultivo de cana-de-açúcar no Brasil. O país destaca-se mundialmente no setor sucroenergético, como um mercado em constante expansão tanto na produção de açúcar, como na produção de etanol (RODRIGUES; ORTIZ, 2016).

A matriz energética brasileira apresenta grande destaque em relação a proporção de fontes renováveis quando comparada aos países da OCDE- Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico-, bem como a nível mundial. No ano de 2018, 45,3% da matriz energética foi formada por fontes renováveis, sendo que etanol e bagaço de cana-de-açúcar representam 38,4% das fontes renováveis que compõe a matriz energética brasileira (MME, 2019).

No estado do Rio Grande do Sul, apesar da área com cana-de-açúcar não apresentar grande expressão em relação ao cenário nacional, o cultivo desta espécie representa grande importância socioeconômica, estando vinculado principalmente a agricultura familiar e presente em aproximadamente 45 mil propriedades rurais, muitas vezes sendo considerada a principal fonte de renda (IBGE, 2006). A importância da cultura está associada a diversidade de produtos obtidos a partir do seu processamento. Além da produção de etanol e açúcar, pode ser utilizada como fonte de alimento para animais e na fabricação de produtos agroindustriais como rapadura, melado, cachaça e açúcar mascavo.

Segundo Rugeri (2015), no âmbito da agricultura familiar, a produção e a comercialização dos produtos derivados de cana-de-açúcar apresenta grande importância, pois além de contribuir para agregação e geração de renda, pode ser considerada uma oportunidade de trabalho e incentivo a permanência do agricultor no meio rural. No que se refere ao valor agregado de produtos, quando são analisados dados de valores de venda por estabelecimento, o produto que apresenta maior destaque é a aguardente de cana, chegando ao dobro do valor de queijo e requeijão, que aparecem em segundo lugar (GAZOLLA et al., 2012).

Em relação as variedades de cana-de-açúcar, estas podem ser consideradas um dos fatores mais importantes do sistema de produção, sendo que através destas é possível elevar a eficiência produtiva. No Brasil, atualmente existem três programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar, sendo estes: Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro- RIDESA (variedades RB – República do Brasil), Centro de Tecnologia

Canaveira (variedades CTC) e Instituto Agronômico de Campinas (variedades IAC). O principal objetivo dos programas de melhoramento é a obtenção de variedades com elevada rusticidade sem perder o teor de açúcar.

Além da rusticidade e teor de açúcar, a resistência a fatores bióticos e o ciclo de maturação são alvos de estudo. Em relação a maturação, as variedades podem ser classificadas em três grupos, variedades precoces, possibilitando a colheita a partir de abril, variedades de ciclo médio, com maturação entre os meses de junho a setembro e variedades de ciclo tardio, que completam o ciclo de desenvolvimento e máxima concentração de açúcar após outubro (MARIN et al., 2009).

A escolha da variedade é um dos principais fatores que afetam o desempenho produtivo da cana-de-açúcar, bem como a qualidade dos produtos obtidos a partir desta matéria-prima. Devem ser considerados alguns aspectos para a seleção das variedades, como: adaptação as condições edafoclimáticas da região; elevada produtividade e qualidade; elevado teor de açúcar; resistência à pragas e doenças, bem como o ciclo de maturação (SILVA et al., 2016). Para o Rio Grande do Sul, já foram indicadas para cultivo 12 variedades (Tabela 1).

**Tabela 1**-Variedades de cana-de-açúcar indicadas para cultivo no Rio Grande do Sul.

\*P=

<b>Variedade</b>	<b>Ciclo de maturação</b>
RB845210	M/T*
RB855156	P
RB867515	M/T
RB925268	M/T
RB925345	P
RB92579	M/T
RB935744	M/T
RB946903	P
RB965902	P
RB966928	P
RB987935	M/T
RB036088	P

precoce; M= Médio; T= Tardio.

Fonte: Silva et al., 2016.

## 2.2. Estresse abiótico

Estresses são situações e condições externas que causam algum tipo de desvantagem e/ou prejuízo aos vegetais. As plantas estão constantemente sujeitas a vários tipos de estresse, como ataque de patógenos, estresse hídrico, estresse luminoso, dentre outros (ROSADO et al., 2018). Dessa forma, a

produtividade agrícola pode ser afetada por uma série de estresses bióticos e abióticos que afetam o crescimento e desenvolvimento vegetal. Entre os principais fatores ambientais que afetam o crescimento vegetal, podem ser citados, luz, água, temperatura, disponibilidade de nutrientes no solo e 21 toxinas (metais pesados e salinidade). As alterações desses fatores, além dos limites normais, em geral têm consequências bioquímicas e fisiológicas negativas para as plantas (TAIZ; ZEIGER; MOLLER; MURPHY, 2017).

Os estresses ambientais são fatores limitantes para o desenvolvimento de diversas espécies, reduzindo a produtividade e limitando a expansão das culturas para novas áreas. O estresse causa mudanças e respostas em todos os níveis funcionais do organismo causando desvio significativo das condições ótimas para a vida podendo ser reversíveis a princípio ou tornarem-se permanentes (LARCHER, 2000)

As plantas são organismos sésseis que necessariamente desenvolveram estratégias e mecanismos de proteção para suportarem ambientes desfavoráveis e muitas vezes extremos, enquanto disponibilizam recursos para completar seu ciclo de vida. Dessa forma, as plantas têm que desenvolver diferentes estratégias e mecanismos de adaptação fisiológica as diferentes condições de cultivo. Para isso, os vegetais podem produzir alterações metabólicas, fisiológicas e anatômicas para contrapor os efeitos do estresse abiótico. Esses mecanismos compreendem a capacidade de acumular metabólitos e proteínas de proteção, regular crescimento, morfogênese, fotossíntese, transporte através da membrana, aberturas estomáticas e alocação de recursos (TAIZ; ZEIGER; MOLLER; MURPHY, 2017).

### **2.2.1 Déficit hídrico**

No geral, a produtividade dos cultivos é influenciada principalmente pelas seguintes variáveis meteorológicas: chuva, temperatura do ar e radiação solar (SENTELHAS; MONTEIRO, 2009). Entre os fatores ambientais, sabe-se que a baixa disponibilidade hídrica é apontada como um dos principais fatores que causam declínio da produtividade agrícola, afetando negativamente o

crescimento vegetal, com reduções substanciais na taxa de crescimento das plantas e no acúmulo de biomassa.

O déficit hídrico é um estresse multidimensional, que se estabelece quando a absorção de água pelo sistema radicular não atende à demanda vegetal (FAN et al., 2006). As plantas respondem ao estresse através da manipulação de processos fisiológicos, alterando fotossíntese, respiração, relações hídricas, antioxidantes e também o metabolismo hormonal. Estas alterações fisiológicas em resposta ao déficit hídrico desempenham papel fundamental na mitigação do estresse (BHARGAVA; SAWANT, 2012). O desequilíbrio causado pelo estresse abiótico desencadeia uma série de alterações, que podem ser divididas entre efeitos primários e secundários nas plantas. Os efeitos primários, são relacionadas as propriedades físicas e químicas das células, como redução da expansão celular, a redução do potencial hídrico e a desidratação celular, podendo também dar origem a efeitos secundários, como redução das atividades metabólicas, fechamento estomático, inibição fotossintética, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO'S), entre outros (TAIZ; ZEIGER; MOLLER; MURPHY, 2017; DIAS, 2018).

As respostas fisiológicas das plantas ao déficit hídrico (a nível celular, metabólico, bioquímico e fisiológico) provocadas pelo estresse, bem como o prejuízo a produtividade variam de acordo com a espécie, genótipo, tipo de solo, nutrientes, clima, intensidade do estresse e principalmente a fase fenológica em que o estresse ocorre (RAMESH, 2000; PIMENTEL, 2004; INMAN-BAMBER; SMITH, 2005). Conforme Santos e Carlesso (1998), a frequência e a intensidade do déficit hídrico são os fatores mais importantes associados a limitação da produção agrícola.

O déficit hídrico impacta diversos aspectos da fisiologia da planta, principalmente a capacidade fotossintética. Em períodos de escassez de chuva, a baixa disponibilidade hídrica induz as plantas ao fechamento estomático, conseqüentemente, reduzindo a assimilação de CO<sub>2</sub>, e prejudicando a fotossíntese (SENTELHAS; MONTEIRO, 2009). A taxa fotossintética é reduzida principalmente pelo fechamento estomático, danos na membrana e pela atividade alterada de diversas membranas, principalmente as envolvidas na síntese de ATP (FAROOQ et al., 2012).

Entre as diversas alterações ocorridas nas plantas devido à falta de água, é comum observar reduções no teor relativo de água (TRA) na folha (LAWLOR & CORNIC, 2002; AZEVEDO NETO et al., 2004; SMIT; SINGELS, 2006, PINCELLI, 2010). Outra alteração frequente é o desbalanço metabólico, causado pelo aumento da produção de ERO's, sendo uma resposta ao déficit hídrico, nociva às plantas (PIMENTEL, 2004).

Como mecanismo de tolerância, citam-se o aumento da síntese de compostos antioxidantes, ácido ascórbico, carotenos, e alguns fitormônios como o ácido abscísico, ácido salicílico e ácido jasmônico (ALI et al., 2017). Uma alteração característica de plantas tolerantes ao déficit hídrico é o fechamento estomático precoce como uma das primeiras respostas a desidratação.

O déficit hídrico acelera a biossíntese do ácido abscísico (ABA), conhecido como “hormônio do estresse”, exerce importante função na resposta da planta ao déficit hídrico diminuindo a condutância estomática para minimizar as perdas por transpiração (DAVIES; ZHANG, 1991; FAROOQ et al., 2012). O ABA atua na manutenção do status hídrico da planta através da regulação das células guardas e promoção do fechamento estomático, bem como pela indução de genes que codificam proteínas e enzimas associadas à tolerância a desidratação (ALI et al., 2017). Outros autores apontam que o ABA ainda pode ter papel na diferenciação estomática, na síntese de ceras epicuticulares, na inibição do crescimento e desenvolvimento da parte aérea (SAUTER; DAVIES; HARTUNG, 2001) e na estabilidade do aparato fotossintético (GONG; LI; CHEN, 1998).

Segundo Farooq et al. (2012), a tolerância ao déficit hídrico é um fenômeno complexo, que envolve diferentes fatores, sendo associada à regulação estomática, sistema radicular, ajuste osmótico, equilíbrio hormonal, espessura da cutícula, entre outros. Conforme apontam GRZESIAK et al. (2006), entre as razões fisiológicas que determinam as diferenças de sensibilidade e tolerância ao déficit hídrico em diferentes genótipos destacam-se a manutenção do estado hídrico dos tecidos em genótipos tolerantes, associada a redução mais rápida da abertura estomática e a limitação da transpiração; e também a remoção mais eficiente dos efeitos prejudiciais do déficit hídrico durante a reidratação.

A cana-de-açúcar é uma espécie que apresenta certa tolerância ao déficit hídrico, entretanto é altamente responsiva a irrigação (SINGH; SHUKLA; BHATNAGAR, 2007). Shaw e Innes (1965) apontam que as maiores respostas ocorrem quando a irrigação é realizada no início do desenvolvimento, o que indica maior demanda hídrica durante o período de estabelecimento e perfilhamento. Vale ressaltar que o período de perfilhamento na cana é considerado a fase de crescimento mais importante do desenvolvimento, que reflete diretamente no rendimento da cana-de-açúcar (SINGH; SHUKLA; BHATNAGAR, 2007). Ainda, a ocorrência de déficit hídrico neste período, ocasiona efeitos mais severos na diminuição das taxas de crescimento e consequentemente na produção de biomassa.

Em cana-de-açúcar uma característica comum em resposta ao déficit hídrico é o enrolamento foliar, como uma forma de reduzir a transpiração. Outras respostas comuns são a indução do crescimento radicular, inibição do crescimento do caule e da folha, senescência e redução da área foliar (INMAN-BAMBER; LAKSHMANAN; PARK, 2012).

Os autores Inman-Bambere Smith (2005) apontam que algumas cultivares de cana-de-açúcar apresentam determinadas características de adaptação ao déficit hídrico, como o fechamento estomático precoce, a queda de folhas e área foliar reduzida. O fechamento estomático precoce é uma das primeiras respostas a desidratação, sendo esta uma característica desejável, porém variável em genótipos de cana-de-açúcar, causada pela eficiente sinalização entre as raízes e as folhas (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005; MACHADO, 2009; PINCELLI, 2010).

### **2.3. Bactérias promotoras do crescimento vegetal**

Nas plantas, comunidades bacterianas podem ser encontradas em associação com diferentes tecidos, e sua atuação pode ocorrer através de processos essenciais para o desenvolvimento da planta, ou através do controle biológico, por antibiose ou pela indução de resistência sistêmica vegetal (ANDREOTE, 2007).

Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) são bactérias benéficas de vida livre de grande importância na agricultura. As BPCV podem

ser classificadas como epífitas (encontradas na superfície vegetal) ou endofíticas, capazes de colonizar o interior do vegetal, em alguma fase do seu ciclo de vida (KUMAR et al., 2017), não são fitopatogênicas, e podem atuar diretamente na promoção do crescimento ou indiretamente auxiliando no controle biológico (MARIANO et al., 2004). Um grupo importante de microrganismos, classificado entre as BPCV, são as bactérias diazotróficas, que podem estimular o crescimento vegetal através de interações diretas ou indiretas com as raízes das plantas, podendo auxiliar no desenvolvimento vegetal.

Há diversos mecanismos pelos quais as bactérias diazotróficas podem afetar diretamente o crescimento da planta, como no incremento da absorção de nutrientes, solubilização de minerais, pela fixação biológica de  $N_2$  (FBN), pela produção de ácido cianídrico, enzimas como a ACC-desaminase, fitormônios que podem interferir no crescimento das plantas, bem como promover o crescimento de raízes (SALA et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2010). Algumas dessas bactérias são capazes de apresentar mais de um mecanismo de promoção de crescimento nas plantas (AHMAD et al., 2008). As interações indiretas são aquelas relacionadas a capacidade das bactérias promotoras do crescimento diminuírem ou impedirem os efeitos de fitopatógenos, atuando como agentes de controle biológico (GLICK, 1995). Essa atuação pode ocorrer através da produção de ácido cianídrico, bacteriocinas e antibióticos, pela competição por espaço,  $Fe^{3+}$  e outros nutrientes, por indução de resistência e proteção cruzada (MARIANO et al., 2004).

Na maioria dos gêneros de bactérias endofíticas, a produção de fitormônios como auxinas, citocininas e etileno, bem como o aumento da absorção de água e nutrientes são os principais responsáveis pelo crescimento da planta (MARIANO et al., 2004). Os microrganismos endofíticos possuem a capacidade de penetrar o tecido vegetal e colonizar o hospedeiro através de aberturas e feridas, como as geradas na emergência de raízes secundárias ou abrasões geradas pelo crescimento das raízes penetrando no solo. Além disso, podem também invadir os tecidos através dos estômatos e hidatódios, ou por ferimentos causados por insetos, ou durante a colheita de frutos. Dessa forma, podendo habitar o apoplasto (QUADT-HAL LMANN et al., 1997, MAHAFFEE et al., 1997), vasos condutores (HALLMANN et al., 1997; MAHAFFEE et al., 1997)

e ocasionalmente o meio intracelular (KLOEPPER, 1996; QUADT-HALLMANN, 1996).

A introdução de bactérias benéficas pode normalizar e, em alguns casos, melhorar o desempenho da planta em ambientes estressantes, dessa forma, preservando ou até mesmo aumentando o rendimento (BENSALIM et al. 1998). Algumas espécies de microrganismos podem estar relacionadas a tolerância a estresses abióticos, induzindo ou mediando a tolerância, uma vez que são capazes de estimular a produção de substâncias osmorreguladoras. Além do ajustamento osmótico, podem estar envolvidos também na regulação da abertura e fechamento estomático, em modificações morfológicas e histológicas dos tecidos vegetais, assim contribuindo para a tolerância ao déficit hídrico. Um exemplo disso é a produção de glicina-betaína por bactérias osmotolerantes, que pode agir sinergicamente com compostos produzidos pela planta em resposta ao estresse (DIMKPA et al., 2009).

Conforme, Forchetti et al. (2007), plantas tratadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal apresentam um aumento na tolerância a estresses ambientais, incluindo o déficit hídrico. Uma hipótese para isso é um dos poucos mecanismos propostos para explicar o efeito de tolerância, onde as bactérias que contêm a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase atuam promovendo uma proteção significativa das plantas contra níveis elevados de etileno, que é aumentado durante o estresse. A principal função desta enzima é catalisar a clivagem do ACC, precursor do etileno, o que causa a redução na produção deste hormônio vegetal, atenuando os efeitos negativos do estresse (GLICK et al., 1998; 2012; 2014; FORCHETTI et al., 2007).

Estudos apontam que estirpes isoladas de uma espécie vegetal, são mais aptas a se reestabelecer nas raízes, quando inoculadas na mesma espécie (BALDANI; BALDANI, 2005, FIGUEIREDO et al., 2010). Os genótipos das plantas são importantes fatores para determinar a composição das comunidades bacterianas associadas às plantas, sendo considerado um fator chave na interação com os microrganismos e na obtenção dos benefícios causados pelas bactérias diazotróficas endofíticas (REIS et al., 2000; ANDREOTE, 2007). Muitos autores têm demonstrado a importância do genótipo da planta em associação com microrganismos, em diversas espécies além da cana-de-açúcar

(LOPES, 2013; CHAVES et al., 2015; LOPES et al., 2019), trigo (SALA et al., 2007), milho (PEREIRA et al., 2015; ZEFFA et al., 2019).

Nos últimos anos houve um grande avanço nos estudos com microrganismos do solo e na compreensão de suas funções no ecossistema, e o interesse pela utilização de microrganismos na agricultura aumentou consideravelmente, visto que podem ser considerados potenciais substitutos de produtos químicos, tanto em relação a promoção de crescimento quanto ao controle biológico de pragas e doenças, contribuindo para uma agricultura mais sustentável (SOUZA, 2001; PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; SANTOS; VARAVALLO, 2011).

Nesse sentido, surgem os inoculantes microbiológicos, uma tecnologia apontada como alternativa para agricultura ecológica e mais sustentável, a partir da utilização de microrganismos com ação promotora de crescimento ou biocontroladora. Conforme a definição legal, descrita no Decreto nº 4954/2004 (BRASIL, 2004), inoculante é todo o produto que contém microrganismos com atuação favorável ao crescimento de plantas.

Atualmente os inoculantes são desenvolvidos em duas formas físicas, sólidos, tendo como base a turfa, ou líquidos, com as bactérias estabilizadas por protetores celulares. Os inoculantes turfosos apresentam grande quantidade de sais minerais, propriedades adsorventes, que reduzem o efeito de toxinas produzidas durante o crescimento microbiano e também aumentam o tempo de prateleira dos inoculantes, quando comparados a outros produtos. Entretanto, a turfa é um recurso natural não renovável, e deve ser levado em consideração outras desvantagens da sua utilização, como a interferência no crescimento microbiano em decorrência do material de origem da turfa, o tempo de esterilização que torna o produto mais caro, além de que o produto deve ser aplicado via sementes/toletes, não ao solo (BUCHER; REIS, 2008).

Visando facilitar a difusão da tecnologia e o uso do inoculante foram desenvolvidos os inoculantes líquidos (ALBAREDA, et al., 2008). Estes atualmente são a porcentagem mais significativa no mercado de inoculantes, apresentam composição variada, contendo diferentes fontes de nutrientes, estabilizadores e protetores celulares. Quando comparado ao inoculante turfoso, possui um processo de fabricação simplificado, tendo menores custos de

produção. Além disso, o inoculante líquido permite tanto a aplicação via sementes, quanto diretamente no sulco (DENARDIN, 2006).

Diferentemente dos resultados obtidos com fertilizantes químicos, o potencial de utilização deste tipo de biotecnologia é dependente da relação entre planta e insumo biológico, sendo que os efeitos podem variar de acordo com a espécie, idade da planta, concentração e forma de aplicação do produto, tipo de solo, condições ambientais entre outros aspectos (AGUIAR, 2015).

No Brasil, desde 2008, existem inoculantes recomendados para gramíneas, sendo o primeiro indicado para o arroz e milho, contendo bactérias da espécie *Azospirillum brasiliense*, selecionadas pela Embrapa Soja e pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Em relação à cana-de-açúcar, estudos sobre a FBN nesta cultura iniciaram-se nas décadas de 60 e 70, por um grupo de pesquisadores ligados ao Centro Nacional de Pesquisas em Agrobiologia, atualmente a Embrapa Agrobiologia, que possibilitaram muitas descobertas na área, incluindo a identificação de diversas espécies de bactérias diazotróficas associadas à cana-de-açúcar, e a contribuição da FBN em até 70% em algumas variedades (SCHULTZ, 2012).

Em cana-de-açúcar, a inoculação com mistura de diferentes espécies de bactérias diazotróficas em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, contribuiu para aumento significativo no acúmulo de massa fresca nos colmos (OLIVEIRA et al., 2002). No entanto, o mesmo efeito não foi observado, quando realizada a inoculação individualizada das bactérias, quando comparado ao controle não inoculado (OLIVEIRA et al., 2002). Os mesmos autores apontam que a inoculação com um pool de cinco estirpes de bactérias diazotróficas, contribuiu significativamente para a FBN em estudos com a variedade SP70-1143, em solos de baixa fertilidade, promovendo produtividades similares às alcançadas em solos que receberam adubação nitrogenada (OLIVEIRA et al., 2006). Segundo Kleingesnds (2010), a inoculação de bactérias nesta cultura pode promover o aumento das raízes, da assimilação de CO<sub>2</sub> e também no número de folhas. O efeito da inoculação de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar também foi observado sobre o perfilhamento e a altura de plantas, em estudo com a inoculação de seis estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associadas a doses de nitrogênio (SUMAN et al., 2005).

