

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



Tese

**Potencial da mistura de cinco bactérias diazotróficas no desenvolvimento e
produção de cana-de-açúcar**

Ester Schiavon Matoso

Pelotas, 2020

ESTER SCHIAVON MATOSO

Potencial da mistura de cinco bactérias diazotróficas no desenvolvimento e produção de cana-de-açúcar

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Dr. Sergio Delmar dos Anjos e Silva

Coorientadoras: Prof^a. Dr^a. Tânia Beatriz Gamboa Araújo Morselli
Dr^a. Veronica Massena Reis

Pelotas, 2020

ESTER SCHIAVON MATOSO

Engenheira Agrônoma

Potencial da mistura de cinco bactérias diazotróficas no desenvolvimento e produção de cana-de-açúcar

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

Data da defesa: 18 de agosto de 2020

Banca examinadora:

Dr. Sergio Delmar dos Anjos e Silva (Orientador)

Doutor em Fitotecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Sandro José Giacomini

Doutor em Ciência do solo pela Universidade Federal de Santa Maria

Dra. Maria Natália Guindalini Melloni

Doutora em Agronomia pela Universidade Estadual Paulista

Dr. Cesar Bauer Gomes

Doctor Science em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. Edgar Ricardo Schoffel

Doutor em Agronomia pela Universidade Estadual Paulista

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M425p Matoso, Ester Schiavon

Potencial da mistura de cinco bactérias diazotróficas no desenvolvimento e produção de cana-de-açúcar / Ester Schiavon Matoso ; Sergio Delmar dos Anjos e Silva, orientador ; Tânia Beatriz Gamboa Araújo Morselli, Veronica Massena Reis, coorientadoras. — Pelotas, 2020.
179 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Cana-de-açúcar - Crescimento - Produtividade. 2. Bactérias fixadoras de nitrogênio. 3. Déficit hídrico. 4. Composição químico-bromatológica. I. Silva, Sergio Delmar dos Anjos e, orient. II. Morselli, Tânia Beatriz Gamboa Araújo, coorient. III. Reis, Veronica Massena, coorient. IV. Título.

CDD : 633.61

Você não deve viver a vida como outras pessoas esperam que você viva; tem que ser sua escolha, pois quando estiver lutando, você estará sozinho.

(Lewis Carroll em: Alice no país das maravilhas)

**Dedico este trabalho ao meu filho João Pedro,
que é a razão da minha vida.**

Agradecimentos

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

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

À Pesquisadora Dra. Veronica Massena Reis, pela coorientação, envio de materiais e auxílio em todos os momentos, principalmente na escrita dos artigos.

Ao Pesquisador Giovani Greigh de Brito por todo auxílio na área de fisiologia vegetal.

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

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

À Embrapa Agrobiologia, pela disponibilidade de materiais.

À Universidade Federal de Santa Maria pela realização de análises laboratoriais.

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

À CAPES, pela bolsa concedida.

Aos componentes da banca examinadora, por terem aceitado gentilmente o meu convite.

Aos colegas do grupo Agroenergia, por toda ajuda na condução dos experimentos.

Aos funcionários da Embrapa, Luis Fernando Timm, Valnei Rodrigues, Candida Montero e Janni Harter, por todo apoio durante a execução dos experimentos.

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

Aos meus familiares e todos meus amigos.

Muito obrigada!

Resumo

MATOSO, Ester Schiavon. **Potencial da mistura de cinco bactérias diazotróficas no desenvolvimento e produção de cana-de-açúcar.** 2020. 169 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

Acredita-se que a aplicação de bactérias diazotróficas pode auxiliar no desenvolvimento da cana-de-açúcar, resultando no aumento da produtividade, além de colaborar com a tolerância da cultura ao déficit hídrico e melhorar sua composição químico-bromatológica. Diante disso, este trabalho teve como objetivo estudar a influencia de uma mistura de cinco espécies de bactérias diazotróficas no desenvolvimento e na produção de variedades de cana-de-açúcar. Para isso, quatro experimentos foram realizados com o objetivo específico de: experimento 1 - conhecer a influência da aplicação da mistura de bactérias diazotróficas e do uso de diferentes variedades sobre o crescimento e produtividade; experimento 2 - estudar duas variedades que se destacaram no primeiro experimento, juntamente com novos três materiais de cana-de-açúcar, a fim de conhecer os efeitos da adição da mistura sobre o crescimento dessas variedades e utilização delas nos demais experimentos; experimento 3 - avaliar a influencia da mistura de bactérias na redução dos efeitos do déficit hídrico; experimento 4 - testar a hipótese de que a mistura pode ter efeito na produção, maturação e também, na qualidade das plantas, melhorando suas características para uso na alimentação animal. Os experimentos foram realizados a campo e em casa de vegetação, no 9º distrito da cidade de Pelotas, localizada no Rio Grande do Sul, Brasil. Os resultados obtidos indicam que a aplicação da mistura em plantas de cana-de-açúcar promove aumentos significativos em características importantes, como altura de planta, diâmetro de colmo, conteúdo de nitrogênio, sólidos solúveis totais, antecipando a maturação, produtividade e incremento de massa seca. Além disso, proporciona aumento da assimilação líquida de carbono, do conteúdo de clorofila e do potencial osmótico. Também mantém a condutância estomática e o conteúdo relativo de água nas folhas, diminui a transpiração líquida das plantas em situação de déficit hídrico e influencia positivamente os parâmetros da fluorescência da clorofila, aumentando a eficiência quântica máxima do FSII, o rendimento quântico fotoquímico efetivo do FSII a dissipação fotoquímica e a taxa de transporte de elétrons, o que colabora com a redução dos efeitos do déficit hídrico. O uso da mistura pode ainda melhorar a composição químico-bromatológica das plantas para uso na alimentação animal, diminuindo a quantidade de lignina, celulose e fibras em detergente neutro e ácido.

Palavras-chave: *Saccharum* sp.; inoculante; bactérias fixadoras de nitrogênio; déficit hídrico; composição químico-bromatológica

Abstract

MATOSO, Ester Schiavon. **Potential of mixing five diazotrophic bacteria in the development and production of sugarcane.** 2020. 169 f. Thesis (Doctoral) - Graduate Program in Agricultural Production Systems Family. Federal University of Pelotas, Pelotas, RS.

It is believed that the application of diazotrophic bacteria can assist in the development of sugarcane resulting in increased productivity, in addition to contributing to the crop's tolerance to water deficit and improving its chemical-bromatological composition. Therefore, this work aimed to study the influence of a mixture of five species of diazotrophic bacteria on the development and production of sugarcane varieties. For this, four experiments were carried out with the specific objective of experiment: 1 - knowing the influence of the application of the mixture of diazotrophic bacteria and the use of different varieties on growth and productivity; experiment 2 - studying two varieties that stood out in the first experiment, together with three new sugarcane materials, in order to know the effects of adding the mixture on the growth of these varieties and their use in other experiments; experiment 3 - evaluate the influence of the mixture of bacteria in reducing the effects of water deficit; experiment 4 - test the hypothesis that the mixture may have an effect on production, maturation and also on the quality of plants, improving their characteristics for use in animal feed. The experiments were carried out in the field and in a greenhouse, in the 9th district of the city of Pelotas, located in Rio Grande do Sul, Brazil. The results obtained indicate that the application of the mixture in sugarcane plants promotes significant increases in important characteristics, such as plant height, stem diameter, nitrogen content, total soluble solids, anticipating maturation, productivity and mass increase dry. In addition, it provides an increase in net carbon assimilation, chlorophyll content and osmotic potential. Maintains stomatal conductance and relative water content in leaves, decreases the liquid transpiration of plants in situations of water deficit and positively influences chlorophyll fluorescence parameters, increasing the maximum quantum efficiency of FSII, the effective photochemical quantum yield of FSII a photochemical dissipation and electron transport rate, which contributes to reducing the effects of water deficit. It can also improve the chemical-chemical composition of plants for use in animal feed, decreasing the amount of lignin, cellulose and fiber in neuter and acid detergent.

Keywords: *Saccharum* sp.; inoculant; nitrogen-fixing bacteria; water deficit; chemical-bromatological composition

Lista de Figuras

- Figura 1.** Experimento de genótipos de cana-de-açúcar com e sem inoculação de bactérias endofíticas diazotróficas no cultivo de cana-soca, no Monte Bonito, interior de Pelotas, RS.....41
- Figura 2.** A) ClorofiLOG, da marca FALKER, modelo CFL 1030; B) medidas para cálculo da área foliar e posterior Índice de área foliar (IAF).....43
- Figura 3.** Etapas da produção de mudas de cana-de-açúcar a partir de minitoletes: (A) inoculação em solução turfosa; (B e C) brotação em câmara de crescimento; (D) crescimento em casa de vegetação com condições de temperatura e umidade controladas.....45
- Figura 4.** Momento da instalação do experimento de tolerância ao déficit hídrico em mudas de cana-de-açúcar inoculadas ou não com bactérias endofíticas diazotróficas.....47
- Figura 5.** Escala visual de notas para tolerância ao déficit hídrico em plântulas de cana-de-açúcar: 1 - Altamente tolerante; 2 - Tolerante; 3 - Medianamente tolerante; 4 - Sensível; 5 - Altamente sensível.....48
- Figura 6.** Avaliação de crescimento e sobrevivência de mudas após estresse hídrico.....49
- Figura 7.** Visão geral do experimento desenvolvido em telado50
- Figura 8.** Avaliações com auxílio do IRGA em plantas adultas de cana-de-açúcar das variedades RB867515 e RB966928, com e sem aplicação de bactérias diazotróficas51
- Figura 9.** A) Mudanças de cana-de-açúcar logo após o transplante para os sacos plásticos; B) Plantas de cana-de-açúcar 15 dias após o transplante..52
- Figura 10.** Instalação do experimento em parcelas subdivididas em função das condições de irrigação.....53
- Figura 11.** Encharcamento dos recipientes para dar início ao experimento de estresse hídrico.....53
- Figura 12.** A) Medida do conteúdo relativo de água no substrato com auxílio de um sensor higrômetro com arduino. B) Pesagem dos conjuntos recipiente+planta.....54
- Figura 13.** Avaliações fisiológicas em plantas de cana-de-açúcar com o auxílio de analisador portátil de gases a infravermelho (IRGA).....55