Em 2008 foi lançado um inoculante específico para a cana-de-açúcar desenvolvido pela Embrapa Agrobiologia, que pode ser aplicado tanto em cana-planta, quanto em cana-soca. O inoculante é composto por cinco estirpes de bactérias diazotróficas: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*, abordadas a seguir:

### 2.3.1 Gênero *Gluconacetobacter*

Dentre as bactérias descritas neste gênero, existem quatro espécies fixadoras de nitrogênio atmosférico: *G. diazotrophicus*, *G. azotocaptans*, *G. johanna* e *G. kombuchae* (VIDEIRA; ARAÚJO, BALDANI, 2007).

A espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus*, isolado por Cavalcante; Döbereiner (1988), é a mais estudada em associação com a cana-de-açúcar. A *G. diazotrophicus*, foi reclassificada em *Acetobacter diazotrophicus*, a partir de estudos de homologia DNA-RNA desenvolvidos por Gillis et al., (1989), e mais tarde incorporada ao gênero *Gluconacetobacter* (YAMADA; HOSHINO; ISHIKAWA, 1997). Esta bactéria foi isolada de inúmeras variedades de cana-de-açúcar, em diversas regiões do Brasil, sendo encontrada também em outros países como Austrália, Cuba, Argentina e México (LI e MACRAE, 1991; FUENTES-RAMIREZ et al., 1993; DONG et al., 1994; BELLONE et al., 1997).

Conforme Reis et al. (1994) e Boddey et al. (1998), essa bactéria coloniza raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar em números de até  $10^6$  células  $g^{-1}$  de massa fresca. Caballero-Mellado et al. (1994; 1995), apontam que esta espécie apresenta baixa diversidade genética, e a população presente nos tecidos tende a diminuir conforme a idade da planta (SILVA, 1999; PERIN, 2003; MUÑOZ-ROJAS et al., 2003).

Apresenta ampla distribuição, e além dos efeitos benéficos associados a fixação de nitrogênio, produz hormônios de crescimento das classes de auxinas e giberelinas (LEE et al., 2004), e também apresenta potencial de atuação no controle biológico (PIÑON et al., 2001; BLANCO et al., 2005).

### 2.3.2 Gênero *Herbaspirillum*

Este gênero apresenta 11 espécies, das quais cinco são descritas como fixadoras de nitrogênio: *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *H. frisingense*, *H. lusitanum* e *H. hiltneri* (VIDEIRA; ARAÚJO, BALDANI, 2007). As espécies do gênero *Herbaspirillum* são encontradas associadas à poaceas, como cana-de-açúcar, arroz, milho, sorgo e capim elegante. O gênero *Herbaspirillum* foi descrito inicialmente junto com a primeira espécie *H. seropedicae* (BALDANI et al., 1986). As espécies deste gênero são gram-negativas e microaeróbias quando fixam nitrogênio.

Dois espécies do gênero *Herbaspirillum* fazem parte da formulação do inoculante usado para a cana-de-açúcar, *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* originalmente descrita como *Pseudomonas rubrisubalbicans* (GILLIS et al., 1991) e reclassificada por BALDANI et al. (1996).

*Herbaspirillum rubrisubalbicans* é a espécie reconhecida por causar a doença da estria mosqueada em cana-de-açúcar (CHRISTOPHER; EDGERTON, 1932; KRASILNIKOV, 1949). Entretanto, é importante observar que não há relatos de redução na produtividade da cultura, sendo que a doença só manifesta sintomas em genótipos sensíveis de cana-de-açúcar, como o B 4362, atualmente utilizado para estudos de inoculação (BALDANI et al., 1997).

### 2.3.3 Gênero *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* é considerado predominante entre monocotiledôneas como cana-de-açúcar, arroz, milho e sorgo, engloba bactérias gram-negativas, aeróbicas e não fermentativas. Estudos apontam que este gênero de bactérias possui características de grande importância econômica para agricultura, como a produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal, produção de sideróforos e a fixação biológica de nitrogênio, Patriquin et al. (1983) descobriu que este gênero tinha capacidade de fornecer grandes quantidades de N através da FBN.

São microrganismos capazes de crescer utilizando N atmosférico como única fonte de nitrogênio (HUERGO, 2006). Contudo, as fontes de nitrogênio podem ser oriundas da amônia, aminoácidos, nitrato, nitrito e nitrogênio atmosférico. As fontes de carbono preferências são carboidratos como glicose e

frutose, bem como ácidos orgânicos, como malato e piruvato (DOBEREINER, 1995).

Na composição do inoculante misto para cana-de-açúcar, a espécie que é formulada junto ao inoculante é *Azospirillum amazonense*, que foi reclassificada como *Nitrospirillum amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983; LIN et al., 2014).

#### **2.3.4 Gênero *Burkholderia***

Descrito em 1992, conta com 29 espécies descritas, colonizam diversos nichos ecológicos e são importantes componentes da comunidade microbiana do solo. Algumas espécies são descritas como fitopatogênicas e também podem provocar doenças em animais e humanos. Entretanto a maioria das espécies não são patogênicas e podem participar da promoção do crescimento vegetal através da FBN e da produção de fitormônios.

As bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia*, também são encontradas em associação com plantas da família das leguminosas, participando da formação dos nódulos. No entanto, ocorrem diferenças entre as espécies que nodulam plantas leguminosas, das que se associam a gramíneas (VANDAMME et al., 2002).

A espécie deste gênero que compõe a mistura de bactérias diazotróficas para cana-de-açúcar é *Burkholderia tropica* (REIS et al., 2004), hoje denominada *Paraburkholderia tropica*.

No ano de 2018, foi lançada uma nova solução tecnológica desenvolvida pela Embrapa Agrobiologia em parceria com outras instituições, o inoculante microbiológico denominado Aprinza<sup>®</sup>, desenvolvido especificamente para o uso em cana-de-açúcar, que contém a bactéria diazotrófica *Nitrospirillum amazonense*. O lançamento deste produto ocorreu em parceria com a empresa Basf e o inoculante Aprinza<sup>®</sup> integra o pacote tecnológico Muneo<sup>®</sup>Biokit.

### **3. Metodologia Geral**

O trabalho foi conduzido na Estação Experimental da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas-RS, foram avaliadas duas variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB966928) e um clone (RB016916) provenientes da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (Ridesa) e disponibilizados pelo Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar (PMGCA/UFPR). Desses, os primeiros ocupam a maior área cultivada no Brasil (IAC, 2019), e o clone RB016916, destaca-se com potencial para o plantio no Rio Grande do Sul (ANTUNES et al., 2017). A descrição das variedades conforme Daros et al., (2010); Daros et al., (2015); Silva et al., (2016), segue abaixo:

#### **RB867515**

A RB867515 é a variedade de cana-de-açúcar mais plantada no Brasil. Destaca-se pela rusticidade, apresenta vantagem comparativa em solos pobres, sendo o sucesso de plantio associado a possibilidade de expansão para áreas de solos de baixa fertilidade, arenosos ou com restrições hídricas. Apresenta perfilhamento médio, com colmos de diâmetro médio e alta uniformidade.

#### **RB966928**

Indicada para plantio e colheita mecanizada, a RB966928 é uma variedade de ciclo precoce, que apresenta alta produtividade, elevado perfilhamento, tanto em cana-planta quanto em cana-soca com excelente fechamento de entrelinhas. É adaptável aos diferentes ambientes de produção, obtendo boa produtividade em ambientes médios. Apresenta qualidade para colheita em início e meio de safra, com elevada riqueza (>20°Brix). Além disso possui excelente capacidade para brotação das soqueiras, elevada sanidade vegetal, e também boa performance sob condições de estresse por frio.

#### **RB016916**

O genótipo RB016916 é considerado um clone em potencial. Apresenta ciclo de maturação precoce, com alto desempenho produtivo e elevada riqueza. Ainda, conforme aponta Antunes et al., (2017), ao avaliar o desempenho produtivo de genótipos precoces de cana-de-açúcar, o genótipo RB016916 apresenta elevada estabilidade fenotípica para as variáveis tonelada de colmos por hectare (TCH) e tonelada de sólidos solúveis totais por hectare (TSSTH), e ampla adaptação aos ambientes testados.

Para verificar o efeito dos inoculantes no desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar e na promoção de tolerância ao déficit hídrico, foram testadas três diferentes inoculações, contrastados com dois controles (sem inoculação e com adubação nitrogenada). Para o inoculante 1 (I1), foi utilizado o inoculante comercial para cana-de-açúcar Aprinza<sup>®</sup>, formulado com a bactéria diazotrófica *Nitrospirillum amazonense*. O inoculante 2 (I2) formulado a partir de um coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *Burkholderia tropica*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Nitrospirillum amazonense*). O inoculante 3 (I3) é constituído por uma rizobactéria promotora de crescimento vegetal da espécie *Exiguobacterium acetylicum*, estirpe XT-38, disponibilizada pelo Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado. O trabalho foi realizado em duas fases, que serão apresentadas nos capítulos 1 e 2 desta dissertação.

## **4. CAPÍTULO I. Desenvolvimento de mudas de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes bactérias promotoras de crescimento**

### **4.1 Introdução**

A cana-de-açúcar é uma das espécies cultivadas de maior importância socioeconômica para o Brasil, sendo considerada uma alternativa ao setor de biocombustíveis, devido ao grande potencial na produção de etanol, além dos demais subprodutos. O setor sucroalcooleiro no Brasil, apresenta um grande diferencial, justamente por operar numa conjuntura positiva e sustentável, diferentemente de outros países (CONAB, 2021). A relevância deste cultivo no cenário do agronegócio brasileiro, torna fundamental a realização de um plantio de qualidade, tendo em vista que as decisões tomadas durante esse período influenciam todo o ciclo produtivo (PAULI, 2009).

Atualmente, a forma preferencial de multiplicação da cana-açúcar é através de toletes (colmos inteiros ou segmentos de colmos), sendo uma técnica utilizada há muitos anos (MAY; RAMOS, 2019). No entanto, o plantio convencional de cana-de-açúcar exige a utilização de grandes quantidades de material vegetativo, aproximadamente 20 t ha<sup>-1</sup> (MAY; RAMOS, 2019; NICCHIO et al., 2020). Associado a isto, no plantio mecanizado é comum visualizar falhas nas linhas de plantio do canavial, que podem acarretar redução da produtividade. Como alternativa ao método convencional, o Instituto Agrônomo de Campinas, desenvolveu um método de plantio através da produção de mudas pré-brotadas (MPB), que são originadas através da individualização das gemas (LANDELL et al., 2012). A utilização dos minitoletes de gema única possibilita a redução do volume de colmos utilizados e dos custos de produção, Jain et al. (2010), aponta que a técnica permite que até 80% da massa do material utilizado no plantio convencional seja economizado através da multiplicação de MPB. Além disso, este sistema propicia maior sanidade das mudas e homogeneidade das lavouras, a partir da escolha de gemas não deterioradas e livres de patógenos.

A partir do surgimento dos conceitos de sustentabilidade, os impactos negativos socioambientais passaram a ser observados de uma nova forma, exigindo também um novo padrão de desenvolvimento científico e tecnológico, e ao se observar isoladamente o setor agrícola, atualmente busca-se como

objetivo a agricultura sustentável (KHAN et al., 1997; SILVA; GOES; PUTTI, 2020).

Diante de um cenário que visa a conscientização mundial, internacionalmente estão sendo realizados muitos esforços para estabelecer uma relação mais equilibrada entre população, ambiente e componentes da produção de alimentos e energia (EMBRAPA, 2018). Nesse contexto, é importante destacar os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS), estabelecidos durante a 70ª Sessão da Assembleia Geral das Nações Unidas, que basicamente é um plano de ação, que indica 17 objetivos, estabelecendo 169 metas, que visam promover uma vida digna para todos os seres humanos, em um planeta mais próspero, equitativo e saudável. Cabe enfatizar que a agricultura e alimentação estão no centro dessa agenda mundial, e sendo assim, a utilização de bioinsumos torna-se uma alternativa para cumprir os ODS da Agenda de 2030 (VIDAL; SALDANHA; VERISSIMO, 2020).

Nesse sentido, a utilização de bactérias diazotróficas é uma alternativa viável para a redução da utilização de fertilizantes químicos que causam impactos ecológicos negativos (REIS et al., 2020), contribuindo também para o incremento da produtividade agrícola, uma vez que a associação destes microrganismos as plantas causa uma série de efeitos relacionados à síntese de substâncias reguladoras do crescimento vegetal, indução de resistência a doenças, e aumento da disponibilidade de nutrientes, sem causar impactos ao meio ambiente (SOTTERO, 2003; CARVALHO, et al., 2014; SHIN et al., 2016; MONTALDO, 2016; PANKIEVICZ, et al., 2021).

Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi verificar a resposta da inoculação com bactérias diazotróficas e rizobactéria promotora do crescimento vegetal no desenvolvimento de três genótipos de cana-de-açúcar.

## **4.2 Metodologia**

Para condução dos experimentos foram produzidas mudas a partir de minitoletes, onde foram coletados colmos de cana-de-açúcar, sendo cortados com auxílio de um podão, formando toletes de uma gema, com aproximadamente 3 cm. Após o corte, os minitoletes foram submetidos a tratamento em imersão com fungicida a base de trifloxistrobina e tebuconazol na

dose de 1 mL L<sup>-1</sup> de calda, durante três minutos, com o objetivo de eliminar microrganismos presentes na cana-de-açúcar e evitar a interferência com os inoculantes microbiológicos. A inoculação foi realizada através da imersão dos minitoletes em solução conforme recomendação para cada tratamento, como de descrito na Tabela 2:

**Tabela 2-** Descrição da metodologia de preparo das soluções para imersão dos minitoletes.

Identificação	Tratamento	Descrição do tratamento	Preparo da solução
C	Controle	Controle sem inoculação	30 minutos água não tratada
CN	Adubação Nitrogenada	Controle com adubação nitrogenada	30 minutos água não tratada
I1	Inoculante 1	Inoculante comercial Aprinza®	30 minutos em solução 100mL -12L água não tratada
I2	Inoculante 2	Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas	30 minutos, turfa diluída em 100L de água não tratada
I3	Inoculante 3	Rizobactéria <i>Exiguobacterium acetylicum</i>	30 minutos em suspensão bacteriana

Após a inoculação, os minitoletes foram plantados imediatamente em tubetes contendo substrato comercial Turfa Fértil®. As bandejas de tubetes com volume de 180 cm<sup>3</sup> cada foram mantidas em casa de vegetação com controle de temperatura (25 ± 2 °C) e umidade relativa programada para 75%. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso em esquema bifatorial (3 genótipos x 5 inoculantes), com quatro repetições.

Para o transplante, foram utilizados vasos flexíveis de polietileno com volume de 2,8 litros, com a base perfurada e preenchidos com 1,2 kg de substrato comercial Turfa Fértil®.

Com o objetivo de suprir as necessidades nutricionais das plantas foi adicionada adubação suplementar de fósforo e potássio. Para tal, foi aplicada a dose equivalente em fertilizante a 0,28 g de K<sub>2</sub>O por vaso e 0,36 g de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> por vaso. Os fertilizantes foram aplicados na forma diluída, com volume correspondente 50 mL para cada vaso.

Para o tratamento com adubação nitrogenada (controle com nitrogênio), no dia posterior ao transplante foi aplicada a dose de ureia equivalente a 0,8 g de nitrogênio por vaso. Da mesma forma que os demais nutrientes, o fertilizante foi aplicado na forma diluída, com volume correspondente a 50 mL para cada vaso.

Neste experimento foram realizadas três avaliações, aos 30 dias após a inoculação (DAI) -antecedendo o transplante das mudas-, aos 60 e 90 DAI. Vale ressaltar, que na primeira avaliação a adubação nitrogenada ainda não havia sido aplicada no tratamento controle com nitrogênio, sendo assim ambos os tratamentos foram considerados controle na avaliação inicial (30 DAI).

### **Características Avaliadas**

- **Comprimento de planta (CP, cm):** mensurado com o auxílio de uma trena centimétrica, a partir da base da planta até o ápice da folha mais longa;
- **Altura de planta (ALT, cm):** mensurado com o auxílio de uma trena centimétrica, a partir da base da planta até a primeira aurícula visível (folha +1);
- **Diâmetro do colo (DC, mm):** mensurado no segundo entrenó acima do solo, com o auxílio de um paquímetro milimétrico;
- **Área foliar (AF, cm<sup>2</sup>):** Determinada a partir da contagem do número de folhas totalmente expandidas e por medições de comprimento e largura da folha +3, mensurado com o auxílio de uma régua milimétrica. A estimativa da área foliar será calculada a partir da equação a seguir, conforme metodologia descrita por Hermann e Câmara (1999).

$$AF = C \times L \times 0,75 \times (N + 2)$$

Em que C é o comprimento da folha +1, L é a largura da folha +3, 0,75 é o fator de correção para área foliar da cultura, e N é o número de folhas abertas com pelo menos 20% de área verde.

- **Número de folhas:** realizada a partir da contagem do número de folhas abertas.
- **Índice de clorofila (CLF, Índice SPAD):** medida tomada no intervalo de 09:30 às 11:30 da manhã, realizada na porção mediana da folha +3, com

auxílio de um clorofilômetro portátil, modelo SPAD-502Plus, marca Konica Minolta®;

- **Massa fresca e seca da parte aérea (g):** coleta e pesagem da massa fresca total da parte aérea seguida da secagem em estufa a 65°C para determinação da massa seca;
- **Massa fresca e seca total (g):** estimada a partir da soma das produções de massas frescas (parte aérea e sistema radicular) e massas secas (parte aérea e sistema radicular).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, com auxílio do software Genes (CRUZ, 2013). A representação gráfica foi feita através do pacote Microsoft Office Excel (versão 2016). Para comparação de médias, foi utilizado o erro padrão da média associado a cada tratamento.

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Biomassa

A partir da análise de variância, foi verificada a significância da interação para as variáveis massa fresca de parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa fresca total (MFT) e massa seca de total (MST) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Resumo da análise de variância para variáveis MFPA, MSPA, MFT e MST avaliadas em três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes.

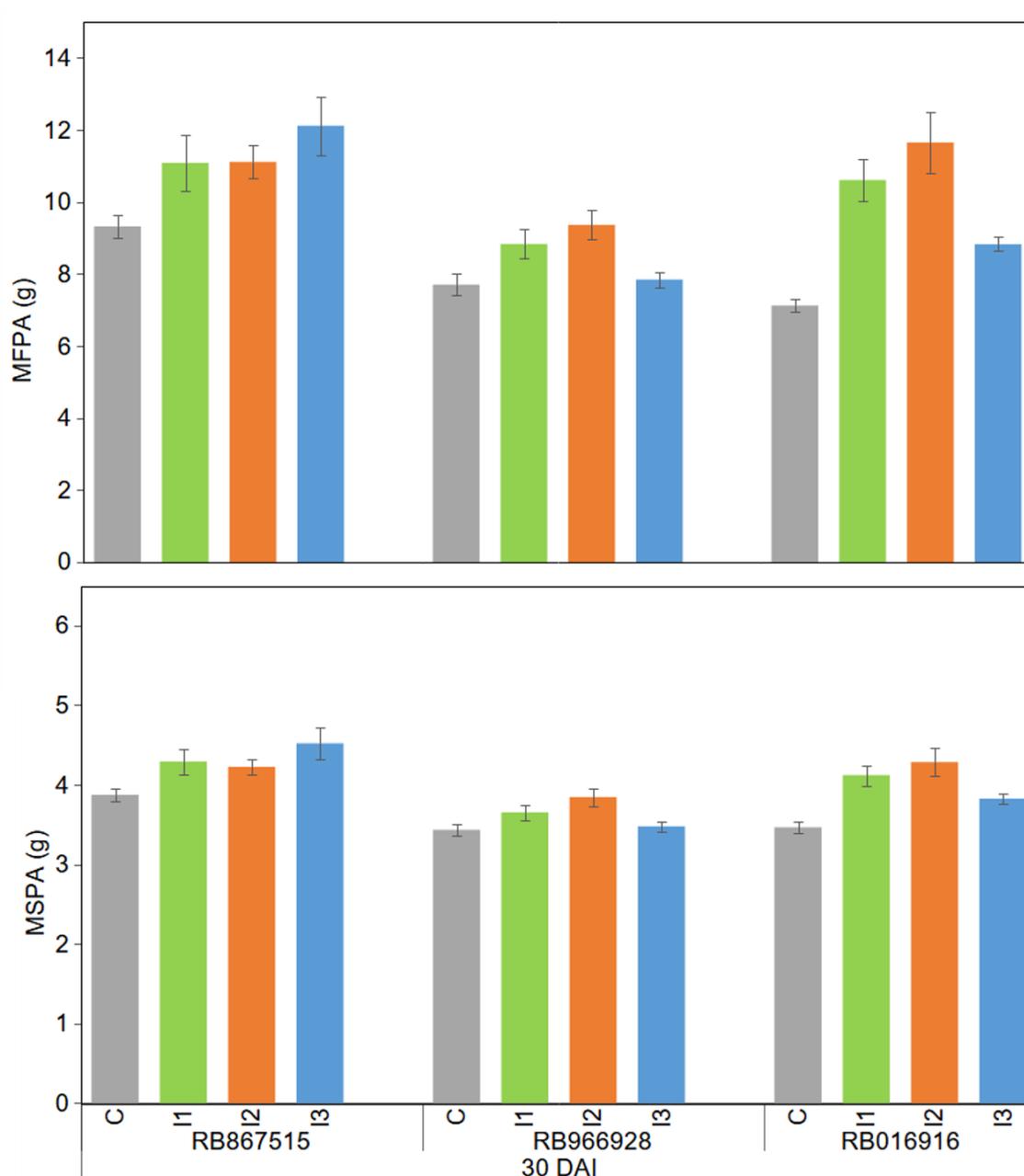
FV <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	Quadrado Médio			
		MFPA	MSPA	MFT	MST
Bloco	5	1,69	0,07	4,87	0,29
Genótipo (G)	2	36,75 **	2,34 **	33,53 **	2,59 **
Inoculante (I)	3	23,79 **	0,95 **	56,36 **	1,93 **
G X I	6	6,01 **	0,24 *	10,77 *	0,43 *
Resíduo	55	1,88	0,10	4,48	0,19
Total	71				
<b>Média</b>		9,63	3,92	15,38	6,96
<b>CV<sup>3</sup>(%)</b>		14,24	8,17	13,76	6,28

<sup>1</sup>FV: Fonte de variação; <sup>2</sup>GL: Grau de liberdade; <sup>3</sup>CV: Coeficiente de variação; \*\*, \*: significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste F; ns: não significativo.

Conforme a Figura 1, para as variáveis MFPA e MSPA, observa-se incremento na biomassa das plantas inoculadas em relação aos controles, exceto para I3 no genótipo RB966928, que não diferiu dos controles aos 30 DAI. Ainda é possível destacar a resposta benéfica das inoculações com I1 e I2 no

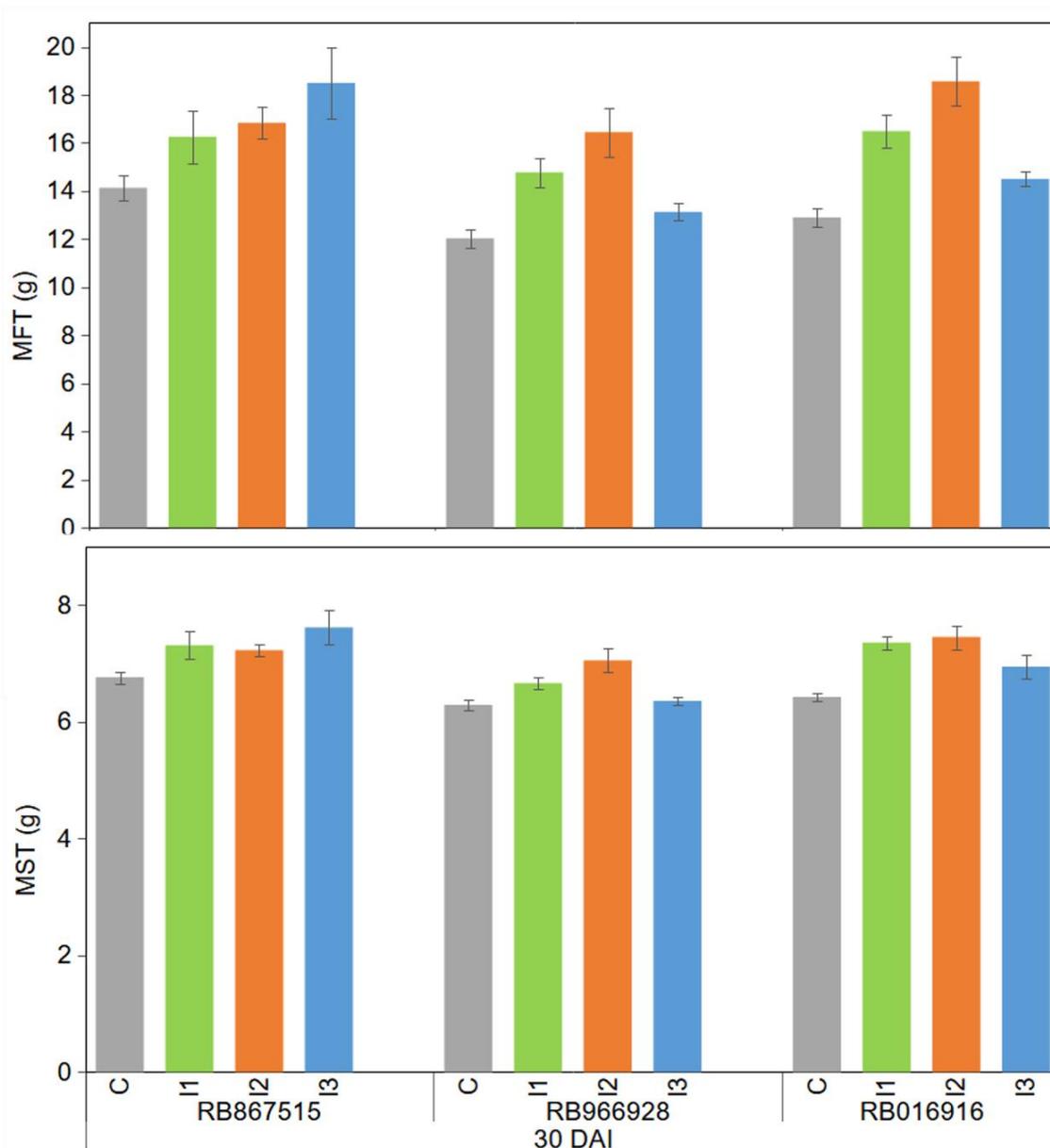
genótipo RB016916, que obtiveram incrementos próximos a 33 e 39%, respectivamente, para MFPA. Observa-se também o destaque do I3 para o genótipo RB867515, uma vez que a inoculação proporcionou aumento de 23% na MFPA.

Na mesma figura, como esperado, verificou-se que os resultados de MSPA mantiveram a mesma tendência aos encontrados para MFPA, com destaque para interação entre o genótipo RB867515 com o I3, bem como os I1 e I2 para o genótipo RB016916, que apresentaram maiores incrementos na biomassa em comparação aos respectivos controles.



**Figura 1-** Massa fresca de parte aérea (MFPA, g) e massa seca de parte aérea (MSPA, g) para três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes, 30 dias após a inoculação (DAI). C (Controle sem Inoculação); I1 (Inoculante 1- *Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- Rizobactéria *Exiguobacterium acetylicum*).

Para as variáveis MFT e MST (Figura 2), aos 30 DAI os inoculantes proporcionaram incremento de biomassa nos três genótipos avaliados. Sendo possível verificar que houve variação na resposta dos genótipos frente a inoculação. Para o genótipo RB867515, o maior aumento, tanto para biomassa verde, quanto para biomassa seca, foi verificado nas plantas inoculadas com o I3.



**Figura 2-** Massa fresca total (MFT, g) e massa seca total (MST, g) para três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes, 30 dias após a inoculação (DAI). C (Controle sem Inoculação); I1 (Inoculante 1- *Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- Rizobactéria *Exiguobacterium acetylicum*).

De forma semelhante, aos resultados obtidos para MFPA e MSPA, o genótipo RB016916 respondeu positivamente a inoculação com I1 e I2, para as variáveis MFT e MST. O I2 proporcionou incremento na massa total (fresca e seca) do genótipo RB966928, quando comparado ao controle.

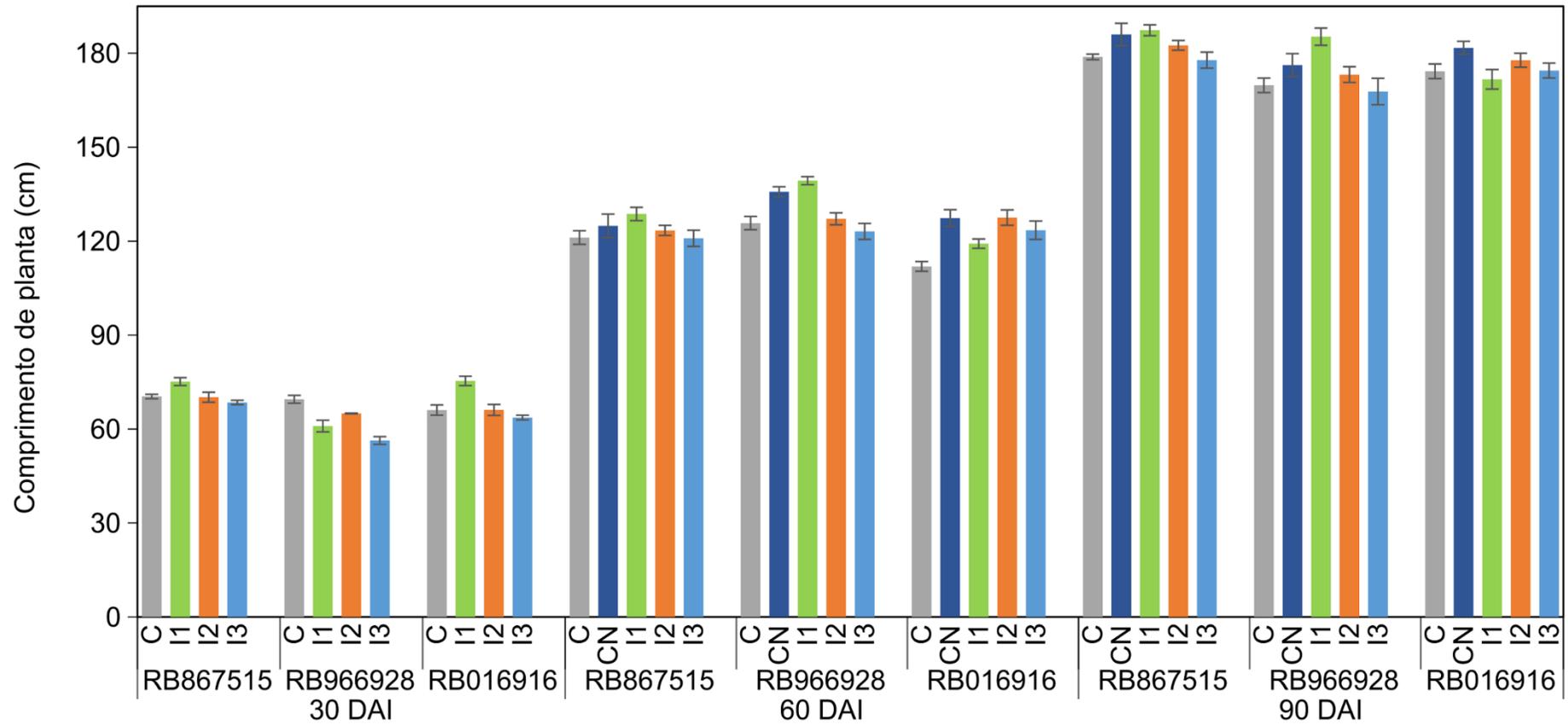
#### 4.3.2 Caracteres biométricos avaliados aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação

Em relação as avaliações biométricas realizadas neste estudo, foi observado efeito significativo da interação genótipo x inoculante para a maioria das variáveis analisadas, com exceção de número de folhas (NFV) aos 30 e 60 DAI, e diâmetro do colo (DC) aos 60 DAI, conforme Anexos (A, B, C).

Os genótipos responderam diferentemente aos inoculantes testados para os parâmetros avaliados. Ao comparar os resultados obtidos para a variável comprimento de planta (Figura 3), aos 30 DAI houve incremento nos genótipos RB867515 e RB016916 inoculados com I1. Neste período o genótipo RB966928 não foi responsivo aos inoculantes testados, apresentando médias inferiores ao controle. Ao comparar os resultados entre genótipos, é possível observar que os menores valores de comprimento de planta foram obtidos para RB966928, no I1 e I3.

Na avaliação aos 60 DAI, foi possível observar que para CP, no genótipo RB867515 apenas I1 apresentou CP superior ao controle, no entanto com valores médios semelhantes ao controle com nitrogênio, enquanto os demais não diferiram entre si. Ao observar o genótipo RB966928, o I1 proporcionou o maior CP, sendo superior aos tratamentos controle, I2 e I3. Para o genótipo RB016916, todas as inoculações foram superiores ao controle, no entanto é possível observar que I1 apresentou médias inferiores ao controle com nitrogênio, enquanto I2 e I3, obtiveram resultados semelhantes as plantas com adubação nitrogenada. Os inoculantes 2 e 3 não diferiram entre os genótipos avaliados. Por outro lado, é possível verificar que o genótipo RB966928 foi o mais responsivo ao I1, bem como a aplicação de nitrogênio.

Aos 90 DAI, destaca-se o I1 para o genótipo RB966928, que obteve o maior comprimento de planta. Em relação a resposta dos genótipos, RB867515 apresentou os maiores valores para CP, quando comparado a RB966928 tanto nos controles (com e sem nitrogênio), quanto nos inoculantes 2 e 3. Em contrapartida, na combinação com I1, RB016916 foi inferior aos genótipos RB867515 e RB966928.



**Figura 3-** Comprimento de planta (cm) de três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes microbiológicos aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI). C (Controle sem Inoculação); CN (Controle com Nitrogênio); I1 (Inoculante 1- *Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- Rizobactéria *Exiguobacterium acetylicum*).

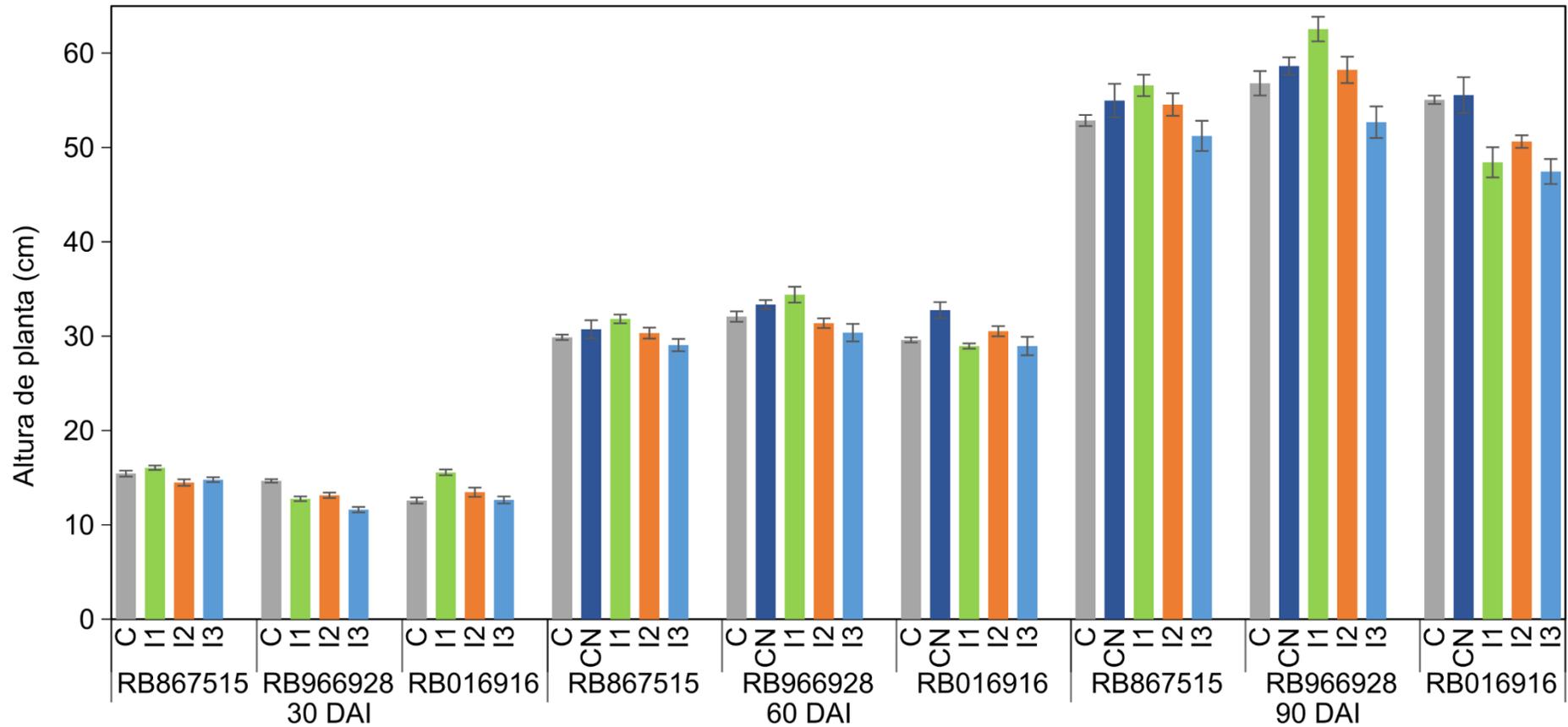
Ao observar os resultados encontrados para altura de planta (Figura 4), verifica-se que os dados obtidos, conforme esperado, assemelham-se aos de CP. Sendo que aos 30 DAI, destaca-se a interação entre I1 e o genótipo RB016916, onde houve aumento significativo na AP para este genótipo.

Aos 60 DAI foi observado o mesmo comportamento para o genótipo RB867515 frente as inoculações, onde apenas I1 apresentou maior valor médio que o controle. O padrão entre as respostas para estes parâmetros também foi observado para RB966928 que obteve os mesmos resultados superiores para I1 que proporcionou o maior AP, sendo superior aos tratamentos controle, I2 e I3. No entanto, para RB016916 nenhuma inoculação promoveu aumento na AP superior ao controle com nitrogênio.

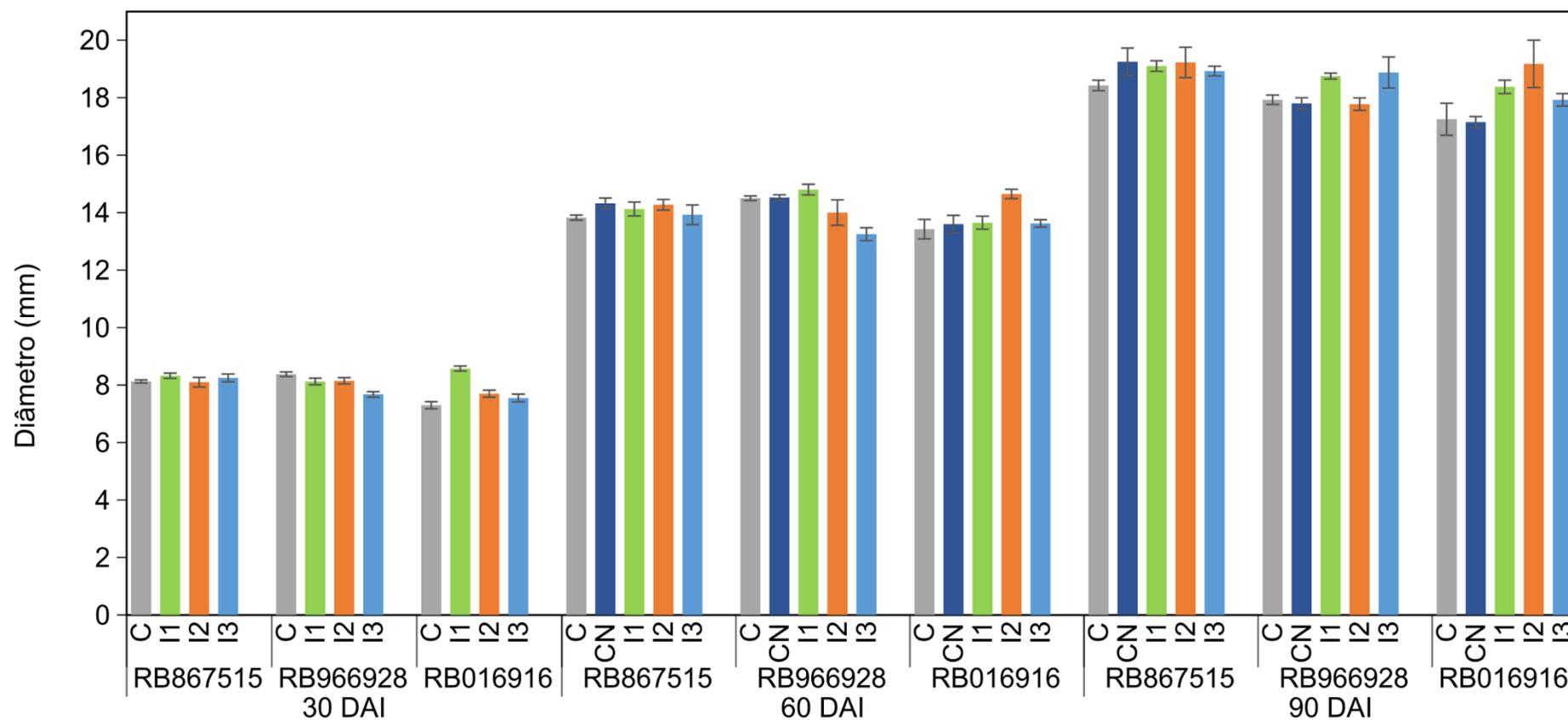
Aos 90 DAI nenhum inoculante proporcionou incremento na altura para o genótipo RB016916. Apesar do I1 ter obtido a maior média para RB867515, não apresentou diferença significativa quando comparado ao controle com nitrogênio e I2. Já para o genótipo RB966928, novamente podemos observar o destaque do I1 que apresentou o maior valor médio para AP, superior ao controle e controle com nitrogênio.

E para a variável DC (Figura 5), no desenvolvimento inicial aos 30 DAI a interação genótipo x inoculante pode ser observada a partir dos resultados obtidos para os inoculantes I1 e I2, onde as respostas observadas foram inversas para os genótipos RB966928 e RB016916. Uma vez que para I1 RB966928 apresentou DC médio inferior a RB016916 no mesmo inoculante. Enquanto que RB966928 inoculado com I2 apresentou DC superior ao mesmo tratamento para o genótipo RB016916. Já o I3, que apresentou as maiores médias quando inoculado ao genótipo RB867515.

De modo geral, o genótipo RB016916 aparenta ser o mais responsivo para esta variável aos inoculantes testados, uma vez que apresentou incremento no DC aos 30 DAI quando inoculado com I1 e aos 60 DAI destacou-se dos demais sob efeito do I2.



**Figura 4-** Altura de planta (cm) de três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes microbiológicos aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI). C (Controle sem Inoculação); CN (Controle com Nitrogênio); I1 (Inoculante 1- *Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- Rizobactéria *Exiguobacterium acetyllicum*).