Figura 14.	A) Fluorômetro de bancada (modelo PAM-2500); B) Discos de 1 cm alocados em placa de petri para avaliações no fluorômetro da clorofila.....	56
Figura 15.	A) Análise do conteúdo relativo de água (CRA) nos tratamentos; B) osmômetro de pressão de vapor (modelo Vapro® 5600).....	57
Figura 16.	Transplante de mudas de cana-de-açúcar na área experimental da Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS	58
Figura 17.	A) Análise de sólidos solúveis totais (°Brix); B) Avaliação do peso de duas touceiras para fins de produtividade, em balança digital.....	60
Figura 18.	A) Triturador de galhos e resíduos orgânicos, modelo TR 200; B) moinho de facas.....	61
Figura 19.	A) Determinação da massa seca e B) Determinação do conteúdo de cinzas em mufla a 550°C.....	61
Figura 20.	Determinação de extrativos em aparelhagem de extração por Soxhlet. Laboratório de propriedades da madeira, Universidade Federal de Pelotas, 2019.....	62
Figura 21.	Determinação de lignina insolúvel. Laboratório de propriedades da madeira, Universidade Federal de Pelotas, 2020.....	63
Figura 22.	Determinação de celulose. Laboratório de propriedades da madeira, Universidade Federal de Pelotas, 2020.....	64

Sumário

1. Introdução Geral.....	13
2. Projeto de Pesquisa.....	15
3. Relatório do Trabalho de Campo.....	40
4. Artigo 1 - Aplicação de uma mistura de cinco diazotróficos no cultivo de cana-de-açúcar no sul do Brasil	74
4.1. Resumo.....	74
4.2. Abstract.....	74
4.3. Introdução	75
4.4. Resultados	79
4.5. Discussão	84
4.6. Conclusão	86
4.7. Agradecimentos	87
4.8. Referências.....	87
5. Artigo 2 - Influência do uso de um mix de bactérias diazotróficas na biometria e no conteúdo de clorofila de plantas de cana-de-açúcar	93
5.1. Resumo	94
5.2. Abstract.....	94
5.3. Introdução	95
5.4. Material e Métodos.....	96
5.5. Resultados e Discussão.....	98
5.6. Conclusões	101
5.7. Agradecimentos	101
5.8. Referências.....	102
6. Artigo 3 - Mitigação dos impactos do déficit hídrico na cana-de-açúcar pelo uso de bactérias diazotróficas	108
6.1. Resumo.....	103
6.2. Abstract.....	104
6.3. Introdução	105
6.4. Material e Métodos.....	107
6.5. Resultados	112
6.6. Discussão	122
6.7. Conclusão	126
6.8. Referências.....	126

7. Artigo 4 - Produção, maturação e composição químico-bromatológica de variedades de cana-de-açúcar em função da aplicação de bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada.....	138
7.1. Resumo.....	133
7.2. Abstract.....	134
7.3. Lista de abreviações	135
7.4. Introdução	136
7.5. Material e Métodos.....	137
7.6. Resultados e Discussão.....	140
7.7. Conclusão	146
7.8. Literatura citada	147
8. Considerações finais	160
Referências	161

1. Introdução Geral

Um dos maiores desafios para a liberação e comercialização de inoculantes biológicos para gramíneas é a ausência de nódulos visíveis nas plantas inoculadas. E a única forma que se tem de conseguir êxito para este desafio é comprovando a contribuição dos microrganismos na melhoria dos cultivos. Bactérias diazotróficas podem auxiliar no desenvolvimento vegetal, principalmente através da fixação biológica de nitrogênio, também promover o crescimento radicular (SCHULTZ et al., 2014; CHAVES et al., 2015) e melhorar a absorção de nutrientes, (BARRETTI et al., 2008), resultando na promoção de crescimento e produtividade. Além disso, a presença destes microrganismos pode levar à produção de substâncias osmorreguladoras pela planta e assim atuar de forma sinérgica, colaborando na tolerância à seca (DIMKPA et al. 2009).

Os cultivos agrícolas são extremamente influenciados pelos elementos climáticos, sendo o déficit hídrico considerado o principal estresse ambiental enfrentado pela agricultura mundial, pois dificulta a produção de alimentos em diversos países (RAMPINO et al., 2006). Entender como as plantas respondem ao déficit hídrico é importante para traçar estratégias e evitar prejuízos na agricultura. A falta de água causa uma série de alterações morfo-fisiológicas como: diminuição da área foliar, do turgor celular, do conteúdo relativo de água (CRA), do potencial hídrico foliar, altera a absorção de nutrientes, além de causar grandes alterações no metabolismo do nitrogênio e do carbono (FAROOQ et al., 2009). Uma das primeiras respostas das plantas à seca é o fechamento estomático (CHAVES, 1991), causando uma limitação de substrato para a fotossíntese. A diminuição de CO₂ acarreta menor assimilação de carbono, mas este não é o único fator limitante, já que pode ocorrer também alteração metabólica do processo fotossintético (LAWLOR, 2002).

Dentre as gramíneas cultivadas no Brasil, a cana-de-açúcar se destaca pela sua importância econômica para o país, que é o maior produtor. Ela serve de matéria-prima para a produção de açúcar e etanol, o que a torna peça chave para o setor de biocombustíveis. O etanol é considerado um combustível limpo por ser obtido de uma fonte renovável e que tem como benefício, o próprio desenvolvimento econômico e, por isso, é ecologicamente correto e sustentável (LEITE, 2007).

Além disso, a cana-de-açúcar pode servir de matéria prima para a fabricação de produtos agroindustriais e artesanais como rapadura, melado, açúcar mascavo e aguardente. Seus resíduos também tem grande importância econômica, pois a vinhaça pode ser utilizada como fertilizante e o bagaço queimado, para geração de energia. (COUTO, 2013). E ainda, pode ser empregada na alimentação animal, de forma in natura ou ensilada, pois tem um alto rendimento de matéria seca e valor nutritivo adequado na maturação. No entanto, a cana apresenta desafios na produção de silagem devido ao alto teor de carboidratos solúveis e leveduras (ÁVILA et al., 2010), que convertem parte dos açúcares em altos níveis de compostos orgânicos voláteis, principalmente etanol, o que resulta em grandes perdas de matéria seca (DANIEL et al., 2013) e há recomendação para que a cultura não seja indicada como alimento para animais de bom potencial genético, pois apresenta baixo teor proteico e de minerais e fibra de baixa qualidade (SIQUEIRA et al., 2012).

Contudo, acredita-se que a aplicação de bactérias diazotróficas podem proporcionar mudanças na histologia dos tecidos vegetais, como a deposição das células do mesofilo, parênquima e esclerênquima, que têm diferentes paredes celulares e concentrações do conteúdo celular. Alterações anatômicas morfológicas e histológicas afetam o teor de proteína bruta, os carboidratos estruturais e solúveis, energia e outros nutrientes que são essenciais para a nutrição animal e para a produção de etanol de segunda geração (SKONIESKI et al., 2017).

Dentro deste contexto, este trabalho foi formalizado em quatro artigos científicos. Com o primeiro artigo, buscou-se conhecer a influência da aplicação de uma mistura de bactérias diazotróficas e o efeito do uso de diferentes variedades sobre o crescimento e produtividade de plantas de cana-de-açúcar. No segundo artigo, foram estudadas duas variedades que se destacaram no primeiro experimento, juntamente com novos três materiais de cana-de-açúcar, a fim de conhecer os efeitos da adição da mistura sobre o crescimento dessas variedades, para utilização delas nos demais experimentos. No terceiro artigo, objetivou-se avaliar a influencia da mistura de bactérias diazotróficas na redução dos efeitos do déficit hídrico em plantas de cana-de-açúcar. E no quarto artigo, testou-se a hipótese de que a mistura pode ter efeito na produção, maturação e qualidade da cana-de-açúcar, melhorando suas características para uso na alimentação animal.

2. Projeto de pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO AGRÍCOLA
FAMILIAR



Projeto de Tese: Desenvolvimento de cana-de-açúcar com a inoculação de bactérias endofíticas diazotróficas

Doutoranda: Ester Schiavon Matoso
Orientador: Pesq. Dr. Sérgio Delmar dos Anjos e Silva
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Tânia Beatriz Gamboa Araújo Morselli
Co-orientadora: Pesq.^a Dr.^a Veronica Massena Reis

Pelotas, dezembro de 2018

PROJETO DE TESE

UNIDADE: Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel - FAEM	DEPARTAMENTO: Fitotecnia														
PROGRAMA: Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar															
LINHA DE PESQUISA: (x) Agricultura e Ambiente () Agricultura e Desenvolvimento Rural Sustentável () Agricultura e Engenharia Rural															
TÍTULO DO PROJETO: Desenvolvimento de cana-de-açúcar com a inoculação de bactérias endofíticas diazotróficas															
PRAZOS DE EXECUÇÃO: Início: março/2017 Término: março/2020															
EQUIPE TÉCNICA: Aluna: Ester Schiavon Matoso Orientador: Sérgio Delmar dos Anjos e Silva Co-orientadora: Tânia Beatriz Gamboa Araújo Morselli Co-orientadora: Veronica Massena Reis															
OBJETIVO: Avaliar a contribuição de bactérias diazotróficas no desenvolvimento e qualidade de genótipos de cana-de-açúcar.															
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2">RECURSOS FINANCEIROS NECESSÁRIOS (R\$)</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Material de consumo.....</td> <td style="text-align: right;">5.100,00</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Outros serviços.....</td> <td style="text-align: right;">16.600,00</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Equipamento e material permanente.....</td> <td style="text-align: right;">11.315,00</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Sub-total.....</td> <td style="text-align: right;">33.015,00</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Imprevistos (10%).....</td> <td style="text-align: right;">3.300,00</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">TOTAL.....</td> <td style="text-align: right;">36.315,00</td> </tr> </table>		RECURSOS FINANCEIROS NECESSÁRIOS (R\$)		Material de consumo.....	5.100,00	Outros serviços.....	16.600,00	Equipamento e material permanente.....	11.315,00	Sub-total.....	33.015,00	Imprevistos (10%).....	3.300,00	TOTAL.....	36.315,00
RECURSOS FINANCEIROS NECESSÁRIOS (R\$)															
Material de consumo.....	5.100,00														
Outros serviços.....	16.600,00														
Equipamento e material permanente.....	11.315,00														
Sub-total.....	33.015,00														
Imprevistos (10%).....	3.300,00														
TOTAL.....	36.315,00														
ASSINATURAS/DATA															
ALUNA: _____	___/___/___														
ORIENTADOR: _____	___/___/___														
CO-ORIENTADORA: _____	___/___/___														
CO-ORIENTADORA: _____	___/___/___														
COORDENADOR DO PROGRAMA: _____	___/___/___														

1. Introdução

A cultura da cana-de-açúcar é produzida principalmente no Brasil sendo, portanto, de grande importância para o agronegócio do país. Além disso, é matéria-prima para a produção de etanol, o que a torna peça chave para o setor de biocombustíveis. O etanol é um combustível que emite menos gases poluentes ao ser queimado, é obtido de uma fonte renovável e, por isso, considerado ecologicamente correto (CONAB, 2017).