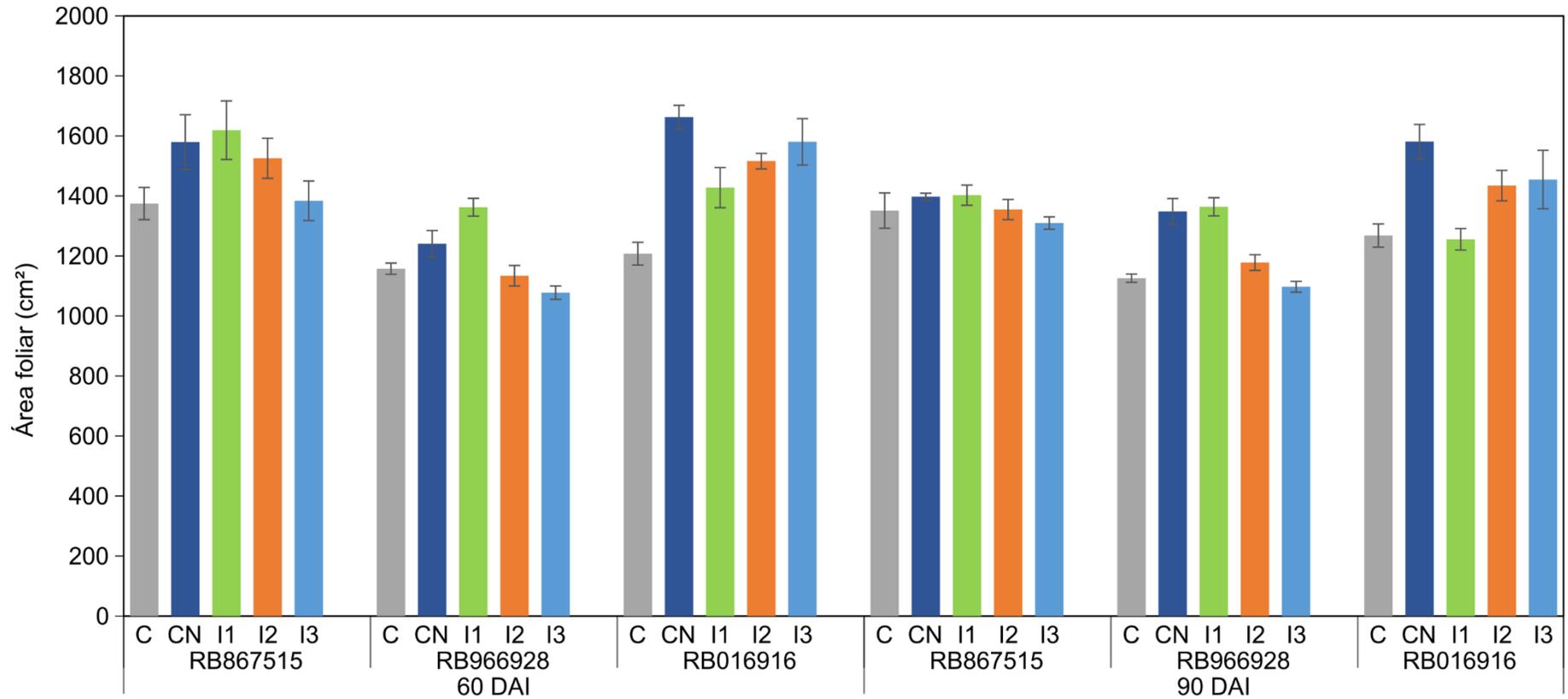


**Figura 5-** Diâmetro do colo (mm) de três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes microbiológicos aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI). C (Controle sem Inoculação); CN (Controle com Nitrogênio); I1 (Inoculante 1- *Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- Rizobactéria *Exiguobacterium acetylicum*).

Ao analisar o gráfico representado na Figura 6, é possível verificar que de modo geral, aos 60 DAI houve uma tendência de as plantas inoculadas apresentarem maior valor médio para AF nos genótipos RB016916 e RB867515, com exceção ao I3 neste último. A AF observada para RB016916 com os inoculantes e adubação nitrogenada foi superior ao controle. No entanto, para RB966928 o I3 não proporciona impacto positivo, tendo obtido o menor valor médio para AF. É possível observar também, ao comparar os genótipos, que RB966928 apresenta as menores médias para AF.

Aos 90 DAI para RB966928 podemos verificar que I1 e controle com nitrogênio apresentaram os maiores valores médios para AF sendo também bastante similares. Para o genótipo RB016916 a maior AF encontrada foi em plantas controle com adubação nitrogenada e neste período I1 apresentou a menor AF, semelhante ao controle sem adubação. Neste período de avaliação os inoculantes testados não diferiram para o genótipo RB867515.

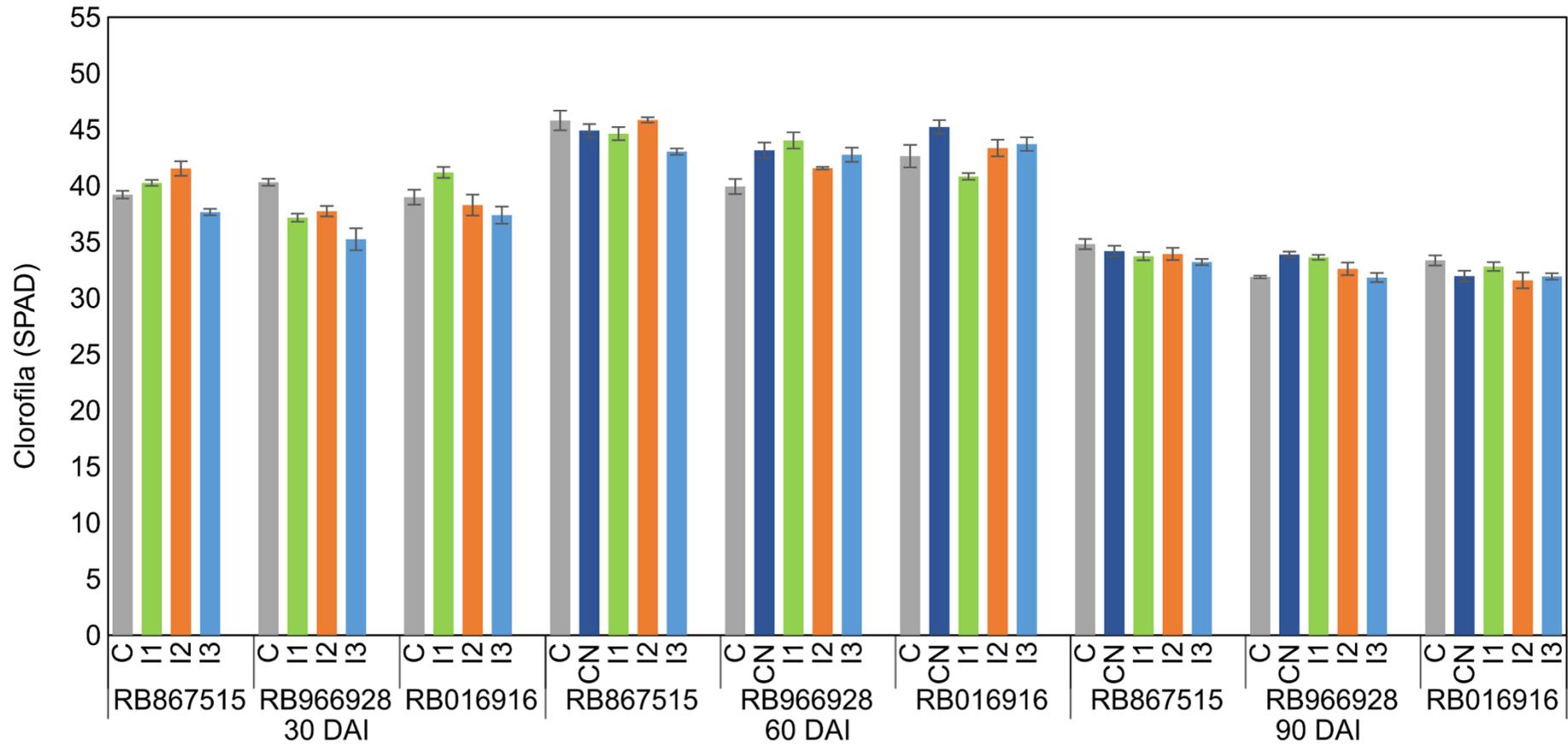
Para a variável número de folhas verdes, não foi observado efeito significativo da interação aos 30 e 60 DAI (Anexos A e B). Em ambos os períodos de avaliação o genótipo RB966928 apresentou o maior valor médio para número de folhas verdes. Aos 90 DAI, RB966928 mantém o maior número de folhas verdes, e tem como destaque os inoculantes 1 e 2 que apresentam o maior NFV quando comparado aos demais. De modo geral para os demais genótipos as inoculações não afetaram positivamente para esta variável.



**Figura 6-** Área foliar (cm<sup>2</sup>) de três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes microbiológicos aos 60 e 90 dias após a inoculação (DAI). C (Controle sem Inoculação); CN (Controle com Nitrogênio); I1 (Inoculante 1- *Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- Rizobactéria *Exiguobacterium acetylicum*).

Em relação ao índice de clorofila (Figura 7), foi verificado o efeito significativo para a interação genótipo x inoculante, em todos os períodos de avaliação. No início do desenvolvimento, aos 30 DAI, destacam-se a associação entre I2 e genótipo RB867515, com valor médio para CLF de 41,53, e também I1 para o genótipo RB016916, que obteve valor médio de 41,18 para esta variável. Por outro lado, neste período de avaliação não houve efeito positivo da inoculação no genótipo RB966928, para CLF. De modo geral RB867515 apresentou os maiores valores de CLF quando inoculado, ao ser comparado ao genótipo RB966928.

Entretanto, nas avaliações seguintes aos 60 e 90 DAI, não foi observado esse mesmo comportamento da avaliação inicial, uma vez que para RB867515 os inoculantes não apresentam médias superiores aos controles com e sem adubação nitrogenada. E para RB016916 na combinação com I1 houve uma redução significativa no CLF aos 60 DAI. Por outro lado, neste período RB966928 apresentou efeito benéfico das inoculações para este parâmetro, sendo possível destacar os valores médios do I1 (44,03), controle com nitrogênio (43,15) e I3 (42,75). Já aos 90 DAI foi verificado o efeito do I1 e controle com nitrogênio no incremento do CLF do genótipo RB966928.



**Figura 7-** Índice de clorofila (SPAD) de três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes microbiológicos aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI). C (Controle sem Inoculação); CN (Controle com Nitrogênio); I1 (Inoculante 1- *Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- *Rizobactéria Exiguobacterium acetylicum*).

#### 4.4 Discussão

Os resultados encontrados neste estudo para as variáveis MFPA, MSPA, MFT e MST, corroboram com dados de outros autores que também obtiveram ganhos significativos de biomassa em plantas de cana-de-açúcar inoculadas com BPCV. Pereira et al. (2013), avaliando a campo seis genótipos de cana-de-açúcar, também verificou aumento na produção de biomassa verde e seca do genótipo RB867515, com destaque para o “coquetel” de bactérias diazotróficas, que possui a mesma formulação do I2 avaliado neste trabalho. De maneira semelhante, em condições controladas, em casa de vegetação, Marques et al. (2008), obteve resultados significativos da interação com *H. seropedicae*, sendo observado aumento de matéria seca de raiz e parte aérea após 45 dias de cultivo.

Da mesma forma que neste trabalho, diversos estudos apontam uma forte influência da interação genótipo x inoculante nas respostas obtidas pelas plantas. O genótipo RB867515 é descrito como responsivo a inoculação com bactérias diazotróficas (SCHULTZ et al. 2012; PEREIRA et al., 2013; GIRIO, 2014).

No trabalho conduzido por Romano (2016) o genótipo RB867515 foi altamente responsivo as inoculações com *A. brasiliense* e *H. seropedicae*, o que proporcionou ganhos significativos, tanto na MSPA, quanto na MST, com valores médios superiores para *H. seropedicae*. No entanto, a associação positiva não foi observada com a inoculação de *H. seropedicae* para os genótipos RB966928 e RB855156, tendo este último respondido bem a inoculação com *A. brasiliense*.

Ribeiro et al. (2015), avaliando a inoculação no genótipo RB966928 também observaram efeito benéfico da inoculação no incremento de massa seca, nos tratamentos com a mistura de bactérias diazotróficas indicada para inoculação em cana-de-açúcar. Vale ressaltar que o valor médio para MSPA no trabalho dos autores foi de 0,68g aos 40 DAI, enquanto no presente estudo obtivemos MSPA média para o mesmo genótipo de 3,6g.

Corroborando com a hipótese de que a contribuição da inoculação é dependente da interação entre as diferentes variedades e estirpes inoculadas, Matoso (2017) constatou que a inoculação com bactérias diazotróficas promoveu

efeitos negativos no acúmulo de massa seca em mudas de cana-de-açúcar dos genótipos RB92579, RB966928 e RB975932. Em contrapartida, nossos resultados apontam para o incremento da MST no genótipo RB966928, utilizando a mesma inoculação testada no trabalho citado (correspondente ao I2). Outros trabalhos também indicam redução do incremento de massa seca em algumas variedades de cana-de-açúcar (CHAVES et al., 2013, 2014; MARQUES JUNIOR et al., 2008; OLIVEIRA, et al., 2002) esses resultados confirmam a hipótese de que existe uma interação muito complexa entre planta, bactérias e ambiente, o que pode causar grande variabilidade nas respostas esperadas frente à inoculação

Os efeitos benéficos da inoculação, que resultam na promoção de crescimento da cana-de-açúcar, podem estar associados tanto à síntese de hormônios de crescimento produzidos pelas bactérias, quanto pela solubilização de fosfato, potássio e outros minerais, bem como pela própria FBN. Bashan e Holguin (1997), evidenciam a contribuição do gênero *Azospirillum* na produção de fitormônios. Essas substâncias excretadas pelas bactérias, principalmente o ácido indol-acético (AIA), desempenham papel fundamental na promoção de crescimento das plantas.

Diversos autores têm estudado parâmetros biométricos ao avaliar mudas de cana-de-açúcar produzidas a partir de minitoletes, uma vez que, ainda não se sabe qual deles pode ser um indicador da qualidade de mudas (MATOSO, 2017). Podemos citar entre os componentes do potencial de produção da cana-de-açúcar o perfilhamento, a altura de planta e o diâmetro do caule (SILVA; CATO; COSTA, 2010). Landell; Silva (2004) descrevem que o diâmetro é um dos principais componentes analisados para avaliar a formação do potencial agrícola de uma variedade. Apesar da altura das plantas de cana-de-açúcar ser uma característica genética, está sujeita a influência ambiental (SUGUITANI, 2006), sendo assim as plantas poderão sofrer mudanças de acordo com as condições as quais se encontram.

Lopes (2013) observou interação significativa entre famílias de cana-de-açúcar e inoculantes, respostas distintas à inoculação de acordo com a família avaliada. Sendo os principais resultados positivos observados nas variáveis estatura, diâmetro e no teor de sólidos solúveis totais.

Neste contexto, é esperado que a resposta a inoculação apresente resultados distintos quando se trabalha com genótipos e estirpes bacterianas diferentes, uma vez que o efeito da inoculação na produtividade das plantas é dependente tanto do genótipo da planta quanto da espécie/estirpe da bactéria utilizada (BALDANI; BALDANI, 2005).

Os menores valores de AF observados para o genótipo RB966928 podem estar associados a uma característica morfológica do genótipo, que apresenta folhas mais estreitas o que influencia diretamente o resultado, tendo em vista que o cálculo utilizado para esta análise considera as medidas de largura e comprimento da folha para obtenção da AF. Para este genótipo podemos verificar que I1 e controle com nitrogênio apresentaram os maiores valores médios para AF e bastante similares. Este é um resultado importante, uma vez que a inoculação pode proporcionar ganhos em parâmetros de crescimento relevantes para a produtividade da cana-de-açúcar, próximos ou até mesmo maiores que em plantas com adubação nitrogenada, sem a necessidade de adubação complementar com fertilizante químico. Dessa forma a inoculação pode ter impacto positivo na redução de custos. E também, como aponta Reis et al. (2020) sobre o uso de *N. amazonense* como inoculante na cana-de-açúcar, os inoculantes podem ser utilizados como uma ferramenta que pode auxiliar no enfrentamento de uma situação problema considerada por alguns que é a insustentabilidade do uso de fertilizantes nitrogenados na cana-de-açúcar.

Conforme Oliveira et al. (2007) o estudo da área foliar em plantas de cana-de-açúcar permite correlacioná-la com potencial produtivo em matéria seca, taxas de crescimento e produtividade de açúcar, uma vez que a estrutura da folha, através da capacidade fotossintética é responsável pela produção de carboidratos essenciais ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Nesse contexto, Marafon (2012) também afirma que a dinâmica foliar é crucial na determinação da produtividade da cana-de-açúcar, uma vez que o baixo desenvolvimento foliar pode limitar expressivamente o rendimento da cultura, devido à redução na interceptação da irradiação solar incidente e, conseqüentemente, no menor acúmulo de biomassa. Ainda, Souza et al. (2009) descreve que variedades que apresentam maiores valores para número de

folhas e área foliar, principalmente no início do desenvolvimento, apresentam maior vantagem competitiva quando comparada as demais.

A ausência do efeito da inoculação para CLF em alguns períodos também é descrita por outros autores (PORTUGAL et al., 2012; MÜLLER et al., 2012; SCUDELLETTI, 2016), uma explicação possível para este efeito, é que as plantas podem absorver uma quantidade excessiva de N, considerando esta possibilidade o N em excesso seria acumulado na forma de nitrato, não se associando a molécula de clorofila (DWYER et al., 1995). Além disso, características ligadas ao genótipo tais como a eficiência fotossintética, exigências nutricionais e resistência às condições adversas podem apresentar influência na eficiência da fixação de nitrogênio pelas bactérias, o que pode refletir nos incrementos no índice de clorofila da planta (REIS JUNIOR et al., 2009).

#### **4.5 Conclusões**

- I. Há interação entre genótipos e inoculantes em mudas de cana-de-açúcar.
- II. Os inoculantes proporcionam incremento na biomassa fresca e seca de mudas de cana-de-açúcar, na fase inicial de desenvolvimento.
- III. A inoculação promove aumento no comprimento de planta, altura de planta, diâmetro do colmo, área foliar e índice de clorofila, para interações positivas.

## **5. CAPÍTULO II. Efeito do uso de inoculantes microbiológicos na tolerância ao déficit hídrico em plantas de cana-de-açúcar**

### **5.1 Introdução**

A cana-de-açúcar é a cultura de maior rendimento do mundo, sendo responsável por aproximadamente 80% da produção mundial de açúcar (NAYAK et al., 2014; ZHOU et al., 2016; NERKAR et al., 2018). Um dos fatores que impulsionou o interesse global na produção de cana-de-açúcar, além do fato de que a espécie apresenta grande destaque no setor sucroalcooleiro há anos, deve-se ao impacto econômico na produção de energia sustentável (BALESTRO et al., 2017), uma vez que pode alcançar o aproveitamento máximo da biomassa (SILVA et al. 2007, BARBOSA et al. 2015).

Vários fatores têm interferência na produção da cana-de-açúcar, com destaque para as interações edafoclimáticas, manejo da cultura e variedade utilizada. A produção da espécie pode ser restringida por quatro estresses abióticos principais: déficit ou excesso de água, variabilidade de temperatura, propriedades do solo e a quantidade de radiação solar (LAKSHMANAN; ROBINSON, 2013). Nesse contexto, o rendimento do cultivo é consideravelmente influenciado por fatores ambientais, como déficit hídrico e oscilações na temperatura (SILVA, 2021).

Em relação ao conhecimento sobre a adaptação ao estresse abiótico em cana-de-açúcar, nos últimos anos houve um aumento nas pesquisas sobre estresse hídrico na espécie, tendo como objetivo definir uma base genética para o melhoramento de variedades (HEMAPRABHA et al. 2006; KOONJAH et al. 2006; ROCHA et al. 2007; SILVA et al. 2007; PRABU et al. 2011; BASNAYAKE et al. 2012; INMANBAMBER et al. 2012). A cana-de-açúcar é uma espécie adaptada ao clima tropical e que apresenta rápido crescimento em condições não restritivas, podendo ser considerada relativamente tolerante ao estresse hídrico, entretanto condições de déficit moderado a grave podem resultar em reduções de até 60% na massa seca (BASNAYAKE et al., 2012).

De modo geral, a composição genética de uma variedade, ou seja, seu genótipo, e a interação com o ambiente de cultivo, determinam o rendimento da cultura (fenótipo). Este é um conceito bastante difundido, e que evidencia a

importância do entendimento de como as plantas respondem a cada uma das condições de limitação de crescimento prevalentes no seu ambiente de cultivo, ou seja, essa compreensão é necessária para o desenvolvimento de novas cultivares e variedades com rendimentos comercialmente aceitáveis em condições de estresses ambientais (LAKSHMANAN; ROBINSON, 2013).

O uso de inoculantes microbiológicos cresce exponencialmente no Brasil, devido aos benefícios que advém da tecnologia, bem como a relação custo/benefício. O potencial de uso destes microrganismos sob condições de campo pode ser exemplificado pelo crescente uso na cultura do milho, que é a segunda mais importante para o mercado de inoculantes agrícolas no Brasil (MENDONÇA et al., 2020).

Na literatura são descritos diversos trabalhos que demonstram que a utilização de microrganismos como inoculantes pode ser considerada uma ferramenta estratégica importante para mitigar os efeitos de diferentes tipos de estresse que acometem o crescimento e desenvolvimento das plantas (DIMKPA; WEINAND; ASCH, 2009; YANG; KLOEPPER; RYU, 2009; GROVER et al., 2011; KASIM et al., 2013; FUKAMI; CEREZINI; HUNGRIA, 2018). Dessa forma, microrganismos benéficos podem melhorar o desempenho das plantas em condições de estresse e conseqüentemente aumentar a produtividade dos cultivos (MARANHÃO et al., 2019).

Corroborando com os dados já descritos na literatura, recentemente no Brasil, foi desenvolvido um bioinsumo denominado comercialmente como Auras<sup>®</sup>, a nova tecnologia foi desenvolvida pela Embrapa Meio Ambiente e a Empresa NOOA Ciência e Tecnologia Agrícola, e consiste basicamente na aplicação da rizobactéria *Bacillus aryabhatai*, encontrada no mandacaru – um cacto de relevância na região da Caatinga- visando reduzir os efeitos causados pelos períodos de seca no cultivo do milho (EMBRAPA, 2021). O produto desenvolvido promete atuar como um redutor dos efeitos de estresses, otimizando o uso da água pela planta, promovendo maior estabilidade do ambiente biológico do solo, retomando o ciclo produtivo após eventos de estresse de forma mais rápida, o que por si só possibilita maior expressão do potencial produtivo do cultivo.