A área cultivada com cana-de-açúcar no Rio Grande do Sul é pequena, quando comparada à região de São Paulo, que é a principal produtora (IBGE, 2014). Sendo que, toda cana produzida no estado está vinculada à agricultura familiar, devido principalmente à característica econômica, histórica e sociocultural, aliadas a diferenciação mesoclimática, tipo de relevo, destino da produção e ao processo de colonização (SOARES, 2008). O zoneamento agroclimático da cana-de-açúcar apresenta cerca de 1,5 milhões de hectares com aptidão ao cultivo no RS, considerando 182 municípios aptos para o cultivo para a produção de etanol e açúcar e 216 municípios com potencial de cultivar cana-de-açúcar para outros fins (MANZATTO et al., 2010).

Ela pode servir de matéria prima para a fabricação de produtos agroindustriais e artesanais como rapadura, melado, açúcar mascavo e aguardente. Seus resíduos também tem grande importância econômica, pois a vinhaça pode ser utilizada como fertilizante e o bagaço queimado, para geração de energia. (COUTO, 2013). E ainda, pode ser empregada na alimentação animal, de forma in natura ou ensilada, pois tem um alto rendimento de matéria seca e valor nutritivo adequado na maturação. No entanto, a cana apresenta desafios na produção de silagem devido ao alto teor de carboidratos solúveis e leveduras (ÁVILA et al., 2010), que convertem parte dos açúcares em altos níveis de compostos orgânicos voláteis, principalmente etanol, o que resulta em grandes perdas de matéria seca (DANIEL et al., 2013).

Os elementos climáticos têm influência direta nos cultivos agrícolas, sendo o déficit hídrico considerado o principal estresse ambiental enfrentado pela agricultura mundial, pois dificulta a produção de alimentos em diversos países (RAMPINO et al., 2006). Na região sul do Brasil as estações do ano são bem definidas, tendo ocorrência de geadas no inverno e estiagem no verão. Neste sentido, o período de máximo crescimento vegetativo e maior demanda hídrica da cana-de-açúcar

coincide com a falta de água, afetando o crescimento da cultura e reduzindo a produtividade final (GROSS; CASSOL, 2015).

Entender como as plantas respondem ao déficit hídrico é importante para traçar estratégias e evitar prejuízos. A falta de água causa uma série de alterações morfo-fisiológicas como: diminuição da área foliar, do turgor celular, do conteúdo relativo de água (CRA), do potencial hídrico foliar, a absorção de nutrientes é alterada, além de grandes alterações no metabolismo do nitrogênio e do carbono (FAROOQ et al., 2009). Uma das primeiras respostas das plantas à seca é o fechamento estomático (CHAVES, 1991), causando uma limitação de substrato para a fotossíntese. A diminuição de CO₂ acarreta menor assimilação de carbono, mas este não é o único fator limitante, já que pode ocorrer também alteração metabólica do processo fotossintético (LAWLOR, 2002). Em cana-de-açúcar, essas alterações metabólicas na fotossíntese parecem acontecer a partir de um potencial hídrico foliar de -0,37 MPa (DU et al., 1996).

Bactérias diazotróficas podem auxiliar no desenvolvimento vegetal, promover o crescimento radicular (SCHULTZ et al., 2014; CHAVES et al., 2015) e melhorar a absorção de nutrientes (BARRETTI et al., 2008), resultando na promoção de crescimento, que pode beneficiar plantas sob restrição hídrica. A presença destes microrganismos pode também levar à produção de substâncias osmorreguladoras pela planta e assim atuar de forma sinérgica, colaborando na tolerância à seca (DIMKPA et al. 2009). Além disto, podem proporcionar mudanças na histologia dos tecidos vegetais, como a deposição das células do mesofilo, parênquima e esclerênquima, que têm diferentes paredes celulares e concentrações do conteúdo celular. Alterações anatômicas morfológicas e histológicas afetam o teor de proteína bruta, os carboidratos estruturais e solúveis, energia e outros nutrientes que são essenciais para a nutrição animal (SKONIESKI et al., 2017).

Baseado neste contexto, este trabalho considera as hipóteses que a inoculação de bactérias endofíticas diazotróficas em plantas de cana-de-açúcar pode desencadear mudanças fisiológicas de tolerância ao déficit hídrico e também, contribuir no crescimento, incremento de produtividade e na qualidade da cana-de-açúcar para uso na alimentação animal e produção de etanol.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a contribuição de bactérias diazotróficas no desenvolvimento e qualidade de genótipos de cana-de-açúcar.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o desempenho agrônomo dos genótipos RB867515, RB92579, RB966928 e RB975932 inoculados com bactérias diazotróficas;
- ✓ Avaliar a influência de bactérias diazotróficas na tolerância ao déficit hídrico em plantas de cana-de-açúcar;
- ✓ Avaliar as características agrônomicas e químico-bromatológicas dos genótipos RB867515, RB966928, RB106814, RB106818 e RB106819 inoculados com bactérias diazotróficas, visando às condições desejáveis para uso na alimentação animal e produção de etanol;

3. Revisão bibliográfica

3.1. A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta originária da Nova Guiné que foi introduzida no Brasil no século XVI. Os materiais cultivados no país são híbridos multiespecíficos de *Saccharum officinarum* L. e *Saccharum spontaneum* L. (D'HONT et al., 1996), que recebe a designação de *Saccharum* spp. A estes híbridos atribuem-se nomes compostos de siglas da instituição que efetuou o cruzamento, o ano em que o mesmo foi realizado e o número sequencial das seleções. Como por exemplo, RB867515, temos: “RB” República Brasil, ano do cruzamento 1986, efetuado na Universidade Federal de Viçosa (7), que originou o clone 515 (VERISSIMO, 2012).

No presente trabalho foram utilizadas três variedades que estão entre as mais cultivadas pelos produtores brasileiros, sendo elas: RB867515 (25,8% da área total cultivada), RB92579 (9,3%) e RB966928 (8,2%) (RIDESA 2010) e outras quatro variedades que apresentam aptidão para o cultivo no estado do Rio Grande do Sul, mas que ainda não são comercializadas: RB975932, RB106814, RB106818 e RB106819 (ANTUNES, 2018; LEMÕES 2018).

A RB867515 e a RB92579 são variedades de maturação médio-tardia que apresentam produtividade e teor de sacarose elevados, teor de fibra médio e resistência à ferrugem marrom. Já a RB966928 atinge elevadas produtividades, mas tem maturação precoce, teores de sacarose e fibra médios e é tolerante à ferrugem marrom, carvão, escaldadura e mosaico (RIDESA, 2010).

Em relação aos materiais ainda não comercializados, a RB975932 é uma variedade de maturação precoce, que apresenta produtividade e teor de fibra altos e boa resistência à ferrugem e mancha parda (MORAIS et al., 2012; SMANIOTTO, et al., 2012). E os clones de cana energia, RB106814, RB106818 e RB106819 são altamente produtivos, apresentam valores de produtividade acima de 100 toneladas de colmo por hectare, teor de sólidos solúveis em torno de 19 °Brix na colheita e um alto rendimento de etanol (LEMÕES, 2018), no entanto, ainda não foram caracterizados quanto à resistência a doenças.

A área mundial ocupada com cana-de-açúcar chega a 26,7 milhões de hectares, de 130 países, o que alcança uma produção de 1,8 bilhões de toneladas (FAOSTAT, 2016). No Brasil mais 8,73 milhões de ha são cultivados, o que

evidencia a grande importância econômica desta cultura para o país, com grande contribuição na matriz energética nacional e em exportações de produtos desta cadeia produtiva (CONAB, 2018).

A cana-de-açúcar é uma planta de metabolismo C4, que possui alta eficiência no uso da radiação (ROBERTSON et al., 1996), alcança altas taxas fotossintéticas e grande produção de biomassa e acúmulo de carboidratos (WELBAUM; MEINZER, 1990). Como a sacarose, que é um tipo de glicídio formado por uma molécula de frutose e outra de glicose, produzida pela planta ao realizar o processo de fotossíntese, e que se encontra em abundância na cana-de-açúcar (SINGELS et al., 2005).

O que destaca este grupo de plantas é o sistema de concentração de CO₂ nas folhas, que consiste em modificações bioquímicas e estruturais que garantem um melhor desempenho fotossintético (GHANNOUM, 2009). Além disto, outra característica inerente às plantas C4 é que a fotossíntese é mais competitiva em situações que poderiam favorecer perda de carbono pela fotorrespiração tais como altas temperaturas ou diminuição da disponibilidade de água (LOPES et al., 2011). No entanto, um fator que pode limitar a fotossíntese na cana-de-açúcar é a falta de nitrogênio, pois nestas situações, a planta sofre uma diminuição da assimilação do CO₂.

Entre os nutrientes responsáveis pela nutrição da cana-de-açúcar, o nitrogênio é o elemento absorvido em maior quantidade, basicamente nas formas minerais NO₃⁻ e NH₄⁺, sendo a maior parte absorvido através do fluxo de massas (99%) e apenas 1% pela interceptação radicular (PRADO et al., 2005; MALAVOLTA, 2006). Embora o N constitua aproximadamente apenas 1% da matéria seca da cana-de-açúcar, suas funções são fundamentais no desenvolvimento da planta. Em condições de deficiência do nutriente, ocorre clorose nas folhas mais velhas e a diminuição da atividade meristemática da parte aérea, o que resulta na diminuição do perfilhamento, da área foliar, longevidade das folhas, qualidade do caldo e aumento do teor de fibra.

Além disto, a importância da cana-de-açúcar está na sua ampla utilidade, pois é matéria prima para produção de açúcar refinado, álcool, produtos agroindustriais e artesanais como rapadura, melaço, melado, açúcar mascavo e aguardente, além de ser empregada na alimentação animal. E seus resíduos podem ser utilizados na

agricultura como fertilizante ou para geração de energia e produção de etanol de segunda geração (COUTO, 2013).