Dessa forma, de acordo com o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de inoculantes microbiológicos no desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar sob déficit hídrico.

## 5.2 Metodologia

Este estudo foi realizado em sequência ao experimento que avaliou resposta da inoculação com bactérias diazotróficas e rizobactéria promotora do crescimento vegetal no desenvolvimento inicial de três genótipos de cana-de-açúcar. Para isto, o experimento foi conduzido em casa de vegetação onde foram testados três inoculantes microbiológicos no crescimento de genótipos de cana-de-açúcar, em condições normais de irrigação e sob restrição hídrica.

A inoculação foi realizada através da imersão dos minitoletes em solução conforme recomendação para cada tratamento (Tabela 2- Capítulo 1), foram originadas 5 inoculações: C- Controle sem inoculação; CN- Controle com nitrogênio; I1- Inoculante 1, inoculante comercial Aprinza® (*Nitrospirillum Amazonense*); I2- Inoculante 2, formulado a partir de um coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *Burkholderia tropica*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Nitrospirillum amazonense*); I3- Inoculante 3- constituído por uma rizobactéria promotora do crescimento vegetal (*Exiguobacterium acetylicum*).

O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso com parcelas subdivididas, com quatro repetições. As parcelas foram representadas por dois níveis de regime hídrico (Irrigado x Déficit Hídrico), e o fator subparcela foi composto um fatorial 3 x 5 (3 genótipos x 5 tratamentos). Cada subparcela foi constituída por quatro vasos, contendo uma planta cada.

Aos 70 dias após o transplante (100 DAI) foi iniciado o período de restrição hídrica. Antecedendo a suspensão da irrigação, foi realizada a uniformização da umidade do substrato, a partir da imersão dos vasos em lâmina de água durante 3 minutos.

O período de restrição hídrica durou 18 dias, sendo que aos 14 dias sem irrigação foi realizada a análise dos parâmetros fotossintéticos, teor de clorofila e contagem do número de folhas verdes.

- **Parâmetros fotossintéticos:** A avaliação das trocas gasosas foi realizada no período da manhã no intervalo entre 10:00 e 12:00 horas, na porção mediana da folha +3, utilizando-se o analisador de gases IRGA, modelo Li-6400XT (Licor, Lincoln, NE, EUA).

- $A$  (taxa assimilatória líquida de  $\text{CO}_2$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
- $g_s$  (condutância estomática,  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
- $E$  (transpiração,  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

- **Índice de clorofila (CLF, Índice SPAD):** medida tomada no intervalo de 09:30 às 11:30 da manhã, realizada na porção mediana da folha +3, com auxílio de um clorofilômetro portátil, modelo SPAD-502Plus, marca Konica Minolta®;

- **Número de folhas verdes (NFV):** determinado a partir da contagem do número de folhas com no mínimo 20% de área verde.

O período de suspensão da irrigação (déficit hídrico) teve duração de 18 dias, sendo que após esse período as plantas foram novamente irrigadas, e 25 dias após a retomada da irrigação, realizou-se a avaliação biométrica final e coleta das plantas, conforme descrições abaixo:

- **Altura de planta (ALT, cm):** mensurado com o auxílio de uma trena centimétrica, a partir da base da planta até a primeira aurícula visível (folha +1);

- **Número de folhas verdes (NFV):** determinado a partir da contagem do número de folhas com no mínimo 20% de área verde.

- **Área foliar (AF,  $\text{cm}^2$ ):** Determinada a partir da contagem do número de folhas totalmente expandidas e por medições de comprimento e largura da folha +3, mensurado com o auxílio de uma régua milimétrica. A estimativa da área foliar será calculada a partir da equação a seguir, conforme metodologia descrita por Hermann e Câmara (1999).

$$AF = C \times L \times 0,75 \times (N + 2)$$

Em que C é o comprimento da folha +1, L é a largura da folha +3, 0,75 é o fator de correção para área foliar da cultura, e N é o número de folhas abertas com pelo menos 20% de área verde.

- **Massa fresca e seca do colmo (g):** Coleta e pesagem da massa fresca do colmo seguida da secagem em estufa a  $65^\circ\text{C}$  para determinação da massa seca;

- **Massa fresca e seca das folhas (g):** Coleta e pesagem da massa fresca das folhas seguida da secagem em estufa a 65°C para determinação da massa seca;
- **Massa fresca e seca da planta (g):** Estimada a partir da soma das massas frescas e secas do colmo e da parte aérea.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância com auxílio do ambiente de programação R (R core team 2020), utilizando os pacotes ExpDes (FERREIRA et al., 2018) e agricolae (MENDIBURU, 2020). A representação gráfica foi feita através do pacote Microsoft Office Excel (versão 2016). Para comparação de médias, foi utilizado o erro padrão da média associado a cada tratamento.

### 5.3 Resultados

#### 5.3.1 Número de folhas verdes, índice de clorofila e parâmetros fotossintéticos

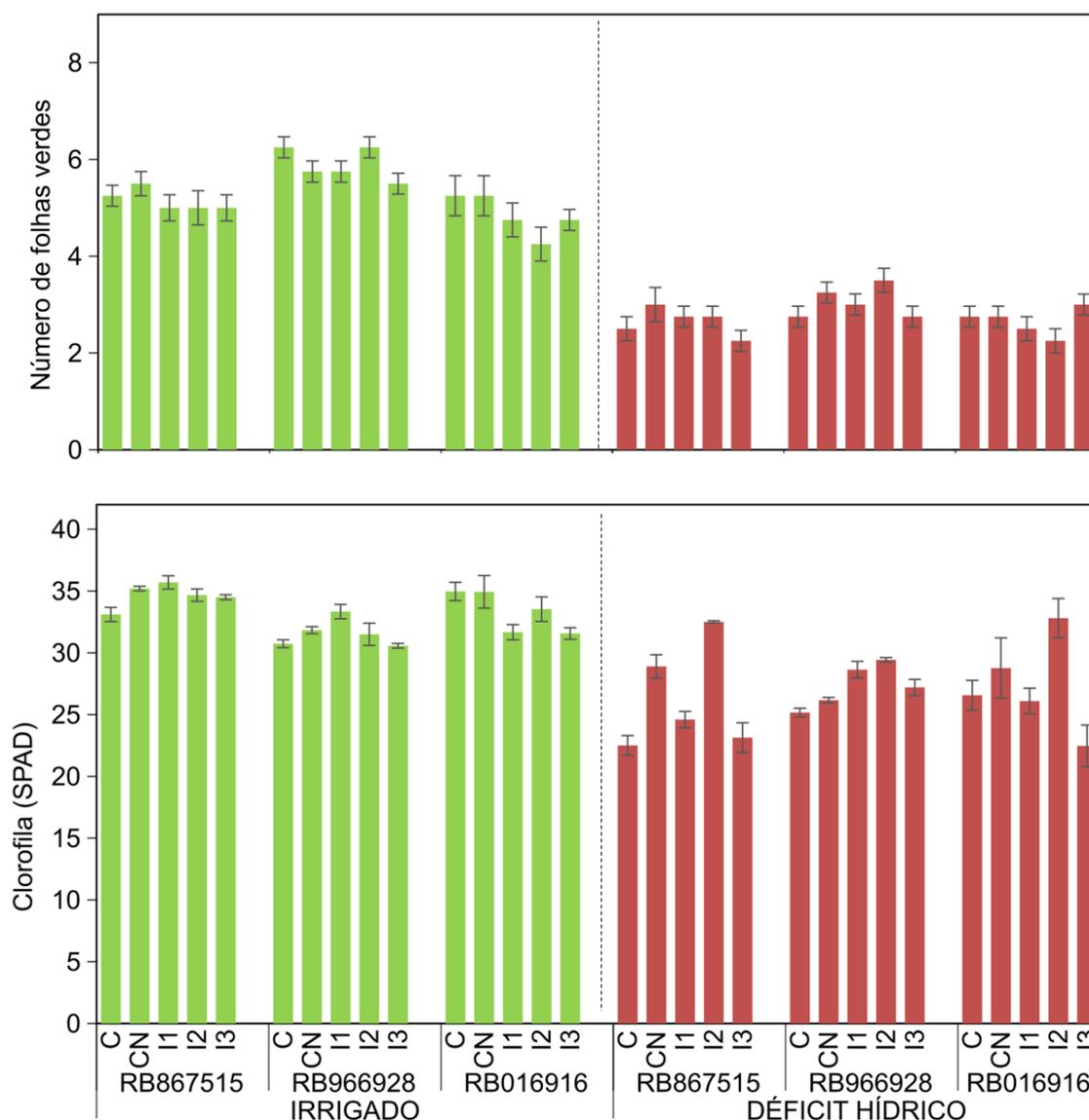
Os resultados obtidos pela análise de variância indicam que regime hídrico, inoculante e interação regime hídrico x genótipo (AxB) tiveram efeito significativo para taxa de assimilação líquida (A), condutância estomática (gs), índice de clorofila (CLF) e número de folhas verdes (NFV). Para CLF, também foi possível observar o efeito da interação entre regime hídrico e inoculante, bem como genótipo e inoculante (Tabela 4).

**Tabela 4.** Resumo da análise da variância para taxa de assimilação líquida (A), transpiração (E), condutância estomática (gs), clorofila (CLF) e número de folhas verdes (NFV) para três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes e regimes hídricos.

FV <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	QM									
		A		E		gs	CLF	NFV			
Bloco	2	121,10		0,01		0,0007	1,07	0,66			
Regime Hídrico (A)	1	5509,00	**	128480,00	**	0,4735	**	862,40	**	202,80	**
Resíduo parcela (a)	2	12,00		0,00		0,0000		0,30		0,49	
Genótipo (B)	2	6,60	ns	0,06	ns	0,0002	ns	9,21	ns	5,63	**
Inoculante (C)	4	26,20	**	0,15	ns	0,0021	**	50,08	**	0,95	**
A x B	2	44,50	**	0,24	ns	0,0017	**	30,72	**	1,30	**
A x C	4	4,30	ns	0,05	ns	0,0006	ns	32,09	**	0,11	ns
B x C	8	1,70	ns	0,15	ns	0,0002	ns	13,91	**	0,20	ns
A x B x C	8	4,90	ns	0,13	ns	0,0003	ns	5,89	ns	0,11	ns
Resíduo subparcela (b)	56	6,10		0,09		0,0003		3,49		0,26	
<b>CV<sup>3</sup> (a)</b>		24,08		10,33		4,39		1,86		16,98	
<b>CV (b)</b>		17,16		17,02		17,51		6,21		12,31	

<sup>1</sup>FV: Fonte de variação; <sup>2</sup>GL: Grau de liberdade; <sup>3</sup>CV: Coeficiente de variação; \*\*, \*: significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste F; ns: não significativo.

Conforme o esperado, houve uma redução drástica em todos os parâmetros avaliados no regime com déficit hídrico. Em relação ao NFV (Figura 8), os valores médios variaram entre 4,35 e 6,35 em plantas irrigadas e 2,25 e 3,50 no regime com restrição hídrica. Entretanto, essa variável é muito influenciada pelo genótipo, o que explica o maior NFV encontrado para o genótipo RB966928 no regime irrigado.



**Figura 8.** Número de folhas verdes e teor de clorofila (CLF, SPAD) para três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes e regimes hídricos. C (Controle sem Inoculação); CN (Controle com Nitrogênio); I1 (Inoculante 1- *Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- Rizobactéria *Exiguobacterium acetylicum*).

De modo geral houve uma redução de 20% na CLF entre plantas irrigadas e não irrigadas. No regime irrigado os resultados obtidos variaram entre 30,6 e 35,7, enquanto para plantas em restrição hídrica foram observados valores entre 22,5 e 32,8. Os genótipos avaliados responderam diferentemente para os inoculantes testados. No regime irrigado, para RB867515, houve uma resposta benéfica frente a utilização de inoculantes, todas as plantas inoculadas obtiveram incremento no índice de clorofila, ainda ressalta-se que nos inoculantes 1 e 2 foram verificados resultados semelhantes ao controle com aplicação de nitrogênio, uma resposta importante quando consideramos a redução do uso de fertilizantes químicos na cana-de-açúcar. Para o genótipo RB966928 também foram verificadas respostas positivas a inoculação, contudo, é possível destacar a associação benéfica desse genótipo ao I1, uma vez que essas plantas apresentaram o maior índice de clorofila.

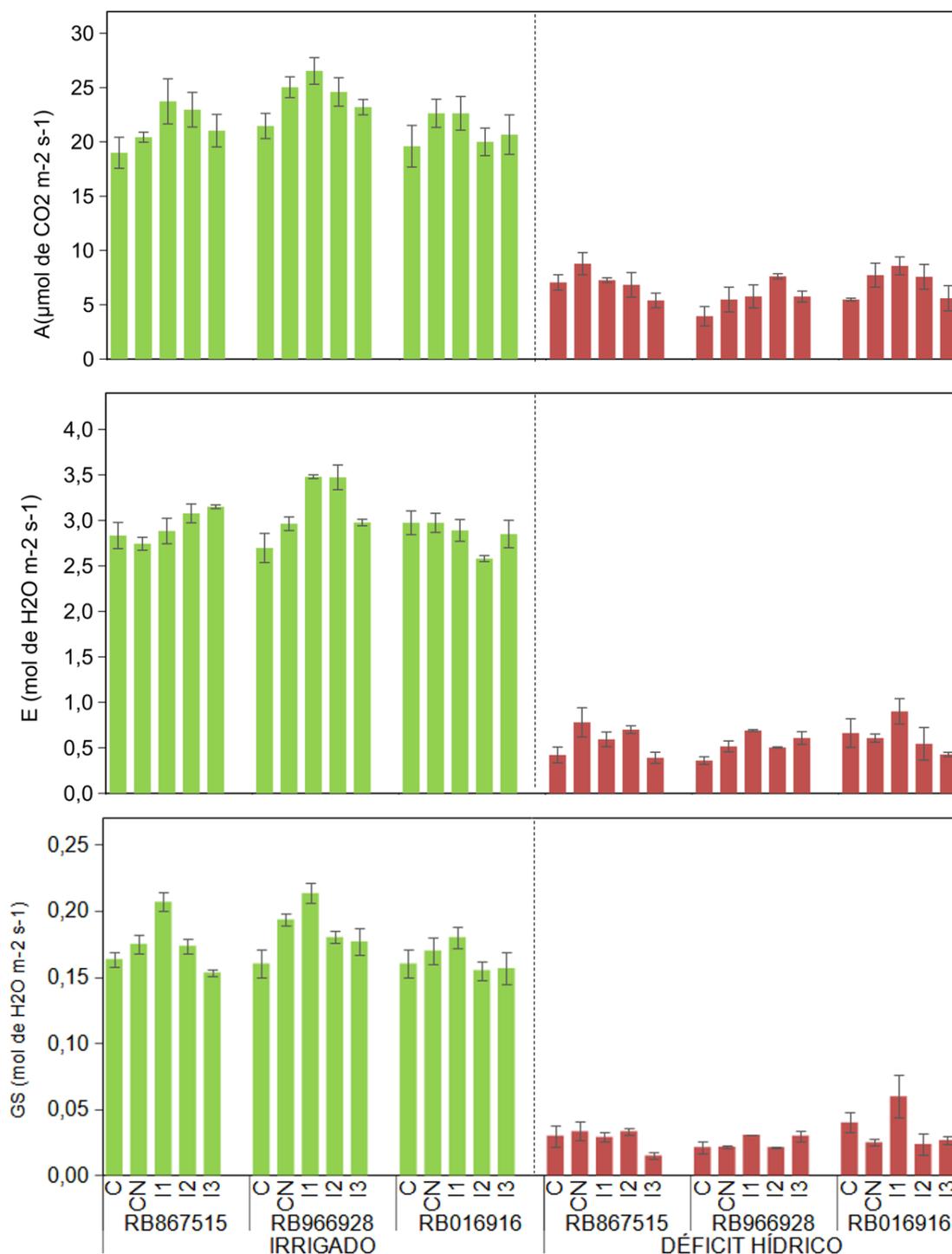
No déficit hídrico, o I2 obteve destaque para os três genótipos avaliados. Para RB867515 e RB016916 é possível observar que os valores médios para teor de clorofila foram expressivamente maiores no I2, quando comparado aos demais. Para o genótipo RB966928, apesar de as diferenças serem menos expressivas, as plantas inoculadas obtiveram resultados significativamente superiores ao controle e controle com nitrogênio. Para este genótipo também foi verificado incremento no índice de clorofila sob déficit hídrico em plantas inoculadas com I1.

De forma geral, destaca-se o incremento proporcionado pelo I2 no déficit hídrico, tendo em vista que os ganhos obtidos com a inoculação assemelham-se aos resultados obtidos nas plantas em condições de regime irrigado.

Neste estudo, em condições de déficit hídrico foi observada redução nas variáveis de trocas gasosas, taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A), condutância estomática (gs) e transpiração (E) (Figura 9).

Em relação aos parâmetros fotossintéticos, para a variável A no regime irrigado foi observada variação entre os tratamentos de 19,00±1,4 a 26,53±1,2 μmol de CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Entre os inoculantes testados, o I1 apresentou os maiores incrementos para A, quando comparado ao controle nos três genótipos avaliados tendo como base os valores médios. A inoculação de I1 no genótipo RB867515 proporcionou um aumento de 24,9% (23,73 μmol de CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) quando

comparado ao controle (19,00  $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), os demais genótipos RB966928 e RB016916 quando comparados da mesma forma apresentaram 23,6% e 15,5%, de incremento respectivamente.



**Figura 9**-Taxa de assimilação líquida (A -  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), transpiração (E -  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e condutância estomática (gs -  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) para três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes e regimes hídricos. C (Controle sem Inoculação); CN (Controle com Nitrogênio); I1 (Inoculante 1- *Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- Rizobactéria *Exiguobacterium acetylicum*).

Mesmo em condições de déficit hídrico, foi verificado efeito da inoculação na taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>, que pode ser observado nos genótipos RB966928, onde I2 e I3 proporcionaram incremento de 93,3% e 43,1%, quando comparados ao controle, e no genótipo RB016916, o I1 e I2 aumentaram em 56,7% e 38,2%, respectivamente, a taxa de assimilação. O I2 proporcionou o maior aumento em A para RB966928, comparado aos controles e inoculantes testados.

O déficit hídrico causou redução da taxa de transpiração (E) em todos os tratamentos avaliados. Além disso, é possível observar que no regime irrigado para RB966928 com I1 e I2 apresentaram as maiores taxas de transpiração, no entanto, no déficit hídrico o I2 não obteve o mesmo comportamento, tendo apresentado maior redução que I1 e I3, com média semelhante ao controle nitrogênio.

A condutância estomática reduziu aproximadamente 80% no regime com restrição hídrica comparado ao irrigado. No regime irrigado houve variação de 0,15 a 0,21 mol de H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> para gs, nessas condições o I1 apresentou os maiores valores para gs nos três genótipos avaliados, embora para RB016916 tenha sido semelhante ao controle com nitrogênio. Enquanto no déficit hídrico, gs variou entre 0,015 e 0,060 mol de H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, o I3 apresentou o menor valor médio para RB867515, para o genótipo RB966928 o I2 obteve os menores valores, semelhante ao controle e controle com nitrogênio, enquanto I1 e I3 foram superiores. No genótipo RB016916 controle e I1 apresentaram as maiores médias para gs.

### 5.3.2 Parâmetros biométricos após o período de déficit hídrico

Em relação as variáveis biométricas avaliadas 25 dias após a retomada da irrigação, foi verificada a interação tripla apenas para ALT. Para AF, os resultados obtidos foram significativos para interação regime hídrico e genótipo e também para genótipo e inoculante. Enquanto para a variável NFV apenas regime e inoculante apresentaram interação significativa (Tabela 5).