3.2. Produção de açúcar e etanol

Inicialmente o cultivo da cana-de-açúcar no Brasil visava principalmente à fabricação de açúcar, sendo a principal fonte econômica oriunda da agricultura e a mais longa das bases econômicas de nossa história (BRANDÃO, 1985). Atualmente quase 50% da cana-de-açúcar produzida são destinados à produção de açúcar, que no ano de 2017 atingiu aproximadamente 40 milhões de toneladas (CONAB, 2018).

O etanol ou álcool etílico é um hidrocarboneto de forma molecular C_2H_5OH , obtido por via destilatória, sintética ou fermentativa (SOLOMONS; FRYHLE, 2001). A forma mais utilizada para a produção de etanol no mundo é a via fermentativa, sendo que o Brasil domina essa tecnologia. O setor sucroalcooleiro brasileiro é um dos mais competitivos, com bons índices de produtividade, rendimento industrial e com baixos custos de produção. No ano de 2017, produziu mais 27 bilhões de litros, impondo-se como o segundo maior produtor mundial de etanol (CONAB, 2018; PEREIRA et al., 2012).

A sua importância como combustível se deve principalmente por ser produzido a partir de produtos agrícolas renováveis em vez de produtos petrolíferos e emitir menores concentrações de CO_2 em relação à gasolina. O dióxido de carbono emitido no processo de combustão é, aproximadamente, igual à quantidade absorvida pelas plantas utilizadas para produzi-lo (SHREEVE, 2006).

No Brasil, a matéria-prima principal utilizada é a cana-de-açúcar, enquanto nos EUA, maior produtor mundial de etanol, a principal matéria-prima é o milho. A cana-de-açúcar é uma cultura com colheita anual, sendo, em geral, economicamente produtiva por até cinco anos. O caldo da cana é utilizado na produção de etanol por apresentar a sacarose, um tipo de carboidrato não diretamente fermentável. Para acontecer a fermentação é necessário o processo de hidrólise, onde o dissacarídeo é separado em glicose e frutose. A composição da cana-de-açúcar depende da variedade, do estado de maturação, condições climáticas, entre outras. A cana-de-açúcar madura apresenta em média 12,5% sacarose (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Outra forma de se produzir etanol se dá a partir de restos de vegetais que já foram processados pela indústria como, por exemplo, palha de arroz, palha de trigo,

palha de milho e palha e bagaço de cana, que gera o etanol conhecido como de segunda geração. O desenvolvimento do processo de obtenção de etanol, a partir de material lignocelulósico, é importante para o Brasil, devido à matéria-prima ser abundante, renovável e de baixo custo. Além disso, essa tecnologia promissora não estabelece a concorrência entre alimentação e produção de combustíveis (SARKAR et al., 2012).

3.3. Cana-de-açúcar na alimentação animal

A cana-de-açúcar é considerada por muitos autores a opção forrageira de melhor desempenho bioeconômico para ser utilizada na alimentação de bovinos de corte e leite (NUSSIO et al., 2003; RESENDE et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2008), devido ao seu alto potencial produtivo.

A cultura da cana-de-açúcar como forrageira pode ser fornecida para os animais de diferentes formas, sendo que as duas principais são cana fresca triturada (in natura) e na forma de silagem. Quando fornecida in natura, caracteriza-se pelo corte diário das plantas e fornecimento imediato aos animais. Já a silagem caracteriza-se pelo processo de conservação da forragem por meio da fermentação anaeróbica e tem por objetivo preservar o valor nutritivo com a menor perda possível (ANJOS; SILVA; CAMPANA, 2008).

Características como facilidade de cultivo, possibilidade de colheita nos períodos de estiagem e elevado potencial de matéria seca e energia por unidade de área, fazem da cana-de-açúcar um produto de grande interesse para ser utilizado na alimentação animal (FREITAS, 2006). Fabris (2009) destaca também, como características vantajosas da cultura, o custo relativamente baixo de produção e oferta de forragem no período de inverno.

Outra característica que a cultura apresenta como fonte de alimento para os animais é a elevada produtividade de nutrientes digestíveis totais por hectare podendo atingir até 20 toneladas, produtividades bastante superiores quando comparadas a outras culturas tradicionalmente utilizadas, como milho e sorgo (PEDROSO, 2004).

No entanto, a cana tem alguns aspectos negativos para ser utilizada na alimentação animal, pois apresenta baixo teor proteico e de minerais e fibra de baixa qualidade. Diante destes aspectos, a escolha da variedade a ser utilizada na alimentação de ruminantes se torna um fator importante, visto que os diferentes

materiais genéticos apresentam características particulares em relação à composição químico-bromatológica (REIS, 2010).

A cana-de-açúcar considerada como ideal para ser fornecida aos animais é a que possui baixos teores de fibra em detergente neutro (FDN) e detergente ácido (FDA), baixos teores de lignina e celulose, além de baixa relação fibra/açúcar, sendo este um bom parâmetro para avaliar a qualidade do alimento (RODRIGUES et al., 1997).

3.4. Estresse hídrico na cana-de-açúcar

Dentre os estresses ambientais, o déficit hídrico é considerado o principal enfrentado pela agricultura mundial (RAMPINO et al., 2006), e em muitas regiões do mundo é um dos principais fatores que limitam a produção e expansão da cana-de-açúcar, sendo causada por períodos de déficit hídrico prolongado ou por irrigação inadequada (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005).

A cana-de-açúcar é uma cultura que apresenta certa tolerância ao estresse hídrico, porém, responde altamente a irrigação (SINGH; SHUKLA; BHATNAGAR, 2007). No entanto, a ocorrência de eventos atípicos observados nos últimos anos como de falta de chuvas em algumas regiões podem comprometer o cultivo.

A seca como fenômeno meteorológico ocorre quando o balanço hídrico da cultura se torna negativo, ou seja, quando a entrada de água por precipitação ou irrigação é inferior ao potencial de evapotranspiração. O tempo para a insuficiência de suprimento de água causar reduções de crescimento depende do tipo de planta, da capacidade de retenção de água no solo, das condições atmosféricas, principalmente da diferença de pressão de vapor entre a folha e o ar (DPV) e da temperatura e de fatores que controlam a evapotranspiração (PIMENTEL, 2004).

As respostas das plantas à seca são caracterizadas por alterações morfológicas como diminuição da área foliar, reduzida pelo enrolamento das folhas e diminuição do crescimento. Segundo FAROOQ et al. (2009), o estresse hídrico ainda impede a divisão celular, leva à perda de turgor, inibindo o alongamento celular, e há uma série de alterações fisiológicas que impedem o desenvolvimento normal da planta. Estas alterações são: mudanças na razão raiz/parte aérea, nas relações hídricas com diminuição do potencial hídrico (Ψ), no conteúdo relativo de água (CRA) e na absorção de nutrientes; diminuição da fotossíntese, da abertura

estomática, da respiração, dos teores de carboidratos, alterações no metabolismo do nitrogênio e aumento da atividade de enzimas ligadas ao estresse oxidativo, o que afeta diretamente na produtividade da cultura (CHAVES et al., 2002; PIMENTEL, 2004; FAROOQ et al., 2009).

Existem três estádios de resposta à deficiência hídrica. Num primeiro momento não ocorre diminuição da transpiração, apenas ocorre o aumento de ácido abscísico (ABA), também a diminuição da expansão celular e da turgescência, e é conhecido como ligeira deficiência hídrica. Já no segundo estágio, conhecido como deficiência hídrica moderada, a condutância estomática diminui levando à redução das taxas de transpiração, da fotossíntese e da atividade de enzimas ligadas à assimilação fotossintética, que levam ao aumento do teor de carboidratos solúveis e aminoácidos livres. E no terceiro estágio, ocorre a deficiência hídrica severa, onde a transpiração é mínima, há aumento da atividade de enzimas hidrolíticas, diminuição do teor de amido, de proteínas solúveis e clorofila e aumento de espécies reativas de oxigênio (PIMENTEL, 2004).

3.5. Bactérias endofíticas diazotróficas na cana-de-açúcar

Bactérias endofíticas possuem a capacidade de penetrar nas plantas e as colonizar sistematicamente, podendo habitar o apoplasto, vasos condutores e em algumas ocasiões, o meio intracelular (ANDREOTE, 2007). Também podem atuar em processos essenciais para o desenvolvimento vegetal, como por exemplo, auxílio na obtenção de nutrientes e produção de fitormônios promovendo, desta forma, o crescimento vegetal, e por isso, são também conhecidas como “bactérias endofíticas promotoras do crescimento de plantas” (TAULÉ et al. 2012). Além disso, podem atuar na proteção da planta hospedeira contra patógenos, seja por antibiose direta ou pela indução de resistência sistêmica vegetal (OLIVEIRA; ANDRADE, 2010).

A inoculação de bactérias diazotróficas proporciona benefícios à cana-de-açúcar como a fixação biológica de nitrogênio, aumento das raízes, da assimilação de CO₂ e do número de folhas (KLEINGESNDS, 2010). Com a fixação biológica de nitrogênio (FBN), a aplicação de fertilizantes nitrogenados é diminuída, o que consequentemente diminui também os danos de poluição ambiental causados pelo seu uso, além de proporcionar economia na aquisição destes adubos (TRIVELIN; VITTI, 2009).

Atualmente no Brasil, são aplicados, em média, 45 kg ha⁻¹ de N na cana-planta e 80 kg ha⁻¹ nas socas, ao passo que o acúmulo de N total nas folhas verdes e secas e nos colmos pode chegar a 260 kg ha⁻¹ na cana-planta (VITTI et al., 2011) e, em média, a 120 kg ha⁻¹ nas socas (VITTI et al., 2008; BAPTISTA et al., 2014). O acúmulo de N em quantidades expressivamente superiores às doses aplicadas nos canaviais brasileiros provavelmente seja devido à contribuição das bactérias endofíticas diazotróficas com a fixação biológica. Mas para ser confirmado, são necessários estudos com o uso de adubo nitrogenado marcado e avaliações da concentração do isótopo ¹⁵N. Segundo Unkovich et al. (2008), a redução da concentração do isótopo nos tecidos vegetais ocorre devido à FBN, que incorpora o N² atmosférico com 0,3663% de átomos de ¹⁵N (valor padrão da atmosfera), enquanto o N disponível no solo normalmente apresenta concentrações superiores do isótopo.

Além disso, espécies de bactérias podem induzir ou ser mediadoras de tolerância a estresses abióticos como a seca, pois são capazes de produzir substâncias osmotolerantes, como, por exemplo, glicina-betaína que pode atuar sinergicamente com os outros compostos vegetais na redução do potencial hídrico das células, ajudando na tolerância à seca (DIMKPA et al. 2009). A produção de prolina também pode ser estimulada nas plantas em presença de bactérias endofíticas em resposta a estresses bióticos e abióticos, mediado o ajuste osmótico, e protegendo membranas e proteínas contra efeitos adversos do aumento da concentração de íons inorgânicos (GROVER et al., 2011).

Outro ponto interessante é a atuação das bactérias endofíticas diazotróficas em mudanças na anatomia das plantas para uso forrageiro, aumentando o valor nutritivo de algumas espécies, como a cana-de-açúcar. Os seres vivos, como se sabe, são constituídas por um conjunto de órgãos formados por tecidos, que por sua vez, são constituídos por um conjunto de células com características químicas e estruturais próprias. Cada tecido possui composição química e física diretamente relacionada à sua função na planta, assim, tecidos designados à sustentação da planta possuem células densamente agrupadas, com paredes espessadas e lignificadas. Os tecidos da lâmina foliar são diferenciados em tecidos condutores (feixes vasculares), consistindo das células do xilema e do floema; tecido de suporte ou sustentação (esclerênquima), que, em folhas de gramíneas, está freqüentemente associado aos feixes vasculares e ao tecido assimilatório, formado pelas células do

parênquima clorofiliano que constituem o mesófilo. Nas espécies C4, as células do mesófilo apresentam-se densamente arranjadas, formando uma estrutura radial ao redor dos feixes vasculares, denominado arranjo tipo Kranz (PACIULLO, 2002). É nessa bainha que o ácido vindo das células do mesófilo chega, sendo descarboxilado, liberando CO₂. Além disso, também é ali que o gás é concentrado, reduzindo a atividade da enzima Rubisco, desempenhando papel fundamental no processo de fotossíntese (DENGLER & NELSON, 1999).

A proporção de tecidos tem sido a característica anatômica usada como indicativo do valor qualitativo de plantas forrageiras (AKIN; BURDICK, 1975). Assim, medidas da proporção dos tecidos com elevado conteúdo celular e/ou delgada parede primária (não-lignificada), de alta digestibilidade, e daqueles tecidos com baixo conteúdo celular e espessa parede celular (frequentemente lignificada), normalmente associados à baixa digestibilidade, podem explicar diferenças qualitativas entre as espécies (WILSON, 1997). E a capacidade das bactérias endofíticas de colonizar espaços intracelulares pode aumentar o conteúdo celular de tecidos, melhorando a digestibilidade da fibra da cana-de-açúcar (SKONIESKI et al., 2017). No presente trabalho foi utilizada a mistura de cinco estirpes das espécies descritas abaixo.

3.5.1. *Gluconacetobacter diazotrophicus*

A espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi isolada por Cavalcante & Döbereiner (1988) a partir de tecidos de cana-de-açúcar cultivados nos estados brasileiros Alagoas, Pernambuco e Minas Gerais. Esta bactéria possui poucos hospedeiros, mas é bastante encontrada em associação com plantas ricas em açúcar como a cana-de-açúcar, onde coloniza raízes, colmos e folhas em números de até 10⁶ células g⁻¹ de massa fresca (REIS et al., 1994; BODDEY et al., 1998). No entanto, sua população presente nos tecidos diminui consideravelmente com o avançar da idade da planta (SILVA, 1999; PERIN, 2003) e em condições favoráveis de nitrogênio (REIS JR et al., 2000), pois apresenta baixa diversidade genética (CABALLERO-MELLADO et al., 1995).

Seus efeitos benéficos em cana-de-açúcar estão associados à FBN e à produção de substâncias promotoras de crescimento (LEE et al. 2004). E ainda,

apresenta potencial para o controle biológico sobre determinados fitopatógenos como, por exemplo, *Xanthomonas albilineans* (BLANCO et al., 2005).

3.5.2. *Herbaspirillum* sp.

Duas espécies do gênero *Herbaspirillum* fazem parte da composição do inoculante usado na cana-de-açúcar. A *Herbaspirillum seropedicae* foi a primeira espécie descrita do gênero e isolada de raízes de milho, sorgo, e arroz (BALDANI et al., 1986). Mais tarde foi isolada de raízes, folhas e colmos de cana-de-açúcar, *Brachiaria decumbens* e *Digitaria decumbens* (BALDANI et al., 1996), dendezeiro e pupunheira (FERREIRA et al., 1995), bananeiras (CRUZ et al., 2001), capim elefante (REIS et al., 2000), arroz inundado (RODRIGUES, 2004; BRASIL, 2005) e cana-de-açúcar cultivada na Austrália (BODDEY et al., 1998). Já a *Herbaspirillum rubrisubalbicans* foi originalmente descrita como *Pseudomonas rubrisubalbicans* (GILLIS et al., 1991) e reclassificada por BALDANI et al. (1996) foi primeiramente encontrada associada à poaceas, como cana-de-açúcar, arroz, milho, sorgo e capim elefante.

A *H. seropedicae* possui a maior distribuição e ocorrência dentre as espécies diazotróficas endofíticas estudadas enquanto a *H. rubrisubalbicans* tem ocorrência mais restrita. No entanto, ambas as espécies podem contribuir para o crescimento vegetal através de outros fatores, além da FBN. Bastián et al., (1998) detectaram a produção de AIA e giberelinas A1 e A3 na espécie *H. seropedicae*. E Radwan et al. (2002) constataram a produção de indóis por estirpes de *H. rubrisubalbicans*.

3.5.3. *Nitrospirillum amazonense*

A *Nitrospirillum amazonense* é uma espécie de bactéria fixadora de nitrogênio e promotora de crescimento que foi primeiramente isolada de plantas da Amazônia brasileira, mas que também é encontrada em plantas de cana-de-açúcar e em outros cereais colhidos em diferentes regiões do país. A estirpe BR11145 da bactéria foi isolada da cana e testada pela na forma de inoculante microbiano (EMBRAPA, 2018). Essa espécie era conhecida como *Azospirillum amazonense*, mas foi reclassificada como *Nitrospirillum amazonense*, a partir da combinação de dados genéticos, químicos, taxonômicos e fisiológicos (MAGALHÃES et al. 1983; LIN et al. 2015).

Estas bactérias ocupam os espaços intercelulares e o protoxilema das raízes e têm a capacidade de colonizar também os colmos das gramíneas, devido à presença de flagelos, que possibilita uma maior mobilidade desta no solo e nas plantas (DE WEERT et al., 2002). Poucos dias após a aplicação da bactéria, inicia-se a promoção de crescimento, devido à aceleração na brotação de gemas e estimulação do crescimento de raízes, levando a uma maior absorção de água e nutrientes, e como consequência, as plantas apresentam maior perfilhamento e área foliar.

3.5.4. *Paraburkholderia tropica*

O gênero *Burkholderia* faz parte do grupo das betaproteobactérias, o qual possui algumas espécies que são relatadas como sendo patogênicas para humanos e animais. No entanto, as cepas dos complexos *B. cepacia*, *B. pseudomallei* e *B. mallei* (CHENGE et al., 2005) são de natureza ambiental e promovem o crescimento de plantas. Com base na afinidade filogenética, tem sido recentemente proposto dividir o gênero em dois grupos distintos: *Burkholderia* e *Paraburkholderia*. Enquanto o primeiro acomoda isolados clínicos, este último engloba o grupo ambiental benéfico da planta (SAWANA, 2014; DOBRITSA et al., 2016).

A espécie desse gênero que participa da composição do inoculante para FBN em cana-de-açúcar é *Burkholderia tropica* (REIS et al., 2004), hoje denominada *Paraburkholderia tropica* (OREN & GARRITY, 2015), e os meios de cultivo utilizados no Brasil para isolamento destes microrganismos são: LGI-P e JMV semissólidos. A espécie tem a forma de bastão ligeiramente curvado e sua mobilidade é possível devido à existência de flagelos. Essas bactérias tem a capacidade de reduzir o acetileno a etileno em meio semissólido sem nitrogênio, e são, portanto, consideradas capazes de fixar nitrogênio atmosférico.

4. Material e métodos

Serão realizados quatro experimentos entre 2017 e 2019, nos campos experimentais da Embrapa Clima Temperado localizada no município de Pelotas, no Rio Grande do Sul, com latitude 52°26'25" Oeste e 31°40'41" Sul e altitude de 60

metros e em uma propriedade no Monte Bonito, 9º distrito de Pelotas, com latitude de 52°22'10" Oeste e 32°41'08" Sul e altitude de 50 metros.

Para uso nos experimentos, mudas serão produzidas a partir de mini-toletes individualizados de colmos de cana-de-açúcar que serão coletados de áreas de multiplicação de cultivares e genótipos promissores, localizadas no mesmo local. A individualização dos toletes será feita com o auxílio de um sistema de guilhotina com lâmina dupla, separando as gemas viáveis e sem o ataque de pragas.

A inoculação dos mini-toletes será feita através da imersão desses materiais em solução contendo um mix com cinco estirpes de bactérias endofíticas diazotróficas. Depois de inoculados os mini-toletes serão plantados em tubetes contendo substrato da marca Turfa Fértil®, que serão colocados em casa de vegetação para brotação das gemas e desenvolvimento das mudas, até o momento da aclimação. No local é feito o manejo da temperatura através de sistema de resfriamento, ventiladores e do uso de telas de sombreamento, a umidade pode ser controlada através de nebulizadores e a irrigação é realizada através do sistema de bandejas flutuantes e microaspersores. A aclimação das mudas será feita durante um período de aproximadamente 15 dias, em que as mudas irão ser colocadas sob sombrite e depois a céu aberto até o transplante para o campo ou vasos.

Experimento 1:

Os tratamentos serão arranjados em esquema bifatorial 4x2, distribuídos em blocos casualizados, com quatro repetições, sendo eles compostos por quatro genótipos de cana-de-açúcar: RB867515, RB92579, RB966928 e RB975932, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas. A parcela ou unidade experimental será representada por três linhas de três metros, onde a linha do meio será utilizada para efetuar as avaliações.

Serão avaliados o número de colmos e o número de gemas, a altura, o diâmetro dos colmos, a área foliar, o conteúdo de clorofila, o teor de sólidos solúveis totais (SST), medido em °Brix e as variáveis de produtividade: biomassa total (BT), massa seca total (MST) e toneladas de colmos por hectare (TCH).