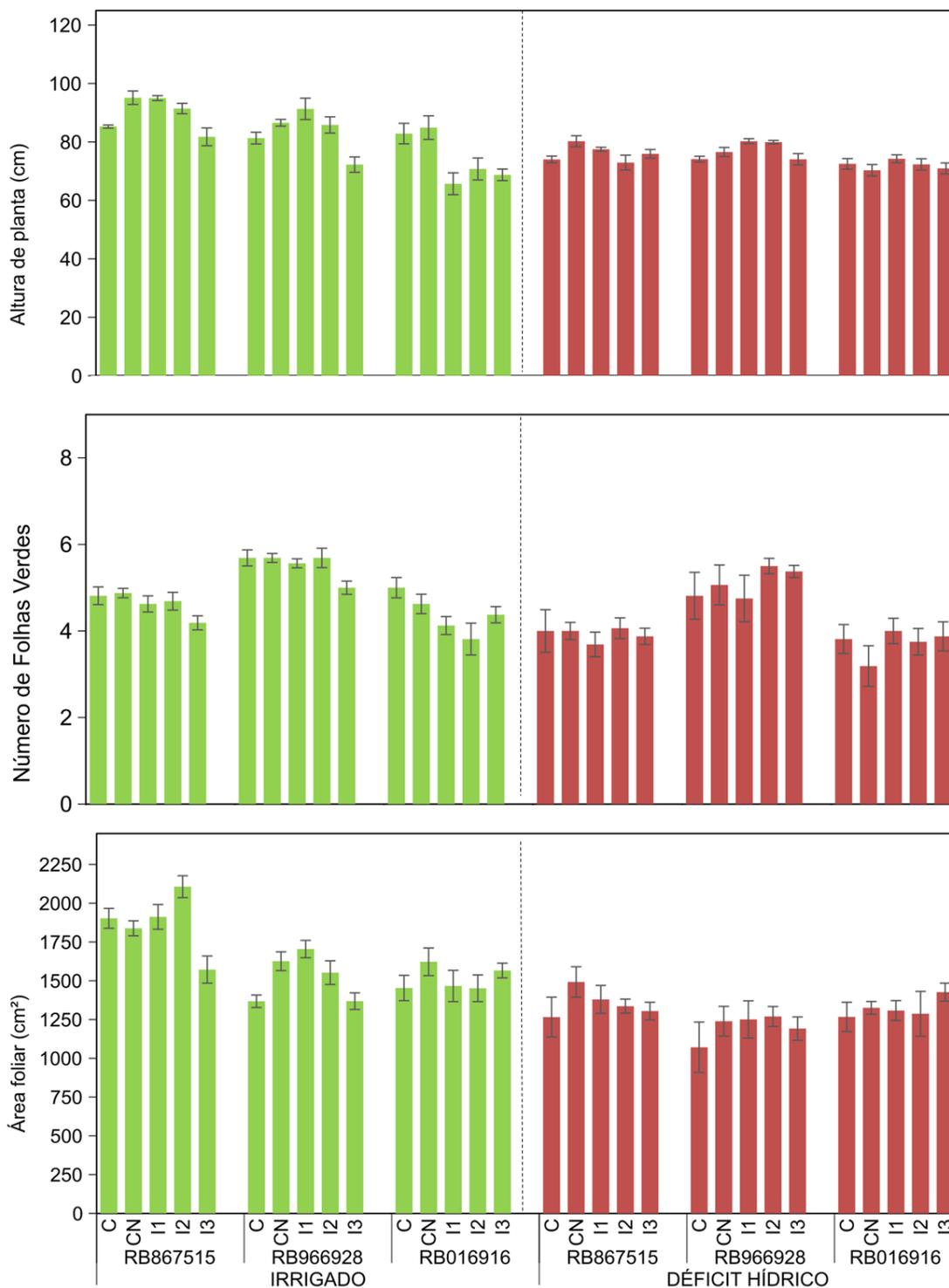
**Tabela 5**-Resumo da análise da variância para altura de planta (ALT, cm), área foliar (AF), e número de folhas verdes (NFV), para três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes e regimes hídricos.

FV <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	QM		
		ALT	AF	NFV
Bloco	3	166,46	107530,0	4,45
Regime Hídrico (A)	1	1698,10 **	346301,0 *	10,80
Resíduo parcela (a)	3	2,30	234658,0	2,71
Genótipo (B)	2	979,35 **	675059,00 **	17,95 **
Inoculante (C)	4	236,27 **	94616,00 *	0,24 ns
A x B	2	314,15 **	261741,00 **	0,24 ns
A x C	4	126,87 **	42448,00 ns	0,86 **
B x C	8	103,40 **	63337,00 *	0,36 ns
A x B x C	8	81,24 **	36473,00 ns	0,29 ns
Resíduo subparcela (b)	84	22,75	28797,00	0,23
<b>CV<sup>3</sup> (a)</b>		1,92	33,08	36,18
<b>CV (b)</b>		6,05	11,59	10,47

<sup>1</sup>FV: Fonte de variação; <sup>2</sup>GL: Grau de liberdade; <sup>3</sup>CV: Coeficiente de variação; \*\*, \*: significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste F; ns: não significativo.

Para ALT, os genótipos avaliados responderam diferentemente a inoculação no regime irrigado (Figura 10). Para os genótipos RB867515 e RB966928, os inoculantes 1 e 2 alcançaram ALT semelhante ao controle com aplicação de nitrogênio. Entretanto, ao observar os resultados obtidos para RB016916, verifica-se menores valores de ALT para os tratamentos com inoculação, embora em condições de déficit hídrico, observa-se resposta diferente, uma vez que o I1 foi superior ao controle com aplicação de nitrogênio, e ambos não diferiram dos demais. No déficit hídrico o genótipo RB966928 apresentou os maiores valores de ALT para I1 e I2. Enquanto para RB867515, o controle com nitrogênio foi superior aos demais.

Quanto a número de folhas verdes (NFV), observa-se que os I1 e I2 não apresentaram diferença para esta variável, quando comparados aos controles com e sem nitrogênio, nos genótipos RB867515 e RB966928 no regime irrigado. Por outro lado, ainda no regime irrigado para o genótipo RB016916 a inoculação resultou na diminuição NFV quando comparada ao controle. No déficit hídrico, não foi observado efeito dos inoculantes na manutenção de folhas verdes, quando comparado aos controles, para os genótipos RB867515 e RB966928. No entanto, para RB016916 o I1 apresentou NFV superior ao controle com nitrogênio.



**Figura 10.** Altura de plantas (cm), número de folhas verdes e área foliar (cm<sup>2</sup>) para três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes e regimes hídricos. C (Controle sem Inoculação); CN (Controle com Nitrogênio); I1 (Inoculante 1- *Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- Rizobactéria *Exiguobacterium acetylicum*).

Em relação a área foliar no regime irrigado, no genótipo RB867515, observa-se destaque para o I2 que obteve AF maior que 2000 cm<sup>2</sup>, superior a

todos os tratamentos testados. Para o genótipo RB966928, controle com nitrogênio, I1 e I2 obtiveram AF superior ao controle e I3. Para RB016916 foi observado comportamento semelhante entre os inoculantes e os controles com e sem nitrogênio. No regime de déficit hídrico a aplicação de nitrogênio no genótipo RB867515 promoveu aumento da AF quando comparado aos inoculantes 2 e 3, para os demais genótipos não foram observadas diferenças. Quando os resultados foram comparados entre regimes, as maiores reduções na AF foram observadas para o genótipo RB867515.

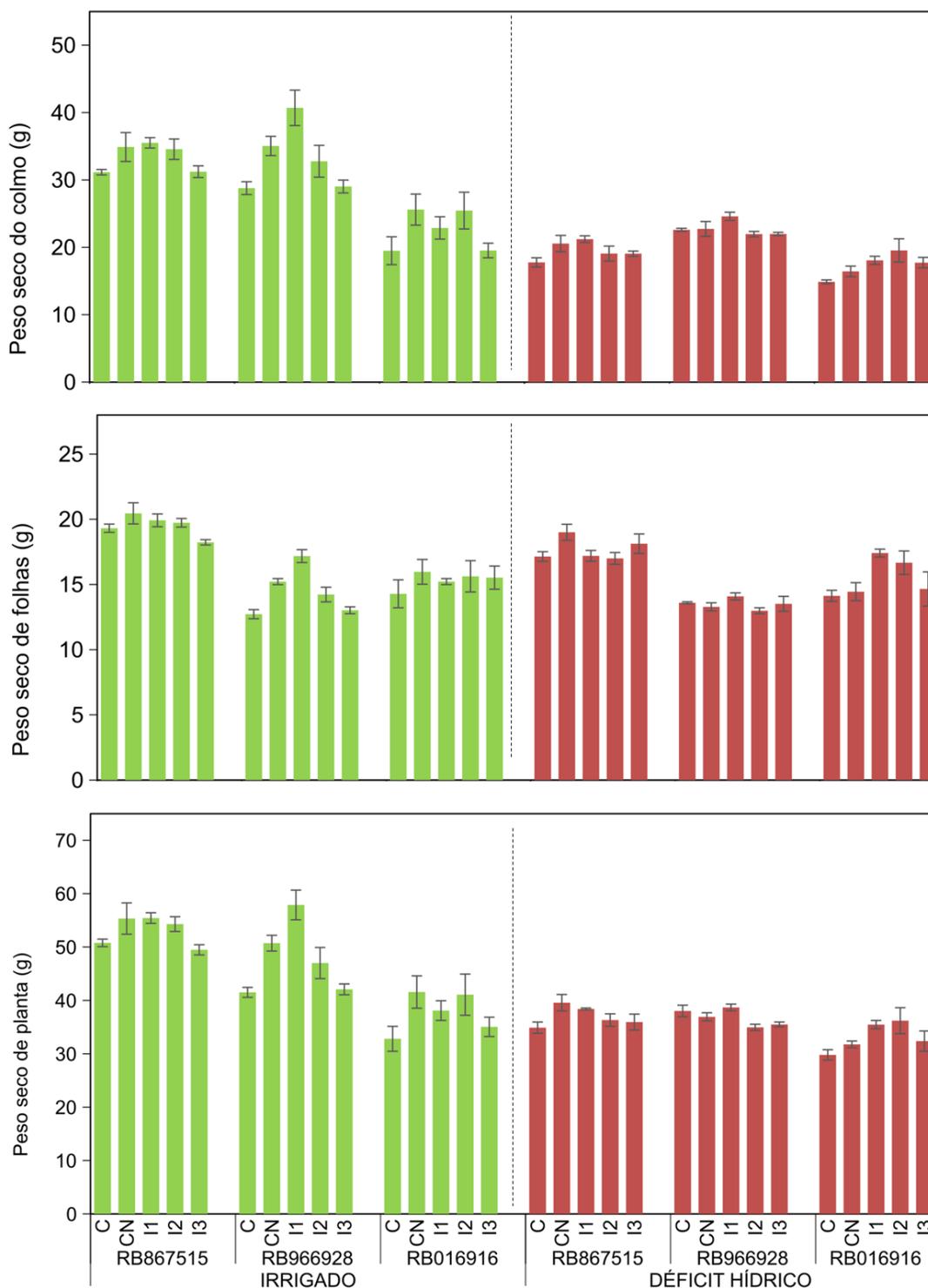
A partir do resumo da análise de variância para as variáveis peso seco do colmo (PSC, g), peso seco de folhas (PSF, g), peso seco de planta (PSP, g) é possível verificar efeito significativo para interação regime hídrico e genótipos para todas as variáveis. A interação regime hídrico e inoculante foi observada para as variáveis PSC e PSP, enquanto para PSF foi observada interação tripla (Tabela 12).

**Tabela 6** -Resumo da análise da variância para peso seco do colmo (PSC, g), peso seco de folhas (PSF, g), peso seco de planta (PSP, g), avaliados em três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes e regimes hídricos.

FV <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	QM		
		PSC	PSF	PSP
Bloco	3	63,40	8,90	86,10
Regime Hídrico (A)	1	2939,20 **	23,90 ns	3340,00 **
Resíduo parcela (a)	3	45,60	2,60	39,30
Genótipo (B)	2	734,40 **	225,20 **	985,00 **
Inoculante (C)	4	94,70 **	10,40 **	168,10 **
A x B	2	190,50 **	9,80 **	329,00 **
A x C	4	29,90 *	2,10 ns	47,80 *
B x C	8	15,40 ns	3,50 ns	28,00 ns
A x B x C	8	10,00 ns	5,20 *	26,30 ns
Resíduo subparcela (b)	84	8,80	2,00	16,40
<b>CV<sup>3</sup> (a)</b>		27,20	10,10	15,30
<b>CV (b)</b>		11,90	8,80	9,90

<sup>1</sup>FV: Fonte de variação; <sup>2</sup>GL: Grau de liberdade; <sup>3</sup>CV: Coeficiente de variação; \*\*, \*: significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste F; ns: não significativo.

Para as variáveis relacionadas a produção de biomassa: peso seco do colmo (PSC), peso seco de folha (PSF) e peso seco de planta (PSP), apesar das diferenças de magnitude em cada variável, as tendências de comportamento dos inoculantes para os genótipos foram semelhantes entre as variáveis (Figura 11).



**Figura 11-** Peso seco do colmo (PSC, g), peso seco de folhas (PSF, g), peso seco de planta (PSP, g), avaliados em três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes e regimes hídricos. C (Controle sem Inoculação); CN (Controle com Nitrogênio); I1 (Inoculante 1- *Nitrospirillum Amazonense*); I2 (Inoculante 2- Coquetel com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas); I3 (Inoculante 3- Rizobactéria *Exiguobacterium acetyllicum*).

Em relação a variável peso seco de colmo (PSC), destaca-se o I1 para o genótipo RB966928, que em ambos os regimes hídricos superou os demais

tratamentos testados. As maiores diferenças frente aos demais, podem ser observadas no regime irrigado, onde possui peso médio de aproximadamente 40 g e quando comparado ao controle (28,8 g) utilizando como base os valores médios, representa um incremento de peso de 41,4%, e quando comparado ao controle com nitrogênio (35,0 g), um incremento de 16,1%. Para os demais tratamentos só é observado incremento para o genótipo RB016916 no regime de restrição hídrica, em que os I1, I2 e I3 apresentam aumento no PSC quando comparados ao controle sem inoculação, ainda é possível ressaltar que I1 e I2 foram superiores ao controle com nitrogênio.

Quanto a variável PSF no regime irrigado observa-se maior peso para o genótipo RB867515 quando comparado aos demais, em relação aos inoculantes não se observa efeito no aumento de peso, do mesmo modo que para o genótipo RB016916. Para o genótipo RB966928 o I1 proporcionou os maiores valores de PSF no regime irrigado e aumento em comparação aos controles no déficit hídrico. A inoculação do I1 e I2 no genótipo RB016916 proporcionou um significativo aumento no peso das folhas sob regime de restrição hídrica quando comparado aos controles com e sem nitrogênio.

Para a variável PSP, conforme o esperado, a resposta a inoculação é semelhante as variáveis PSC e PSF, tendo em vista que essas compõe o PSP. Corroborando com os resultados apresentados anteriormente, para RB867515 I1 e I2 promoveram aumento no peso de planta, assemelhando-se ao controle com nitrogênio, porém no déficit hídrico apenas I1 e controle com nitrogênio obtiveram incremento no peso. É interessante observar os resultados obtidos para o genótipo RB016916 em condições de déficit hídrico, onde todos os tratamentos inoculados obtiveram aumento no peso de planta em relação ao controle. Ainda cabe salientar que as combinações deste genótipo com I1 e I2 obtiveram peso superior ao controle com nitrogênio. O I1 obteve o maior incremento no PSP para RB966928 no regime irrigado, entretanto no déficit hídrico foi semelhante aos controles.

Cabe ressaltar, que embora o genótipo RB861575 apresente maior peso de colmos entre os genótipos no inoculante controle no regime irrigado, o que indica a superioridade deste genótipo para essa variável, a inoculação com o I1 no genótipo RB966928 proporcionou maior incremento de peso, superando

todos os demais tratamentos, tanto no regime irrigado quanto no regime com restrição hídrica.

#### **5.4 Discussão**

No regime com restrição hídrica, conforme esperado, foi observada a redução no número de folhas verdes, em comparação ao regime irrigado (Figura 10). A redução no NFV tem sido atribuída em diversos trabalhos como uma estratégia que visa diminuir a superfície transpirante e o gasto metabólico para manutenção deste tecido (INMAM-BAMBER; SMITH, 2005). Smit; Singles (2006) sugerem que a senescência foliar e a paralisação do surgimento de folhas são respostas ao estresse hídrico, e indicam que estes fatores estão associados também ao genótipo da planta. Neste estudo, para RB966928, o maior NFV foi observado para plantas inoculadas com I2, apresentando resultados semelhantes a plantas adubadas com nitrogênio. Nos demais genótipos os inoculantes não proporcionaram incremento na manutenção de folhas verdes. Conforme Inman-Bamber (2004), o NFV pode ser utilizado como um indicador do efeito do estresse em cana-de-açúcar.

Quanto ao teor de clorofila, no regime irrigado, para RB867515, houve uma resposta benéfica frente a utilização de inoculantes, todas as plantas inoculadas obtiveram incremento no índice de clorofila, ainda ressalta-se que nos inoculantes 1 e 2 foi verificado resultados semelhantes ao controle com aplicação de nitrogênio, uma resposta importante quando consideramos a redução do uso de fertilizantes químicos na cana-de-açúcar. Para o genótipo RB966928 também foram verificadas respostas positivas a inoculação, contudo, é possível destacar a associação benéfica desse genótipo ao I1, uma vez que essas plantas apresentaram o maior índice de clorofila.

No déficit hídrico, o I2 obteve destaque para os três genótipos avaliados, com base nos resultados é possível inferir que os microrganismos possam ter atuado na manutenção do conteúdo de clorofila em plantas sob déficit hídrico, uma vez que esses microrganismos têm papel na absorção de nutrientes constituintes da molécula de clorofila. Para RB867515 e RB016916 é possível observar que os valores médios para teor de clorofila foram expressivamente maiores no I2, quando comparado aos demais. Para o genótipo RB966928,

apesar de as diferenças serem menos expressivas, as plantas inoculadas foram significativamente superiores ao controle e controle com nitrogênio. Para este genótipo também foi verificado incremento no índice de clorofila sob déficit hídrico em plantas inoculadas com I1. Cabe destacar, que os resultados obtidos para o I2 no déficit hídrico, assemelham-se aos resultados obtidos no regime irrigado. Quando os teores de clorofila aumentam ou não se alteram com o déficit hídrico, há evidências de que mecanismos antioxidantes estão ativos e esse fato pode ser compreendido como uma forma de tolerância ao déficit hídrico (YANG, 2006).

Diferentemente do resultado obtido neste estudo, Silva et al. (2012) ao avaliar quatro variedades de cana-de-açúcar observou valores elevados de clorofila para RB867515 sob condições de déficit hídrico. No entanto nos genótipos avaliados no presente estudo, as plantas controle de RB867515 apresentaram valor médio para CLF inferior, em condições de estresse, aos demais genótipos testados. Contudo, vale destacar que quando inoculada com I2, RB867515 obteve a maior média para essa variável em condições de estresse, juntamente com o genótipo RB016916, também inoculado com I2.

O índice de clorofila foliar está intimamente ligado ao teor de nitrogênio, uma vez que este possui papel fundamental no metabolismo vegetal, por participar diretamente na biossíntese de proteínas e de clorofilas (ANDRADE et al., 2003), ainda Markwell et al. (1995) indica que o teor de clorofila nas folhas da planta é proporcional à quantidade de nitrogênio que ela absorveu, logo o aumento nos índices de clorofila observado nas plantas sob efeito dos inoculantes pode ser em consequência do maior fornecimento de nitrogênio através destes microrganismos.

Quando as plantas são submetidas ao déficit hídrico, geralmente ocorre a diminuição das trocas gasosas, o fechamento estomático reduz a dissipação de vapor d'água ao mesmo tempo que provoca a redução na assimilação de CO<sub>2</sub> (MEDEIROS et al., 2013). Neste estudo, em condições de déficit hídrico foi observada redução nas variáveis de trocas gasosas, taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A), condutância estomática (gs) e transpiração (E). A redução da condutância estomática é uma resposta esperada em plantas submetidas ao déficit hídrico, sendo considerada uma estratégia primária para impedir a perda

excessiva de água pelas folhas (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005; SILVA et al., 2013).

Medeiros et al. (2013) ao estudar o efeito fisiológico do déficit hídrico em duas variedades de cana-de-açúcar, observou declínio de até 99,6% na taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>, para a variedade RB867515, com valor médio de 0,19 μmol de CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Neste trabalho, mesmo em condições de déficit hídrico, foi verificado efeito da inoculação na taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>, que pode ser observado nos genótipos RB966928, onde I2 e I3 proporcionaram incremento de 93,3% e 43,1%, quando comparados ao controle, e no genótipo RB016916, o I1 aumentou em 56,7% a taxa de assimilação. O I2 proporcionou o maior aumento em A para RB966928, comparado aos controles e inoculantes testados.

Ao avaliar cana-de-açúcar é importante observar que a produtividade está intimamente associada a fotossíntese, que é fonte de carbono e energia para o crescimento das plantas, logo associada a produção de biomassa. Silva et al., (2007) sugerem que a capacidade das plantas manterem processos fisiológicos como fotossíntese e trocas gasosas, durante o período de estresse hídrico, pode ser um indicativo em potencial para a manutenção da produtividade em condições de déficit hídrico.

As plantas desenvolveram mecanismos fisiológicos que visam reduzir a perda de água durante os períodos de déficit hídrico. O fechamento dos estômatos é um exemplo claro, sendo considerada uma resposta primária a restrição hídrica (SILVA et al., 2013). A condutância estomática é proporcional ao diâmetro da abertura estomática e é regulada pelas condições de turgidez das células-guarda.

A baixa condutância estomática, além de reduzir a perda de água também diminui a difusão de CO<sub>2</sub> nas folhas. Dessa forma, o fechamento estomático tem influência também na transpiração e fotossíntese estando intimamente relacionado à taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>. Sendo assim, um dos principais fatores que influencia a redução da taxa fotossintética é o fechamento estomático (HOANG; HIROO; YOSHINOBU, 2018). O aumento da resistência a difusão de CO<sub>2</sub> dentro das células têm como consequência a alteração e possível redução na produção de fotoassimilados, podendo causar o declínio da produtividade (PAIVA et al., 2005).

Ao avaliar cana-de-açúcar em condições de estresse hídrico, Silva et al. (2012) indicam que as variáveis relacionadas a taxa de transpiração, condutância estomática e teor de clorofila (índice SPAD), são as que tem maior influência sobre a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>.

Caracteres biométricos são importantes componentes da produtividade final da cana-de-açúcar, conforme apontam Silva et al. (2008), entre as principais alterações morfológicas em resposta ao déficit hídrico destacam-se altura de plantas, número e diâmetro dos colmos, número de folhas verdes e área foliar. Algumas dessas respostas são consideradas estratégias para combater os efeitos negativos da deficiência hídrica, dessa forma sendo considerados mecanismos de tolerância ao déficit hídrico (INMAM-BAMBER; SMITH, 2005).

A redução na área foliar é uma resposta ao déficit hídrico, que afeta tanto a formação quanto o tamanho das folhas, e é uma forma alternativa para a planta diminuir a superfície transpirante, bem como o gasto metabólica para a manutenção dos tecidos (SANTOS; CARLESSO, 1998; SMIT; SINGELS, 2006).

Em trabalho conduzido por Vargas et al. (2014), foi verificado o potencial benéfico da bactéria diazotrófica *G. diazotrophicus*, em associação com a cultivar SP70-1143 de cana-de-açúcar, ao promover alterações metabólicas em resposta ao estresse. Este é um dos primeiros resultados que evidencia que microrganismos podem melhorar a tolerância a deficiência hídrica em cana-de-açúcar.