Experimento 2:

O delineamento experimental utilizado será o de blocos casualizados, com 6 repetições, onde cada parcela será representada por três plantas de cana-de-açúcar. Os fatores serão arrançados em esquema bifatorial (5x2), com o objetivo de testar cinco variedades de cana-de-açúcar e o uso de bactérias diazotróficas (com e sem uso de inoculante bacteriano), totalizando 10 tratamentos.

Serão realizadas as avaliações das seguintes características biométricas das plantas: número de folhas e de gemas, a altura e o diâmetro do colmo, e ainda, será conhecido o índice de clorofila.

Experimento 3:

O delineamento experimental será o de blocos casualizados, com três repetições, sendo cada parcela representada por uma planta. Serão realizadas avaliações biométricas, através da contagem dos números de folhas verdes e da altura das plantas, o potencial hídrico (Ψ_w) nas folhas será determinado com o auxílio de um osmômetro, e a partir da extração de discos foliares será determinado o conteúdo relativo de água (CRA).

Com o auxílio de um analisador portátil de gases a infravermelho, IRGA (Infra Red Gas Analyser), na primeira folha totalmente expandida e com lígula aparente, no terço médio do limbo foliar também serão avaliadas as trocas gasosas, a assimilação líquida de CO_2 (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a concentração intercelular de CO_2 (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e a respiração no escuro (R , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). E os conteúdos foliares de clorofilas a e b e total serão avaliados nos mesmos dias que as trocas gasosas, com um medidor eletrônico do conteúdo de clorofila ClorofiLOG, da marca FALKER, modelo CFL 1030.

Experimento 4: O delineamento experimental adotado será o de blocos casualizados, com quatro repetições, onde os fatores serão arrançados em um esquema fatorial 5x4, totalizando 20 tratamentos e 80 parcelas, compostas por três linhas de três metros (Apêndice II). Os tratamentos serão formados conforme a

combinação dos cinco genótipos de cana-de-açúcar (RB867515, RB966928, RB106814, RB106818 e RB106819) com quatro condições de inoculação e adubação nitrogenada em cobertura, sendo elas: C1 - com inoculação; C2 - com adubação nitrogenada (dose recomendada); C3 - com inoculação + adubação nitrogenada e C4 - controle sem nenhum tipo de tratamento.

Durante o cultivo serão acompanhados o perfilhamento, a área foliar, e o índice de clorofila dos tratamentos, até o surgimento dos colmos, que se dá em torno dos 120 dias após o transplante. A partir deste momento serão feitas as medidas de sólidos solúveis totais (°Brix) até a colheita, onde serão realizadas avaliações de produtividade e será realizada a amostragem de material para as avaliações químico-bromatológicas. Para este fim serão analisadas as seguintes variáveis: nitrogênio acumulado, matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), digestibilidade in vitro da FDN, celulose (CEL), hemicelulose (HEM), lignina (LIG) e cinzas (CZ).

Também serão determinados o rendimento teórico de etanol de primeira e segunda geração. Utilizando metodologia descrita por Santos et al. (2012), considerando 100% de eficiência na hidrólise e fermentação e aplicando-se as fórmulas $1G = ((TCH \times RTC) \times (SST/100) \times PC \times RTGE) \times 1000 / DE$; $ECEL = ((TMSH \times (CEL/100) \times RTCG \times RTGE) \times 1000) / DE$, considerando o etanol produzido a partir da celulose e $EHEMI = ((TMSH \times (HEMI/100) \times RTHX \times RTXE) \times 1000) / DE$, considerando apenas o etanol proveniente da hemicelulose.

Onde:

1G: Volume de etanol de primeira geração por hectare (L)

TCH: Toneladas de colmo por hectare

SST: Teor de sólidos solúveis totais no colmo em %

RTC: Rendimento teórico de caldo no colmo (0,75 g g⁻¹)

PC: Pureza teórica do caldo 0,95 (g g⁻¹)

TMSH: Toneladas de matéria seca por hectare

Os cálculos de rendimento teórico de etanol de segunda geração serão realizados conforme descrito por Santos et al. (2012), considerando 100% de

eficiência na hidrólise e fermentação. Para o cálculo de rendimento de etanol de segunda geração a partir de celulose (ECEL) foi utilizada a equação descrita abaixo

$$ECEL = ((TMSH \times (CEL/100) \times RTCG \times RTGE) \times 1000) / D$$

Onde:

ECEL: Volume de etanol de celulose por hectare (L)

TMSH: Toneladas de matéria seca por hectare

CEL: Teor de celulose na amostra em %

RTCG: Rendimento teórico de conversão de celulose em glicose (1,11 g g⁻¹)

RTGE: Rendimento teórico de conversão de glicose em etanol (0,511 g g⁻¹)

DE: Densidade do etanol (0,789 g l⁻¹)

Para o cálculo de rendimento de etanol de segunda geração a partir de hemicelulose (EHEMI) foi utilizada a equação descrita abaixo:

$$EHEMI = ((TMSH \times (HEMI/100) \times RTHX \times RTXE) \times 1000) / DE$$

Onde:

EHEMI: Volume de etanol de hemicelulose por hectare (L)

TMSH: Toneladas de matéria seca por hectare

HEMI: Teor de hemicelulose na amostra em %

RTHX: Rendimento teórico de conversão de hemicelulose em xilose (1,057 g g⁻¹)

RTXE: Rendimento teórico de conversão de xilose em etanol (0,511 g g⁻¹)

DE: Densidade do etanol 0,789 (g l⁻¹)

Para obtenção do rendimento teórico de etanol total de segunda geração (2G) foi efetuada a soma do ECEL e EHEMI

$$2G = ECEL + EHEMI$$

5. Resultados e Impactos esperados

Com os resultados desta pesquisa é esperado comprovar a eficiência do uso de bactérias diazotróficas no desenvolvimento de cana-de-açúcar, diminuindo o uso de fertilizante nitrogenado da cultura, e conseqüentemente, o impacto ambiental

gerado pelo sistema de produção de cana-de-açúcar. E com isso, contribuir com a liberação e comercialização dos inoculantes bacterianos para cana-de-açúcar.

6. Cronograma do Projeto

ATIVIDADE	1/2017	2/2017	1/2018	2/2018	1/2019	2/2019	1/2020
Revisão de literatura	X	X	X	X	X	X	
Disciplinas	X	X	X	X			
Avaliações em primeira soca	X	X					
Produção de mudas				X			
Avaliações microbiológicas					X		
Implantação experimentos				X			
Avaliações				X	X	X	
Qualificação do doutorado				X			
Tabulação/análise de dados		X		X	X	X	
Publicação de resultados						X	X
Elaboração e defesa da tese						X	X

7. Informações Orçamentárias

Para a realização da tese o projeto conta com recurso financeiro e logístico, além do apoio com materiais e análises, das instituições Embrapa Clima Temperado (Pelotas), Embrapa Agrobiologia (Seropédica), Programa de Pós-graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar (UFPel), CAPES e Universidade Federal de Santa Maria. Os recursos estão detalhados a seguir:

DESCRIÇÃO	UNIDADE	QUANT.	R\$ UNIT.	R\$ TOTAL
MATERIAL DE CONSUMO				
Substrato	Sacos	40	15	600,00
Sacos de Papel	Pact c/100	10	25	250,00
Material de Escritório	Diversos	1	700	700,00
Material de Laboratório	Diversos	1	1000	1.000,00
Outros Insumos	Diversos	1	2500	2.500,00
EQUIP. E MATERIAL PERMANENTE				
Tubetes *	unidade	5.000	0,50	2.500,00
Guilhotina *	unidade	1	500,00	500,00
Paquímetro *	unidade	1	70,00	70,00
Balança *	unidade	1	2.000	2.000,00
Clorofilômetro *	unidade	1	6.000	6.000,00
Tesoura de poda *	unidade	2	80,00	160,00
Podão *	unidade	2	50,00	100,00
Trena de 50 m *	unidade	1	35,00	35,00
OUTROS SERVIÇOS				
Passagens		4	800	R\$ 3.200,00
Publicações previstas		2	4000	R\$ 8.000,00
Despesas com congressos		2	1800	R\$ 3.600,00
Análises de laboratório		2	900	R\$ 1.800,00
SUB-TOTAL				R\$ 33.015,00
IMPREVISTOS (10%)				R\$ 3.300,00
TOTAL				R\$ 36.315,00

* Equipamento ou material disponível na unidade de pesquisa.

8. Referências Bibliográficas

AKIN, D.E., BURDICK, D Percentage of tissue types in tropical and temperate grass leaf blades and degradation of tissues by rumen microorganisms. *Crop Sci*, v.15, n.5, p.661-668, 1975.

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

ANJOS, I. A.; SILVA, D. N.; CAMPANA, M. P. Cana-de-açúcar como forrageira. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Eds). *Cana-de-açúcar*. Campinas: Instituto Agronômico, 2008. cap. 33, p. 731- 733.

ANTUNES, William Rodrigues. Baixas temperaturas nas características agrônômicas, produtividade e qualidade em genótipos de cana-de-açúcar, no estado do Rio Grande do Sul. 2018. 93 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

ÁVILA, C. L. S., C. E. C. BRAVO MARTINS; R. F. SCHWAN. Identification and characterization of yeasts in sugarcane silages. *J. Appl. Microbiol.* 109:1677–1686, 2010.

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

BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M.; POZZA, E. A. Bactérias endofíticas como agentes promotores de crescimento de plantas de tomateiros e de inibição in vitro de *Ralstonia solanacearum*. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 32, p. 731-739, 2008.

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

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

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

BRANDÃO, A. Cana-de-açúcar: álcool e a açúcar na história e no desenvolvimento social do Brasil. Brasília: Horizonte, 1985.

BRASIL, M. da S. Ocorrência e diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes variedades de arroz. 137 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Fitotecnia)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ, 2005.

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

CASTRO, P. R. Aplicações da fisiologia vegetal no sistema de produção de cana-de-açúcar. In: Simpósio Internacional de Fisiologia de Cana-de-açúcar, Piracicaba, Anais... Piracicaba: STAB, 9 p. 2000.

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

CHAVES M. M. Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*, v.42, p.1-16, 1991.

CHAVES, M. M.; PEREIRA, J. S.; MAROCO, J.; RODRIGUES, M. L.; RICARDO, C. P. P.; OSÓRIO, M. L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of Botany*, v.89, p. 907-916, 2002.

CHAVES, V.A.; SANTOS, S.G.; SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SOUSA, S.J. MONTEIRO, R.C.; REIS, V.M. Initial development of two sugarcane varieties inoculated with diazotrophic bacteria. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 39:1595–1602. 2015.

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

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acomp. safra bras. cana, v. 5 - Safra 2018/19, n. 2 - Segundo levantamento, agosto de 2018.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar, Segundo levantamento, safra 2017/18, v.4, n.2 p. Brasília, ago. 2017.

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

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

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16 S Ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril.) Applied and Environmental Microbiology, v. 67, p. 2375-2379, 2001.

DANIEL, J. L. P., R. C. AMARAL, A. SÁ NETO, E. H. CABEZAS-GARCIA, A. W. BISPO, M. ZOPOLLATTO, T. L. CARDOSO, M. H. F. SPOTO, F. A. P. SANTOS; L. G. NUSSIO. Performance of dairy cows fed high levels of acetic acid or ethanol. J. Dairy Sci. 96:398–406. 2013.

DENGLER, N. G.; NELSON, T. Leaf structure and development in C₄ plants. In: C₄ Plant Biology. Eds. R. F. Sage & R. K. Monson. Academic Press, Colorado: 133-172, 1999.

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

D'HONT, A., GRIVET, L., FELDMANN, P. et al. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum spp.*) by molecular cytogenetics. Molecular and General Genetics, 250, 405–413, 1996.

DIMKPA, C.; WEINAND, T.; ASCH, F. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. Plant, Cell and Environment, v.32, p.1682–1694, 2009.

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

DU, Y.C.; KAWAMITSU, Y.; NOSE, A. ; HIYANE, S.; MURAYAMA, S. ; WASANO, K. UCHIDA, Y. Effects of Water Stress on Carbon Exchange Rate and Activities of Photosynthetic Enzymes in Leaves of Sugarcane (*Saccharum sp.*). Australian Journal of Plant Physiology, v. 23, p.719-726, 1996.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Nitrospirillum amazonense*: espécie de bactéria diazotrófica selecionada para aplicação em cana-de-açúcar (estirpe CBAMc). Embrapa Agrobiologia, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/6268/nitrospirillum-amazonense-especie-de-bacteria-diazotrofica-selecionada-para-aplicacao-em-cana-de-acucar-estirpe-cbamc> Acesso em: 31 ago 2020.

FABRIS, L.B. Variedades de cana forrageira e sucroalcooleira em diferentes espaçamentos e adubação nitrogenada. 2009. 32p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade do Oeste Paulista. Presidente Prudente, 2009.

FAOSTAT. Food and agricultural commodities production. Disponível em <<http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=en>>. 2016. Acesso em: outubro de 2018.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, D.; FUJITA, D.; BASRA, S. M. A. Plant drought stress effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, v. 29, p.185-212, 2009.

FERREIRA, A. C.; COZZOLINO, K.; CARVALHO, A. R. V.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in oil palm trees. In: international symposium on sustainable agriculture for the tropics – the role of biological nitrogen fixation, Angra dos Reis, RJ. Abstracts... Seropédica: EMBRAPA-CNPAB; UFRRJ, 1995. p. 210, 1995.

FREITAS, A. W.; PEREIRA, J. C.; ROCHA, F. C.; DETMANN, E.; BARBOSA, M. H. P.; RIBEIRO, M. D.; COSTA, M. G. Avaliação da divergência nutricional de genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). *Revista Brasileira Zootecnia*, v. 35, n. 1, p. 229-236, 2006.

GHANNOUM, O. C4 photosynthesis and water stress. *Annals of Botany*, v. 103, p.635 – 644, 2009.

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

GROSS, J. A.; CASSOL, R. Índice de anomalia de chuva do estado o Rio Grande do Sul. *Ambiência*, v. 11, n. 3, p. 529-543, 2015.

GROVER, M.; ALI, S. Z.; SANDHYA, V.; RASUL, A.; VENKATESWARLU, B. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stress. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, v. 27, p1231-1240, 2011.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Levantamento sistemático da produção agrícola: Julho de 2014. Acessado em 28 de setembro de 2018. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default_publica_completa.shtm.

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

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.

LAWLOR, D. W. Limitation to Photosynthesis in Water-stressed Leaves : Stomata vs . Metabolism and the Role of ATP. *Annals of Botany*, v.89, p.871-885, 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.

LEMÕES, L. S. Seleção de genótipos de cana-de-açúcar para produção de etanol e silagem. 2018. 72f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

LIMA, U. D.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. D. et al (Coord.). *Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blucher, v. 3. p. 1-43. 2001.

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. 2015.

LOPES, M. S.; ARAUS, J. L.; VAN HEERDEN, P. D. R.; FOYER, C. H. Enhancing drought tolerance in C4 crops. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, p. 3235- 3153, 2011.

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.

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

MANZATTO, C. V.; BACA, J. F. M.; PEREIRA, S. E. M. Zoneamento agroecológico da cana-de-açúcar: abordagem metodológica para integração temática de grandes áreas territoriais. In: PRADO, R. B.; TURETTA, A. P. D.; ANDRADE, A. G. de (Org.). *Manejo e conservação do solo e da água no contexto das mudanças ambientais*. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 486 p., 193-214, 2010.

MORAIS, K. P.; MEDEIROS, S. L. P.; SILVA, S. D. A.; BIONDO, J. C.; BOELTER, J. H.; DIAS, F. S. Produtividade e teor de fibra de genótipos de cana-de-açúcar em Jaguari-RS. *Anais... Simpósio Estadual de Agroenergia e IV Reunião técnica de Agroenergia*. Porto Alegre, 2012.

NUSSIO, L.G.; ROMANELLI, T.L.; ZOPOLLATTO, M. Tomada de decisão na escolha de volumosos suplementares para bovinos de corte em confinamento. In: Simpósio goiano sobre manejo e nutrição de bovinos de corte e leite, Campinas. Anais... Campinas: CBNA, p.1-1, 2003.

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

PACIULLO, D. S. C. Características anatômicas relacionadas ao valor nutritivo de gramíneas forrageiras. Ciência Rural, vol.32 n.2 Santa Maria, 2002.

PASSIOURA, J. B. Drought and drought tolerance. Plant Growth Regulation 20: 79-83, 1996.

PEREIRA, M. G. et al. The renewable energy market in Brazil: current status and potential. Renewable and Sustainable Energy, v. 16, n. 6, p. 3786–3802, ago. 2012.

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

PIMENTEL, C. A relação da planta com a água. EDUR - Editora Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. 191 páginas 1ª edição. 2004.

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

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

RAMPINO, P.; PATALEO, S.; GERARDI, C.; MITA, G.; PERROTTA, C. Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. Plant Cell Environ. N. 29, 2143–2152. 2006.

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

REIS, R. H. P. Características agronômicas e composição bromatológica de variedades de cana-de-açúcar para alimentação de ruminantes. 73p, Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical), Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2010.

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

RESENDE, F.D.; SIGNORETTI, R.D.; COAN, R.M.; SIQUEIRA, G.R. Terminação de bovinos de corte com ênfase na utilização de alimentos conservados. In: REIS, R.A.; SIQUEIRA, G.R.; BERTIPAGLIA, L.M.A. (Eds). Volumosos na produção de ruminantes. Jaboticabal: Funep, 2005. p.83-104.

RIDESA- Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar / Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. 136 p. Curitiba, 2010.

ROBERTSON, M. J.; WOOD, A. W.; MUCHOW, R. C. Growth of sugarcane under high input conditions in tropical Australia. I. Radiation use, biomass accumulation and partitioning. *Field Crops Research* v.48, p. 11-25, 1996.

RODRIGUES, A. A.; PRIMAVESI, O.; ESTEVES, S. N. Efeito da qualidade de variedades de cana-de-açúcar sobre seu valor como alimento para bovinos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 32, n. 12, p. 1333-1338, 1997.

RODRIGUES, L. da S. Estudo da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a cultivares de arroz inundado. 94 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ, 2004.

SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renewable Energy*, v. 37, n. 1, p. 19-27, jan. 2012.

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

SHARP, R. E. Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant Cell Environment*, Columbia, v. 25, n. 2, p. 211-222, 2002.

SHREEVE, J. Redesigning life to make ethanol. 2006. Disponível em: <http://www.technologyre-view.com/featuredstory/406006/redesigning-life-to-make-ethanol>. Acesso em: outubro de 2018.

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

SINGELS, A.; DONALDSON, R.A.; SMIT, M.A. Improving biomass production and partitioning in sugarcane: theory and practice. *Field Crops Research*, v. 92, p. 291-303, 2005.

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.

SIQUEIRA, G.R.; RESENDE, F.D.; REIS, R. A.; ROMAN, J.; BERNARDES, T.F.. Uso estratégico de forragens conservadas em sistemas de produção de carne. In:

JOBIM, C.C.; CECATO, U.; CANTO, M.W. (Eds) Produção e utilização de forragens conservadas. Maringá: Masson, p.41-89, 2008.

SKONIESKI, F. R.; VIÉGAS, J.; MARTIN T. N.; NÖRNBERG, J. L.; MEINERZ, G. R.; TONIN, T. J. PRISCILA, P.; FRATA, M. T. Effect of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization rates on maize plant yield and silage quality. R. Bras. Zootec., 46(9):722-730, 2017.

SMANIOTTO, G.; SLOMP, J. J.; AMARAL, A. S.; TEIXEIRA, A. J.; ROCHA, P. S. G.; SILVA, S. D. A. Avaliação de diferentes genótipos de cana-de-açúcar no sul do Brasil quando à incidência de ferrugem das foças e mancha parda. Anais... Simpósio Estadual de Agroenergia e IV Reunião técnica de Agroenergia. Porto Alegre, 2012.

SOARES, F. U. Estudo do potencial climático para cana-de-açúcar (*Sacharum* spp.) no Rio Grande do Sul por meio de Geoprocessamento: Estudo de caso no município de Jaguari. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Geomática - Universidade Federal de Santa Maria. 77 p. 2008.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. Química orgânica. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, p. 645. 2001.

TAULÉ, C.; MAREQUE, C. ; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V. M.; SACARDI, M.; BATTISTONI, F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. Plant Soil DOI 10.1007/s11104-011-1023-4, 2012.

TRIVELIN, P.C.O. & VITTI, A.C. Manejo do Nitrogênio e enxofre na nutrição e adubação da cana-de-açúcar. CENA/USP, Piracicaba, SP.p.46. 2009.

UNKOVICH, M.; HERRIDGE, D.; PEOPLES, M.; CADISCH, G.; BODDEY, R.; GILLER, K.; ALVES, B.; CHALK, P. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. Canberra: Australian Centre for International Agricultural, 285p., 2008.