Por outro lado, Rampazzo et al. (2018), evidenciaram uma nova rizobactéria, que promove o crescimento e incrementos na fotossíntese da cana-de-açúcar, em condições irrigadas. No entanto, ao testar a inoculação em condições de déficit hídrico, apesar do microrganismo ter melhorado a assimilação de CO<sub>2</sub>, foram observados efeitos negativos da inoculação em parâmetros de crescimento. De acordo com esses autores a perda do efeito benéfico do crescimento em condições de déficit hídrico, pode estar associada com o aumento da demanda de carbono e energia por parte da rizobactéria, bem como a sensibilidade de alguns microrganismos ao déficit hídrico.

## 5.4 Conclusões

- I. O inoculante 2, formulado por um coquetel de bactérias diazotróficas, promove incrementos no índice de clorofila para os genótipos avaliados sob condições de déficit hídrico
- II. A taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> é influenciada positivamente pelos inoculantes nos genótipos RB966928 e RB016916 sob restrição hídrica.
- III. A fórmula comercial Aprinza<sup>®</sup> (inoculante 1) e o coquetel de bactérias diazotróficas (inoculante 2) promovem ganhos de biomassa nos genótipos avaliados em déficit hídrico.
- IV. O genótipo RB966928 é altamente responsivo ao I1 em condições irrigadas, apresentando destaque para a maioria das variáveis avaliadas.

## 6. Considerações finais

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que os inoculantes desenvolvidos para cana-de-açúcar apresentam efeitos positivos em características importantes como altura de planta, diâmetro, área foliar e índice de clorofila, atuando na promoção de crescimento das mudas.

Além disso, os inoculantes proporcionam aumento da assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, atuam na manutenção do conteúdo de clorofila e promovem incremento na biomassa, mesmo após período de restrição hídrica moderada a grave, essas características são associadas a tolerância ao déficit hídrico. O que indica, que esses microrganismos minimizam os efeitos da restrição hídrica e podem promover a tolerância ao déficit hídrico em cana-de-açúcar.

De forma geral, podemos destacar a combinação da inoculação com a formulação comercial Aprinza<sup>®</sup> (inoculante 1) no genótipo RB966928, que apresentou resposta benéfica na maioria das variáveis avaliadas com tendência de aumento no valor médio. Em condições irrigadas, esta combinação de genótipo x inoculante apresentou destaque para a maioria das variáveis.

Contudo, as respostas positivas ao uso de inoculantes apresentam certa variabilidade nos resultados, sendo este um obstáculo no estudo dessa tecnologia. Estas respostas podem estar associadas a características do genótipo da planta, aos microrganismos utilizados, interações com a microbiota do solo, ou até mesmo condições edafoclimáticas.

Com base nos resultados, podemos inferir que existe especificidade na relação genótipo x inoculante, logo faz-se necessário mais estudos com diferentes genótipos e microrganismos que explorem essa relação e permitam encontrar aqueles que possuem maior afinidade, assim potencializando os ganhos dessa interação. Além disso, vale lembrar que a seleção de genótipos responsivos à inoculação seria uma alternativa para o aumento da FBN, e conseqüentemente para o aumento de produtividade, bem como para a redução da dependência do uso de fertilizantes químicos no cultivo da espécie. A inserção do estudo dessa relação em fases iniciais de seleção em programas de melhoramento genético pode levar a seleção de genótipos mais responsivos à inoculação ou seja com maior potencial para FBN.

Uma vez que as respostas das plantas ao estresse hídrico são complexas e envolvem diferentes genes que produzem respostas em níveis bioquímicos, fisiológicos e moleculares, torna-se de suma importância a realização de estudos bioquímicos e moleculares que tenham como objetivo esclarecer a forma como as bactérias promotoras do crescimento vegetal atuam na tolerância a diferentes estresses e promovem o crescimento de espécies cultivadas em condições ambientais desfavoráveis. A utilização marcadores bioquímicos e moleculares, bem como a análise de expressão gênica podem ser ferramentas estratégicas importantes na elucidação da interação planta-microrganismo, bem como das respostas fisiológicas das plantas frente a inoculação.

## 7. Referências

- AGUIAR, N. O. **Perfil metabólico de cana-de-açúcar tratada com bioinoculante à base de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas**. Tese (Doutorado – Produção Vegetal) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, RJ, 2015.
- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiol Res** 163 (2):173–181, 2008.
- ALBAREDA, M.; NAVARRO, D. N. R.; CAMACHO, M.; TEMPRANO, F. J. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 2771-2779, 2008.
- ALI, F.; BANO, A.; FAZAL, A. Recent methods of drought stress tolerance in plants. **PlantGrowthRegul**, v. 82, p. 363 – 375, 2017.
- ALMEIDA, A. C. S.; SOUZA, J. L.; TEODORO, I.; BARBOSA, G.V.S.; MOURA FILHO, G.; FERREIRA JÚNIOR, R. A. Desenvolvimento vegetativo e produção de variedades de cana-de-açúcar em relação à disponibilidade hídrica e unidades térmicas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, p.1441-1448, 2008.
- ALVES, G. C.; SOBRAL, L. F.; REIS, V. M. Rendimento de grãos de milho inoculado com bactérias diazotróficas com aplicação de fertilizante nitrogenado. **Revista Caatinga**, v. 33, n. 3, p. 644-652, 2020.
- ANDRADE, A. C.; FONSECA, D. M.; QUEIROZ, D. S.; SALGADO, L. T.; CECON, P. R. Adubação nitrogenada e potássica em capim-elefante (*Pennisetumpurpureum*Schum. cv. Napier). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, p.1643-1651, 2003.
- ANDRADE, L.A. de B. Cultura da cana-de-açúcar. In: CARDOSO, M. das G. (Ed.). **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. 2.ed.rev. eamp. Lavras: UFLA, 2006. cap.1, p.25-67.
- ANDREOTE, F. D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 2007. 201p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade de São Paulo / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2007.
- ANTUNES, W. R. **Desempenho de genótipos de cana-de-açúcar em cinco locais no Rio Grande do Sul**. 2015. 90 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2015.
- ANTUNES, W. R.; SCHÖFFEL, E. R.; SILVA, S. D. DOS A. E; HÄRTER, A.; CAMPOS, A. D. S. DE; MONTERO, C. R. S. Productive performance of early sugar cane genotypes in Rio Grande do Sul state, Brazil. **ScientiaAgraria**, v.18, n.2, p.136-142, 2017.

ARTURSSON, V.; FINLAY, R. D.; JANSSON, J. K. Interactions between arbuscularmycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. **Environmental microbiology**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2006.

AZEVEDO NETO, A. D. et al. Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 16, n. 1, p. 31-38, 2004.

AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 280-29, 1998.

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

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.; 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, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; KIMURA, O.; DÖBEREINER, J. **Bactérias fitopatogênicas fixadoras de N<sub>2</sub> em associação com plantas**. Embrapa Agrobiologia- Documentos 41, 25p. 1997.

BALESTRO, G. C.; HIGASHI, B.; LOPES, S. M. S.; GONÇALVES, J. E.; VIEIRA, L. G. E.; DE OLIVEIRA, A. J. B.; GONÇALVES, R. A. C. Biochemical composition of symplastic sap from sugarcane genetically modified to overproduce proline. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 113, p. 133-140, 2017.

BARBOSA, A. M.; GUIDORIZI, K. A.; CATUCHI, T. A.; MARQUES, T. A.; RIBEIRO, R. V.; SOUZA, G. M. Biomass and bioenergy partitioning of sugarcane plants under water deficit. **Acta Physiologiae Plantarum** v. 37, n. 8, p. 1-8, 2015.

BARRS, H.D. Determination of water deficits in plant tissue. In: KOZLOWSKI, T.T. (Ed) **Water deficits and plant growth**. New York, Academic Press, 1968. v.1, p.235-368.

BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian J. Microbiol.**, 43:103-121, 1997.

BASNAYAKE, J.; JACKSON, P. A.; INMAN-BAMBER, N. G.; LAKSHMANAN, P. Sugarcane for water-limited environments. Variation in stomatal conductance and its genetic correlation with crop productivity. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 13, p. 3945-3958, 2012.

BATES, L. S; WALDREN, R. P; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and soil**, v. 39, n. 1, p. 205-207, 1973.

BELLONE, C. H.; BELLONE, D. V. C.; PEDRAZA, R. O.; MONZON, M. A. Cell colonization and infection thread formation in sugar cane roots by *Acetobacterdiazotrophicus*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 56, p. 965 – 967, 1997.

BHARGAVA, S.; SAWANT, K. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. **Plant Breeding**, v. 132, n. 1, p. 21-32, 2013.

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

BRASIL, 2004, **Decreto n. 4954, de 14 de jan.de 2004**. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2004/decreto/d4954.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/decreto/d4954.htm)> Acesso em 12 de jun. de 2020.

BRUNINI, O. Ambientes climáticos e exploração agrícola da cana-de-açúcar. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: IAC, 2008. p.205-218.

BUCHER, C. A.; REIS, V. M. **Biofertilizante contendo bactérias diazotróficas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 17p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 247).

CARVALHO, T. L. G.; BALSEMÃO-PIRES, E.; SARAIVA, R. M.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 19, p. 5631-5642, 2014.

CAVALCANTE, V. A.; DOBEREINER, J. A new acidtolerantnitrogen-fixingbacteriumassociatedwithsugarcane. **PlantandSoil**. v. 108, p. 23 – 31, 1988.

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.

CHAVES, V. A.; SANTOS, S. G.; SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; REIS, V. M. Desenvolvimento inicial de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Viçosa-MG, v. 39, n. 6, p. 1595-1602, 2015

CIA, M. C. **Resposta antioxidativa em variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) sob déficit hídrico**. 2010. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

COHEN, A.C.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P.N. Azospirillumbrasilense Sp245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. **PlantGrowthRegulation**, v.54, p.97-103, 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acomp. safra bras. cana, v. 7 - Safra 2020/21**, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-57, maio 2021. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>>. Acesso em: 20 mai. 2021.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acomp. safra bras. cana, v. 8- Safra 2020/21**, n. 1 - Segundo levantamento, Brasília, p. 1-62, Agosto 2021. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>>. Acessoem: 19 ago. 2021.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. v.35, n.3, p.271-276, 2013.

DAROS, E.; OLIVEIRA, R. A.; ZAMBON, J. L. C.; FILHO, J. C. B. **Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar**. Curitiba: Ridesa, 2010. 136 p.

DAROS, E; OLIVEIRA, R. A.; BARBOSA, G. V. S. **45 anos de variedades RB de cana-de-açúcar: 25 anos de Ridesa**. Graciosa, Curitiba, 156p.

DAVIES, W. J.; ZHANG, J. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. **Annualreviewofplantbiology**, v. 42, n. 1, p. 55-76, 1991.

DENARDIN, N. D. A aplicação de inoculantes define o sucesso da nodulação. **VisãoAgrícola**. USP, ESALQ. Piracicaba, SP - 2006. 3 p

DEVOS, K. M. - Grass genome organization and evolution. **Current Opinion in Plant Biology**. vol. 13, n. 2, p. 139-145, 2010.

- DIAS, J. P. T. Respostas e adaptação a diferentes estresses abióticos. **Ecofisiologia de Culturas Agrícolas**. Editora da Universidade do Estado de Minas Gerais Belo Horizonte 2018, p. 19.
- DIMKPA, C; WEINAND, T.; ASCH, F. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. **Plant, cell&environment**, v. 32, n. 12, p. 1682-1694, 2009.
- 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
- DONG, Z.; CANNY, M. J.; MCCULLY, M. E.; ROBOREDO, M. R.; CABADILLA, C. F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophytic of sugar cane stems: a new role for the apoplast. **Plant Physiology**. v. 105, p. 1139 – 1147, 1994.
- DWYER, L.M., ANDERSON, A.M., MA, B.L., STEWART, D.W., TOLLENAR, M., GREGORICH, E., 1995. Quantifying the nonlinearity in chlorophyll content meter response to corn leaf nitrogen concentration. **Can. J. PlantSci.** 75, 179–182
- EMBRAPA, **Bactéria encontrada no mandacaru vira bioproduto que promove tolerância à seca em plantas**. EMBRAPA, 27 abr. 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/60941801/bacteria-encontrada-no-mandacaru-vira-bioproduto-que-promove-tolerancia-a-seca-em-plantas>> Acesso em: 24 mai. 2021.
- EMBRAPA. **Visão 2030: o futuro da agricultura brasileira**. – Brasília, DF : Embrapa, 2018.
- FAN, L.; LINKER, R.; GEPSTEIN, S.; TANIMOTO, E.; YAMAMOTO, R.; NEUMANN, P. M. Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stelar accumulation of wall phenolics. **Plant physiology**, v. 140, n. 2, p. 603-612, 2006.
- FAROOQ, M.; HUSSAIN, M.; WAHID, A.; SIDDIQUE, K. H. M Drought stress in plants: an overview. In: **Plant responses to drought stress**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 1-33.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs** (Portuguese). R package version 1.2.0. 2018. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=ExpDes.pt>
- FIGUEIREDO, M. V. B.; SOBRAL, J. K.; STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M. Bactérias promotoras do crescimento de plantas: estratégia para uma agricultura sustentável. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. P. O.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. **Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais**. Brasília: Embrapa Agrobiologia, 2010. Parte 4, Cap. 1, p. 387- 414.

FORCHETTI, G.; MASCIARELLI, O.; ALEMANO, S.; ALVAREZ, D.; ABDALA, G. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. **Appl Microbiol Biotechnol.** v.76, p. 1145 - 1152, 2007.

FUENTES-RAMIREZ, L. E.; JIMENES-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R.; CABALLEIRO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. **Plant and Soil.** v. 154, p. 145 – 150, 1993.

FUKAMI, J.; CERZINI, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v.8, n. 73, 12 p, 2018.

GAVA, G. J. de C.; SILVA, M. A.; SILVA, R. C.; JERONIMO, E. M.; CRUZ, J. C. S.; KÖLLN, O. T. Produtividade de três cultivares de cana-de-açúcar sob manejos de sequeiro e irrigado por gotejamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental.** Campina Grande, v. 15, n. 3, p. 250-255, 2011.

GAZOLLA, M; NIEDERLE, P. A; WAQUIL, P. D. Agregação de Valores na Agroindústria: Uma Análise de Com Base nos dados do Censo Agropecuário. **Revista Paranaense.** Curitiba, n 122, p 241, 262, de Julho 2012. Disponível em:  
<<http://www.ipardes.gov.br/ojs/index.php/revistaparanaense/article/view/396/708>> Acesso em: 23 jul. 2019.

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

GLICK B. R.; PENROSE D. M.; LI J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. **J Theor Biol** v. 190 p; 63-68, 1998.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian journal of microbiology**, v. 41, n. 2, p. 109-117, 1995.

GLICK, B.R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiol. Res.** 169, 30– 39, 2014.

GLICK, B.R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, 2012.

GONG, Ming; LI, Yong-Jun; CHEN, Shun-Zhong. Abscisic acid-induced thermotolerance in maize seedlings is mediated by calcium and associated with antioxidant systems. **Journal of Plant Physiology**, v. 153, n. 3-4, p. 488-496, 1998.

GROVER, M.; ALI, S. Z.; SANDHYA, V.; RASUL, A.; VENKATESWARLU, B. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses.

**World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 1231-1240, 2011.

GRZESIAK, M.T.; GRZESIAK, S.; SKOCZOWSKI, A. Changes of leaf water potential and gas exchange during and after drought in triticale and maize genotypes differing in drought tolerance. **Photosynthetica**, Pragma, v.44, p. 561-568, 2006

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPFER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HARTER, A. **Seleção avançada em cana-de-açúcar para tolerância ao déficit hídrico**. 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2018.

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.

HEMAPRABHA, G.; NAGARAJAN, R.; ALARMELU, S.; NATARAJAN, U. S. Parental potential of sugarcane clones for drought resistance breeding. **Sugar Tech**, v. 8, n.1, p. 59–62, 2006.

HERMANN, E.R.; CÂMARA, G.M.S. Um método simples para estimar a área foliar de cana-de-açúcar. **Revista da STAB**, v.17, p.32-35, 1999.

HOANG, D. T.; HIROO, T; YOSHINOBU, K. Nitrogen use efficiency and drought tolerant ability of various sugarcane varieties under drought stress at early growth stage. **Plant Production Science**. v. 22 p. 250-261, 2018.

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

IDO, O.T. **Desenvolvimento radicial e caulinar, de três variedades de cana-de-açúcar, em rizotron, em dois substratos**. 2003. 155 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

INMAN-BAMBER, N. G.; LAKSHMANAN, P.; PARK, S. Sugarcane for water-limited environments: Theoretical assessment of suitable traits. **Field Crops Research**, v. 134, p. 95-104, 2012.

INMAN-BAMBER, N.G.; SMITH, D.M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, v.92, p.185-202, 2005.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS- IAC. **Censo varietal IAC de cana-de-açúcar no Brasil - safra 2017/18 e na Região Centro-Sul - safra 2018/19**. Boletim de Pesquisa IAC, nº 221. Instituto Agrônomo, Campinas, SP., 64p., 2019.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Censo agropecuário de 2006**. Disponível em: <www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 28 jun. 2019.

IPCC: Summary for Policymakers. In: **Global warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty** [V. Masson-Delmotte, P. Zhai, H. O. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P.R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, J. B. R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M. I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor, T. Waterfield (eds.)]. World Meteorological Organization, Geneva, Switzerland, 32 p, 2018

JAIN, R.; SOLOMON, S.; SKRIVASTAVA, A. K.; CHANDRA, A. Sugarcane bud chips: a promising seed material. **Sugar Tech**, v. 12, n. 1, p. 67-69, 2010. Disponível em: . Acesso em: 08 abr. 2020.

JARDIM, T. M.; SCIVITTARO, W. B.; DA SILVA, A. S.; PARFITT, J. M. B.; TREPTOW, R. C. B.; BETTIN, H. C.; DA SILVEIRA, C. M. **Uso Combinado de Inoculantes de Bactérias Diazotróficas e Adubação Nitrogenada Mineral no Cultivo de Arroz Irrigado**. Embrapa Clima Temperado-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2018.

KASIM, W. A.; OSMAN, M. E.; OMAR, M. N.; EL-DAIM, I. A. A.; BEJAI, S.; MEIJER, J. Control of Drought Stress in Wheat Using Plant-Growth-Promoting Bacteria. **Journal of Plant Growth Regulation**, Egypt, v.32, n.1, p. 122-130, 2013.

KHAN, A. S.; GADELHA, J. V. M.; SILVA, L. M. R. Benefícios potenciais do desenvolvimento sustentável na agricultura cearense: O caso da região serrana de baturité. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 35, n. 1, p. 95-118, 1997.

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.

KLOEPPLER, J. L. Host specificity in microbe – microbe interactions. **BioScience**, v. 10, p.406 – 409, 1996.

KOONJAH, S. S.; WALKER, S.; SINGELS, A.; ANTWERPEN, R. VAN.; NAYAMUTH, A. R. A quantitative study of water stress effect on sugarcane photosynthesis. In: **Proc S Afr Sug Technol Ass**, v.80, p.148-158, 2006.

KUMAR, J.; SINGH, D.; GHOSH, P.; KUMAR, A. Endophytic and epiphytic modes of microbial interactions and benefits. In: **Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives**. Springer, Singapore, 2017. p. 227-253.

LARCHER W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RIMA, p 53, 2000.

LAKSHMANAN, P.; ROBINSON, N. Stress physiology: Abiotic stresses. **Sugarcane: Physiology, biochemistry, and functional biology**, p. 411-434, 2013.

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 cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas**. Ribeirão Preto: Instituto Agrônomo de Campinas, n.17, 2012.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v. 25, n. 2, p. 275-294, 2002.

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.

LI, R. O.; MACRAE, I. C. Specific association of diazotrophic *Acetobacters* with sugarcane. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 24, p. 413 – 419, 1991.

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.

LOPES, V. R. **Melhoramento genético de cana-de-açúcar em associação com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. 2013. 133f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

LOPES, V. R.; BESPALHOK FILHO, J. C.; FIGUEIREDO, G. G. O.; DE OLIVEIRA, R. A.; DAROS, E. Interaction between sugarcane families and plant growth-promoting bacteria in two crop cycles. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 2, p. 527-538, 2019.

MACHADO, D. F. S. P.; LAGÔA, A. M. M. A.; RIBEIRO, R. V.; MARCHIORI, P. E. R.; MACHADO, R. S.; MACHADO, E. C. Baixa temperatura noturna e deficiência hídrica na fotossíntese de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 5, p. 487-495, 2013.

MACHADO, R. S. **Respostas fisiológicas de genótipos de cana-de-açúcar ao déficit hídrico imposto na fase inicial de desenvolvimento**. 2009. 64 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônomo de Campinas - Campinas, 2009.

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.

MAHAFFEE, W. F.; BAUSKE, E. M.; VAN VUURDE, J. W.; VAN DER WOLF, J. M.; VAN DEN BRINK, M.; KLOEPPER, J. W. Comparative analysis of antibiotic resistance, immunofluorescent colony staining, and a transgenic marker (bioluminescence) for monitoring the environmental fate of rhizobacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 1617-1622, 1997.

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).

MARANHÃO, F.M. Efeito de diferentes inoculantes sobre as características estruturais de cultivares de *Panicum maximum*. **Ipê Agronomic Journal**, v. 3, n. 2, p. 56-63, 2019.

MARCOS, F.C.C. **Influência de bactérias endofíticas na fisiologia de plantas de cana-de-açúcar sob restrição hídrica**. 2012. 64f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônomo, Campinas.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.

MARIN, F. R.; PELLEGRINO, G. Q.; ASSAD, E. D.; PINTO, H. S.; ZULLO JUNIOR, J. Cana-de-açúcar. **Agrometeorologia dos cultivos: o fator meteorológico na produção agrícola**. Brasília, DF: INMET, p. 109-130, 2009.

MARIN, F. R.; NASSIF, D. S. P. Mudanças climáticas e a cana-de-açúcar no Brasil: Fisiologia, conjuntura e cenário futuro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v17, p.232-239, 2013.

MARKWELL, J.; OSTERMAN, J.C.; MITCHELL, J.L. Calibration of the Minolta SPAD502 leaf chlorophyll meter. **Photosynthesis Research**, v.46, p.467-472, 1995.

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.

MATOSO, E. S. **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.

MATOSO, E. S.; REIS, V. M.; GIACOMINI, S. J.; SILVA, M. T. D.; AVANCINI, A. R. Diazotrophic bacteria and substrates in the growth and nitrogen accumulation of sugarcane seedlings. **Scientia Agricola**, v. 78, n. 1. 2020.

MATSUOKA, S. **Botânica e ecofisiologia da cana-de-açúcar**. In: CURSO DE QUALIFICAÇÃO EM PLANTAS INDUSTRIAIS - Cana-de-açúcar. Maringá: UFPR/SENAR, 1996. 34p

MAY, A.; RAMOS, N. P. **Uso de gemas individualizadas de cana-de-açúcar para a produção de mudas**. Jaguariúna: Embrapa, 2019.

MEDEIROS, D. B.; SILVA, E. C. D.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; TEIXEIRA, M. M.; BUCKERIDGE, M. S. Physiological limitations in two sugarcane varieties under water suppression and after recovering. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 25, n. 3, p. 213-222, 2013.

MENDIBURU, F. **Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.3-3**. 2020. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>

MENDONÇA, J. J.; JUNIOR, M. A. L.; CARVALHO, E. X.; FRACETTO, G. G. M.; FRACETTO, F. J. C.; ALVES, M. J. G.; DE PAULA OLIVEIRA, J. Diversidade, mecanismos de atuação e potencial agrícola de bactérias promotoras de crescimento de plantas, usando milho como cultura exemplo. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 25, n. 2, 2020.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA (MME). **Resenha Energética Brasileira - Exercício de 2018**. edição 2019, v.3, Brasília- DF, p. 1-32, 2019. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/web/guest/publicacoes-e-indicadores>>. Acesso em: 29 de julho de 2019.

MONTALDO, Y. C. **Bioprospecção e isolamento de bactérias associadas à cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) com características para a promoção de crescimento vegetal**. Tese (Doutorado em Rede Nordeste de Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós Graduação em Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, p. 101, 2016.

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

- NABTI, E.; SAHNOUNE, M.; GHOUL, M.; FISCHER, D.; HOFMANN, A.; ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. Restoration of growth of durum wheat (*Triticumaestivum* var. waha) under saline conditions due to inoculation with the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* NH and extracts of the marine alga *Ulva lactuca*. **J Plant Growth Regul**, v.29, p. 6-22, 2010.
- NAYAK, S.N.; SONG, J.; VILLA, A.; PATHAK, B.; AYALA-SILVA, T.; YANG, X. et al. Promoting utilization of *Saccharum* spp. Genetic resources through genetic diversity analysis and core collection construction. **PLOS ONE** 9: e110856. doi:10.1371/journal.pone.0110856, 2014.
- NERKAR, G. A.; PURANKAR, M. V.; SHEELAVANTMATH, S.; DEVARUMATH, R. M. Biotechnological approach: A new dimension for sugarcane improvement. **Biotechnology to Enhance Sugarcane Productivity and Stress Tolerance**, p. 1-24, 2018.
- NICCHIO, B.; CARDOZO, C. C.; VIEIRA, M. A. M. Efeitos de substratos na qualidade de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 25, n. 1, 2020.
- OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil** 242: 205-215, 2002.
- OLIVEIRA, A.L.M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; BALDANI J.I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v.284, p.23-32, 2006.
- OLIVEIRA, R. A.; DAROS, E.; ZAMBON, J. L. C.; WEBER, H.; IDO, O. T.; BESPALHOK-FILHO, J. C.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; SILVA, D. K. T. Área foliar em três cultivares de cana-de-açúcar e sua correlação com a produção de biomassa. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, p. 71-76, 2007.
- PAIVA, A. S.; FERNANDES, E. J.; RODRIGUES, T. J. D.; TURCO, J. E. P. Condutância estomática em folhas de feijoeiro submetido a diferentes regimes de irrigação. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v.25, n.1, p. 161-160, 2005.
- PANKIEVICZ, V. C. S.; DO AMARAL, F. P.; ANÉ, J. M.; STACEY, G. Diazotrophic Bacteria and Their Mechanisms to Interact and Benefit Cereals. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, p. MPMI-11-20-0316-FI, 2021.
- PATRIQUIN, D. G.; DÖBEREINER, J., JAIN, D. K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 900-915. 1983.
- PAULI, D. G. de, **Planejamento da qualidade do plantio mecanizado de cana de açúcar**. 2009. 275 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)–Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, p. 62-77, 2002.

PEREIRA, L. M.; PEREIRA, E. M.; REVOLTI, L. T. M.; ZINGARETTI, S. M.; MÔRO, G. V. Seedquality, chlorophyllcontent index andleafnitrogenlevels in maizeinoculated with *Azospirillum brasilense*. **Revista Ciência Agronômica**, 2015, 46, 630–637.

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.

PIMENTEL, C. **A relação da água com a planta**. Seropédica: Edur, 2004. 191p.

PINCELLI, R.P., **Tolerância à deficiência hídrica em cultivares de cana-de-açúcar avaliada por meio de variáveis morfofisiológicas**. 2010. Dissertação (Mestrado). Botucatu, UNESP.2010.

PIÑON, D.; CASAS, M.; BLANCH, M.; FONTANIELLA, B.; BLANCO, Y.; VICENTE, C.; SOLAS, M.T.; LEGAZ, M.E. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugarcane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugarcane pathogen. **Research in Microbiology**, v.153, p.345-351, 2001.

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

PRABU, G.; KAWAR, P.G.; PAGARIYA, M.C.; PRASAD, D. T. Identification of water deficit stress upregulated genes in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 29, n.2, p. 291–304, 2011.

QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 577-582, 1997.

QUADT-HALLMANN, A.; KLOEPPER, J. W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1144-1154, 1996.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

RAMESH, P. Effect of different levels of drought during the formative phase on growth parameters and its relationship with dry matter accumulation in sugarcane. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.185, p.83-89, 2000.

RAMPAZZO, P. E.; MARCOS, F. C. C.; CIPRIANO, M. A. P.; MARCHIORI, P. E. R.; FREITAS, S. S.; MACHADO, E. C; RIBEIRO, R. V. Rhizobacteria improve sugarcane growth and photosynthesis under well-watered conditions. **Annals of Applied Biology**, v. 172, n. 3, p. 309-320, 2018.

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.; RIOS, F. A.; BRAZ, G. B. P.; CONSTANTIN, J.; HIRATA, E. S.; BIFFE, D. F. Agronomic performance of sugarcane inoculated with *Nitrospirillum amazonense* (BR11145). **Revista Caatinga**, v. 33, p. 918-926, 2020.

RESENDE, M. D. V.; LOPES, P.S.; SILVA, R. L.; PIRES, I. E. Seleção genômica ampla (GWS) e maximização da eficiência do melhoramento genético. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 56, p. 63-78, 2008.

RIBEIRO, F. S.; NOGUEIRA, L. C.; PEREIRA, W.; SANTOS, S. G.; REIS, V. M. Resposta da variedade RB966928 a inoculação de cinco estirpes de bactérias diazotróficas isoladas e ao inoculante misto. In: **XXXV Congresso brasileiro de Ciência do Solo**, Natal, 2015.

ROCHA, F. R.; PAPINI-TERZI, F. S.; NISHIYAMA, M. Y.; VÊNCIO, R. Z.; VICENTINI, R.; DUARTE, R. D.; ... & SOUZA, G. M. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC genomics**, v. 8, n. 1, p. 1-22, 2007.

RODRIGUES, D.; ORTIZ, L. **Em direção à sustentabilidade da produção de etanol de cana-de-açúcar no Brasil**. Porto Alegre: Núcleo Amigos da Terra, 2006. 37p.

ROMANO, T. **Inoculação de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar: efeito do nitrogênio e genótipo vegetal**. 2016. 74f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. 2016.

ROSADO, C. C. G.; SOBREIRA, F. B. S.; DA SILVA, F. D.; DE SOUZA, L. C.; SOARES, T. C. B. Genes candidatos e mecanismos fisiológicos relacionados ao estresse hídrico em plantas. **Tópicos Especiais em Genética e Melhoramento II**, p. 115. 2018.

RUGERI, A. P. **Identificação do uso e desempenho de genótipos de cana-de-açúcar no Estado do Rio Grande do Sul**. 2015, 91 p. Dissertação - Mestrado em Sistemas de Produção Agrícola Familiar, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

SAGE, R. F.; PEIXOTO, M. M.; SAGE, T. L. Photosynthesis in sugarcane. **Sugarcane: Physiology, biochemistry, and functional biology**, p. 121-154, 2013.

SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, J. G.; SILVEIRA, A. P. D. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.833-842, 2007

SALA, V. M. R.; DOS SANTOS FREITAS, S.; DA SILVEIRA, A. P. D. Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 11, p. 1593-1600, 2007.

SALIENDRA, N.Z.; MEINZER, F.C.; PERRY, M.; THOM, M. Associations between partitioning of carboxylase activity and bundle sheath leakiness to CO<sub>2</sub>, carbon isotope discrimination, photosynthesis, and growth in sugarcane. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p.907-914, 1996.

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

SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 2, n. 3, p. 287-294, 1998.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 199-212, jul./dez. 2011.

SAUTER, A.; DAVIES, W. J.; HARTUNG, W. The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot. **Journal of experimental botany**, v. 52, n. 363, p. 1991-1997, 2001.

SCARPARI, M. S.; BEAUCLAIR, E. G. F. Anatomia e botânica. In: Leila Luci Dinardo-Miranda; Antônio Carlos Machado de Vasconcellos; Marcos Guimarães de Andrade Landell. (Org.). **Cana-de-açúcar**. 1ed. Campinas/SP.: Instituto Agrônomo. 2008 .v. 1, p. 47-56.

SCHULTZ, N. **Fixação Biológica de Nitrogênio Associada à Cultura de Cana-de-açúcar**: Eficiência e Contribuição da Inoculação com Bactérias Diazotróficas. 126 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Agronomia (Ciência do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

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

SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. S. Produtividade e diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, n.9, p.1594-1601, 2016.

SCUDELETTI, D. **Modos de inoculação de *Azospirillum brasilense* em cana-de-açúcar**. 2016. 42 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. 2016

SENTELHAS, P. C.; MONTEIRO, J. E. B. de A. Agrometeorologia dos Cultivos: informações para uma agricultura sustentável. In: MONTEIRO, J. E. B. A. (Org.). **Agrometeorologia dos cultivos: o fator meteorológico na produção agrícola**. Brasília, DF: INMET, 2009. p. 3-12.

SHAW, M. E. A.; INNES, R. F. The growth pattern and yield of annual cane planted at different seasons and the effects of nitrogen treatments. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 12., 1965, San Juan, Puerto Rico. **Proceedings...** Louisiana: Franklin Press, 1965. p. 401-428.

SHIN, W.; ISLAM, R.; BENSON, A.; JOE, M. M.; KIM, K.; GOPAL, S.; SA, T. Role of diazotrophic bacteria in biological nitrogen fixation and plant growth improvement. **Korean journal of soil science and fertilizer**, v. 49, n. 1, p. 17-29, 2016.

SILVA, A. L. C.; GOES, B. C.; PUTTI, F. F. **Sustentabilidade em sistemas agropecuários**. Editora ANAP. 2020.

SILVA, G. M. **Avaliação da ocorrência de seca no Estado do Rio Grande do Sul**. 2015. 126f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Manejo e Conservação do Solo e da Água. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

SILVA, M. A.; CATO, S. C.; COSTA, A. G. F. Produtividade e qualidade tecnológica da soqueira de cana-de-açúcar submetida à aplicação de biorregulador e fertilizantes líquidos. **Ciência Rural**, 40: 774-780, 2010.

SILVA, M. A.; JIFON, J. L.; DOS SANTOS, C. M.; JADOSKI, C. J.; DA SILVA, J. A. G. Photosynthetic capacity and water use efficiency in sugarcane genotypes subject to water deficit during early growth phase. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 56, p. 735–748. 2013.

SILVA, M. A.; SILVA, J. A. G.; ENCISO, J.; SHARMA, V.; JIFON, J. Yield components as indicators of drought tolerance of sugarcane. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 6, p. 620-627, 2008.

SILVA, M. D. A.; JIFON, J. L.; DA SILVA, J. A.; SHARMA, V. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n.3, p. 193–201, 2007.

SILVA, M. O. **Bactérias associadas à cana-de-açúcar: isolamento e potencial promoção de crescimento vegetal**. 2011. 70 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SILVA, P. P.; SOARES, L.; DA COSTA, J. G.; DA SILVA VIANA, L.; DE ANDRADE, J. C. F.; GONÇALVES, E. R.; SANTOS, J. M.; BARBOSA, G. V. S.; NASCIMENTO, V. X.; TODARO, A. R. RIFFEL, A.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; BARBOSA, M. H. P.; SAT'ANA, A. E. G.; RAMALHO NETO, C. E. Path analysis for selection of drought tolerant sugarcane genotype through physiological components. **Industrial crops and products**, v. 37, n. 1, p. 11-19, 2012

SILVA, R. G. D. **Efeito combinado da elevada [CO<sub>2</sub>] atmosférica e déficit hídrico em genótipos de cana-de-açúcar**. 2021. 156 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal-SP.

SILVA, S. D. A.; MONTERO, C. R. S.; SANTOS, R. C.; NAVA, D. E.; GOMES, C. B.; ALMEIDA, I. R. **Sistema de produção de cana-de-açúcar para o Rio Grande do Sul**. 247 p. Sistemas de Produção, Embrapa Clima Temperado, INFOTECA-E. 2016

SINGH, P.N.; SHUKLA, S.K.; BHATNAGAR, V.K. Optimizing soil moisture regime to increase water use efficiency of sugarcane (*Saccharum* spp. Hybrid complex) in subtropical India. **Agricultural Water Management**, v.90, p.95 - 100, 2007.

SMIT, M.A.; SINGELS, A. The response of sugarcane canopy development to water stress. **Field Crops Research**, South Africa, v. 98, p. 91-97, 2006.

SOTTERO, A.N. **Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias**. Dissertação de Mestrado, Instituto Agrônomo, Campinas, 2003.

SOUZA J. R.; PERECIN, D.; AZANIA, C. A. M.; SCHIAVETTO, A. R.; PIZZO, I. V.; CANDIDO, L. S. Tolerância de cultivares de cana-de-açúcar a herbicidas aplicados em pós-mergência. **Bragantia**, v.68, p.941-951, 2009.

SOUZA, M. L. Utilização de microrganismos na agricultura. **Biotecnologia**, Piracicaba, n. 21, p. 28-31, 2001

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre-RS: Artmed, 2017. 888 p.

TROMBETA, N. D. C.; CAIXETA FILHO, J. V. Potencial e Disponibilidade de Biomassa de Cana-de-açúcar na Região Centro-Sul do Brasil: indicadores agroindustriais. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 55, n. 3, p. 479-496, 2017.

VANDAMME P.; GORIS J.; CHEN W.-M.; DE VOS P.; WILLEMS A. *Burkholderiatuberum* sp. nov. and *Burkholderiaphymatum* sp. nov., nodulatethe roots of tropical legumes. **SystApplMicrobiol**, 25:507–512, 2002;

VARGAS, L.; SANTA BRIGIDA, A.B.; MOTA FILHO, J.P.; DE CARVALHO, T.G.; ROJAS, C.A.; VANEECHOUTTE, D.; VAN BEL, M.; FARRINELLI, L.; FERREIRA, P.C.G.; VANDEPOELE, K.; HEMERLY, A. S. Drought tolerance conferred to sugarcane by association with *Gluconacetobacterdiazotrophicus*: a transcriptomic view of hormone pathways. **PLoS One**, v. 9, n. 12, 2014.

VASCONCELOS, A. C. P. D.; SIQUEIRA, T. P.; LANA, R. M. Q.; FARIA, M. V. D.; NUNES, A. A.; LANA, Â. M. Q. Seed inoculation with *Azospirillumbrasilense* and N fertilization of corn in the Cerrado biome. **Revista Ceres**, v. 63, n. 5, p. 732-740, 2016.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. **Plant Science**, v.151, p. 59-66, 2000.

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

VIANNA, M. S.; SENTELHAS, P. C. Simulação do risco de déficit hídrico em regiões de expansão do cultivo de cana-de-açúcar no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.49, p.237-246, 2014.

VIDAL, M. C.; SALDANHA, R.; VERISSIMO, M. A. A. **Bioinsumos: o programa nacional e a sua relação com a produção sustentável**. CDD 630.275, p. 382, 2020.

VIDEIRA, S. S.; ARAÚJO, J. L. S.; BALDANI, V. L. D. **Metodologia para Isolamento e Posicionamento Taxonômico de Bactérias Diazotróficas Oriundas de Plantas Não-Leguminosas**. Embrapa Documentos 234. Brasília DF . 2007.

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 Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, n. 8, p. 1244 -1251,1997.

YANG, J.; KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, USA, v.14, n.1, p. 1-4, 2009.

YANG, X. Tolerance of photosynthesis hybridization line and its parents grown under field conditions. **Plant Science**, v.171, p.389-397, 2006.

YUWONO, T.; HANDAYANI, D.; SOEDARSONO, J. The role of osmotolerant rhizobacteria in rice growth under different drought conditions. **Australian Journal of Agricultural Research** v.56, p.715-72, 2005.

ZEFFA, D. M.; PERINI, L. J.; SILVA, M. B.; DE SOUSA, N. V.; SCAPIM, C. A.; OLIVEIRA, A. L. M. D.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; AZEREDO GONCALVES, L. S. *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. **PLoS One**, v. 14, n. 4, p. e0215332, 2019.

ZHOU, D.; WANG, C.; LI, Z.; CHEN, Y.; GAO, S.; GUO, J.; LU, W.; SU, Y.; XU, L.; QUE, Y. Detection of bar transgenic sugarcane with a rapid and visual loop-mediated isothermal amplification assay. **Frontiers in Plant Science** v. 7 p. 279, 2016.

## **ANEXOS**

**ANEXO A-** Resumo da análise de variância para características biométricas e fisiológicas avaliadas em três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes, 30 dias após a inoculação.

FV <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	Quadrado Médio						
		CP	ALT	DC	NFV	CLF		
Bloco	3	2,95	0,49	0,22	0,07			1,41
Genótipo (G)	2	266,23 **	20,14 **	0,75 **	0,91 **			17,47 **
Inoculante (I)	3	127,35 **	6,94 **	0,60 **	0,09 ns			21,32 **
G X I	6	68,71 **	4,56 **	0,51 **	0,03 ns			8,75 **
Resíduo	33	9,60	0,53	0,05	0,04			1,91
Total	47							
<b>Média</b>		67,27	13,92	8,02	4,63			38,74
<b>CV<sup>3</sup>(%)</b>		4,61	5,23	2,90	4,53			3,57

<sup>1</sup>FV: Fonte de variação; <sup>2</sup>GL: Grau de liberdade; <sup>3</sup>CV: Coeficiente de variação; \*\*, \*: significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste F; ns: não significativo. CP (comprimento de planta); ALT (altura de planta); DC (diâmetro do colo); NFV (número de folhas verdes); CLF (índice de clorofila).

**ANEXO B-** Resumo da análise de variância para características biométricas e fisiológicas avaliadas em três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes e regimes hídricos, aos 60 dias após inoculação.

FV <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	Quadrado Médio						
		CP	ALT	AF	DC	NFV	CLF	
Bloco	3	150,03	11,55	16383,84	0,69	0,09		6,15
Genótipo (G)	2	378,88 **	28,43 **	574754,68 **	0,96 *	4,26 **		33,92 **
Inoculante (I)	4	213,40 **	14,44 **	118803,49 **	0,95 *	0,43 *		4,74 *
G X I	8	95,49 **	5,00 **	50990,60 *	0,85 **	0,23 ns		10,49 **
Resíduo	42	19,03	1,64	17267,46	0,27	0,15		1,77
Total	59							
<b>Média</b>		125,30	30,94	1389,92	14,03	8,24		43,42
<b>CV<sup>3</sup>(%)</b>		3,48	4,14	9,45	3,73	4,77		3,06

<sup>1</sup>FV: Fonte de variação; <sup>2</sup>GL: Grau de liberdade; <sup>3</sup>CV: Coeficiente de variação; \*\*, \*: significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste F; ns: não significativo CP (comprimento de planta); ALT (altura de planta); DC (diâmetro do colo); NFV (número de folhas verdes); CLF (índice de clorofila).

**ANEXO C-** Resumo da análise de variância para características biométricas e fisiológicas avaliadas em três genótipos de cana-de-açúcar sob efeito de diferentes inoculantes e regimes hídricos, aos 90 dias após a inoculação

FV <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	Quadrado Médio						
		CP	ALT	AF	DC	NFV	CLF	
Bloco	3	193,96	81,14	24804,04	2,42	0,43		2,39
Genótipo (G)	2	365,85 **	204,04 **	173374,84 **	5,53 **	6,25 **		14,51 **
Inoculante (I)	4	172,44 **	65,68 **	63789,56 **	1,95 *	0,16 **		2,79 *
G X I	8	73,52 *	28,75 **	39987,49 **	1,25 ns	0,20 **		2,20 *
Resíduo	42	26,65	4,22	9016,51	0,64	0,04		0,86
Total	59							
<b>Média</b>		177,63	54,41	1328,17	18,40	6,59		33,02
<b>CV<sup>3</sup>(%)</b>		2,91	3,78	7,15	4,37	3,09		2,81

<sup>1</sup>FV: Fonte de variação; <sup>2</sup>GL: Grau de liberdade; <sup>3</sup>CV: Coeficiente de variação; \*\*, \*: significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste F; ns: não significativo. CP (comprimento de planta); ALT (altura de planta); DC (diâmetro do colo); NFV (número de folhas verdes); CLF (índice de clorofila).