VERISSIMO, M. A. A. Desempenho agrônômico de genótipos de cana-de-açúcar no estado do Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado) Programa de PósGraduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar. Universidade Federal de Pelotas. 81p, 2012.

VITTI, A.C.; CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P.C.O.; ROSSETO, R. Nitrogênio. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M. de; LANDELL, M.G. de A. Cana-deaçúcar. Campinas: Instituto Agrônômico, p.239-269, 2008.

VITTI, A.C.; FRANCO, H.C.J.; TRIVELIN, P.C.O.; FERREIRA, D.A.; OTTO, R.; FORTES, C.; FARONI, C.E. Nitrogênio proveniente da adubação nitrogenada e de resíduos culturais na nutrição da cana-planta. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.46, p.287-293, 2011.

WELBAUM, G.E., MEINZER, F.C. Compartmentation of solutes and water in developing sugarcane stalk tissue. *Plant Physiology*, v 93, 1147–1153, 1990.

WILSON, J.R. Structural and anatomical traits of forages influencing their nutritive value for ruminants. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL EM PASTEJO, 1997, Viçosa. Anais... Viçosa : UFV, 1997. p.173-208.

3. Relatório do Trabalho de Campo

3. Relatório do trabalho de campo

Experimento 1: Desempenho de genótipos de cana-de-açúcar inoculados com bactérias endofíticas diazotróficas em cultivo de primeira soca

Com o objetivo de dar continuidade ao trabalho que apresentou resultados promissores da inoculação de bactérias endofíticas diazotróficas em cana-planta (MATOSO, 2017), o experimento conduzido em uma propriedade rural localizada no Monte Bonito, interior do município de Pelotas/RS, cujas coordenadas são 52°22'10" Oeste e 32°41'08" Sul e altitude de 50 metros, foi avaliado durante o ciclo de cana-soca, na safra agrícola 2016/2017.



Figura 1. Experimento de genótipos de cana-de-açúcar com e sem inoculação de bactérias endofíticas diazotróficas no cultivo de cana-soca, no Monte Bonito, interior de Pelotas, RS. (Imagem: Ester Schiavon Matoso, 2017).

Os tratamentos foram arrançados em esquema bifatorial 4x2, distribuídos em blocos casualizados, com quatro repetições, sendo eles compostos por quatro genótipos de cana-de-açúcar: RB867515, RB92579, RB966928 e RB975932, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas. A parcela ou unidade experimental foi representada por três linhas de três metros, onde a linha do meio foi utilizada para efetuar as avaliações.

A inoculação de bactérias nos tratamentos foi efetuada durante a produção de mudas de cana-de-açúcar, no ano anterior. As mudas foram provenientes de toletes de uma gema previamente tratados e inoculados com bactérias diazotróficas, que foram plantados em tubetes contendo substrato para brotação e crescimento. Após cerca de 30 dias mantidas em casa de vegetação climatizada, as mudas foram transferidas para tela de sombreamento (sombrite), para que ocorresse a primeira fase da aclimação e em seguida elas foram deixadas a céu aberto para finalizar a aclimação em pleno sol, num total de 15 dias. Em seguida foram transplantadas para o campo, foram feitas as avaliações em cana-planta e após a colheita, a cana-de-açúcar rebrotou e foi avaliado o ciclo de cana-soca. Foram efetuadas avaliações biométricas, índice de clorofila, maturação, produtividade, conteúdo de matéria seca e de nitrogênio.

Antecipando a colheita da cana-soca, aos 240 dias, foi contado o número de colmos e o número de gemas, a altura foi medida com o auxílio de uma régua e expressa em centímetros (cm), e o diâmetro dos colmos foi realizado através de um paquímetro digital, expresso em milímetros (mm).

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

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



Figura 2. a) ClorofiLOG, da marca FALKER, modelo CFL 1030;B) Medidas para cálculo da área foliar e posterior Índice de área foliar (IAF). (Imagens: Ester Schiavon Matoso, 2017)

O parâmetro utilizado na avaliação da maturação dos genótipos foi o teor de sólidos solúveis totais (SST), medido em °Brix. As avaliações de SST foram realizadas durante o período de desenvolvimento da cultura, a partir do surgimento dos colmos até a maturação. As avaliações foram realizadas em três diferentes colmos, com amostragem em dois pontos por colmo: no terceiro entre nó abaixo do ponto de quebra do palmito e no terceiro entre nó acima do solo, com utilização de um calador para coleta do caldo no colmo e leitura em refratômetro digital portátil marca Atago® modelo Pal⁻¹, com compensação automática da temperatura.

As variáveis utilizadas para avaliação de produtividade foram biomassa total (BT), massa seca total (MST) e toneladas de colmos por hectare (TCH). Foram cortadas duas touceiras em sequência, na linha central da parcela e na parte central da linha, as quais foram pesadas com auxílio de balança digital. Para biomassa total foram pesadas as touceiras inteiras e aplicada a fórmula $BT = (PT \times ((100/E) \times 100)/1000)$, onde PT se refere a massa de duas touceiras inteiras com colmos e folhas (kg) e E se refere ao espaçamento (1,4 m). E para toneladas de colmos, esses foram pesados sem ponteiro e sem folhas e o peso aplicado a fórmula $TCH = (PC \times ((100/E) \times 100))$, onde PC se refere à massa de colmos das duas touceiras.

Para determinar o conteúdo de matéria seca, foi efetuada uma amostragem significativa de três colmos com folhas, os quais foram triturados individualmente em um triturador de galhos e resíduos orgânicos, da marca Trapp, modelo TR 200,

pesados e levados à estufa, onde permaneceram a 60° até que estivessem totalmente secos. Após este período, que levou em torno de sete dias, as amostras foram homogeneizadas e pesadas novamente. Em seguida, uma amostra de cada tratamento foi separada e triturada, porém dessa vez em moinho de facas, até atingir o tamanho de partícula ideal para análise do conteúdo de nitrogênio dos tratamentos em um analisador elementar, realizada no laboratório de solos da Universidade Federal de Santa Maria.

Quanto à análise estatística, os resultados foram avaliados quanto aos pressupostos (normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, homocedasticidade pelo teste de Hartley e a independência dos resíduos foi verificada graficamente). Posteriormente, foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$) e em caso de significância estatística, compararam-se os efeitos dos genótipos pelo teste de Tukey e da inoculação pelo teste t, ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

Escolha dos genótipos e produção de mudas

Diante dos resultados preliminares do estudo anterior, também os resultados em cana-planta no mesmo experimento na safra 2015/2016 (Apêndice I) e levando-se em conta o uso das variedades RB867515 e RB966928 no Brasil (BRAGA JUNIOR et al., 2018) escolheram-se essas para dar continuidade na pesquisa, juntamente com as variedades RB106814, RB106818 e RB106819, que se mostraram promissoras para produção de etanol de segunda geração e para serem utilizadas na alimentação animal no estudo desenvolvido por Lemões, (2018).

Para atingir os objetivos, primeiramente foram produzidas mudas dos cinco materiais, a partir de colmos que foram coletados do campo, despalhados e cortados em toletes de gema única, conhecidos como minitoletes, com o auxílio de uma guilhotina de lâmina dupla. Após o corte, esses foram submetidos a tratamento com fungicida de ação sistêmica a base de piraclostrobina por 3 minutos e em seguida, metade do material foi inoculado com bactérias endofíticas diazotróficas pela imersão em solução turfosa por 30 minutos (Figura 3A).

A mistura bacteriana continha cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* BR11281^T = PAL-5^T, descrito por Cavalcante e Döbereiner (1988); *Herbaspirillum seropedicae* BR11335 = HRC54, descrito por Baldani et al. (1986); *Herbaspirillum rubrisubalbicans* - BR11504 = HCC103, descrito Baldani et al. (1996);

Paraburkholderia tropica - BR11366^T = PPe8^T, anteriormente pertencente ao gênero *Burkholderia*, descrito por Reis et al. (2004) e recentemente reclassificado por Oren e Garrity (2015); e *Nitrospirillum amazonense* - BR11145 = CBAMc, anteriormente pertencente ao gênero *Azospirillum*, descrito por Magalhães et al. (1983) e reclassificado por Lin et al. (2014). Essas bactérias foram previamente testadas e selecionadas por Oliveira et al. (2002, 2006) e depositado na coleção de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia - CBR Johanna Döbereiner.

Os minitoletes foram plantados em tubetes com volume de 180 cm³, contendo substrato comercial da marca Turfa Fértil, alocados em bandejas contendo 54 células, que foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura média de 32°C durante sete dias para que ocorresse a brotação das gemas (Figura 3B e 3C). Após esse período, as bandejas com as mudas foram transferidas para casa de vegetação modelo duas águas, cujas dimensões são de 12,8m de largura e 12m de comprimento, mais antecâmara de acesso localizada em uma frontal da casa, que totalizam 165,6m², onde foram mantidas até o momento de instalação dos demais experimentos da pesquisa. O manejo da temperatura foi feito através de sistema de resfriamento, mantendo-se a temperatura de 25°C e a umidade foi mantida através do uso de nebulizadores (Figura 3D).



Figura 3. Etapas da produção de mudas de cana-de-açúcar a partir de minitoletes: (A) inoculação em solução turfosa; (B e C) brotação em câmara de crescimento; (D) crescimento em casa de vegetação com condições de temperatura e umidade controladas (Imagens: Ester Schiavon Matoso, 2018).

Pré-teste 1: Avaliação dos efeitos do déficit hídrico em mudas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias endofíticas diazotróficas

O presente ensaio teve início 40 dias após o plantio dos mini-toletes, com mudas devidamente enraizadas em tubetes de 130 cm³. Os fatores foram arranjados em um esquema bifatorial (genótipo x inoculação), totalizando 10 tratamentos.

Inicialmente foram realizadas avaliações de altura, número de folhas verdes, diâmetro do colo, conteúdo relativo de água, massa fresca e massa seca das folhas e volume de raízes, nas mudas mantidas sob condições adequadas de irrigação em casa de vegetação climatizada, com umidade controlada através do uso de nebulizadores (Figura 4A).

Na mesma ocasião, mudas dos diferentes tratamentos foram alocadas em casa de vegetação com irrigação suspensa (Figura 4B). O período de estresse

hídrico foi de seis dias e foram realizadas avaliações das mudas diariamente, por um único avaliador, com início um dia após a instalação do experimento.

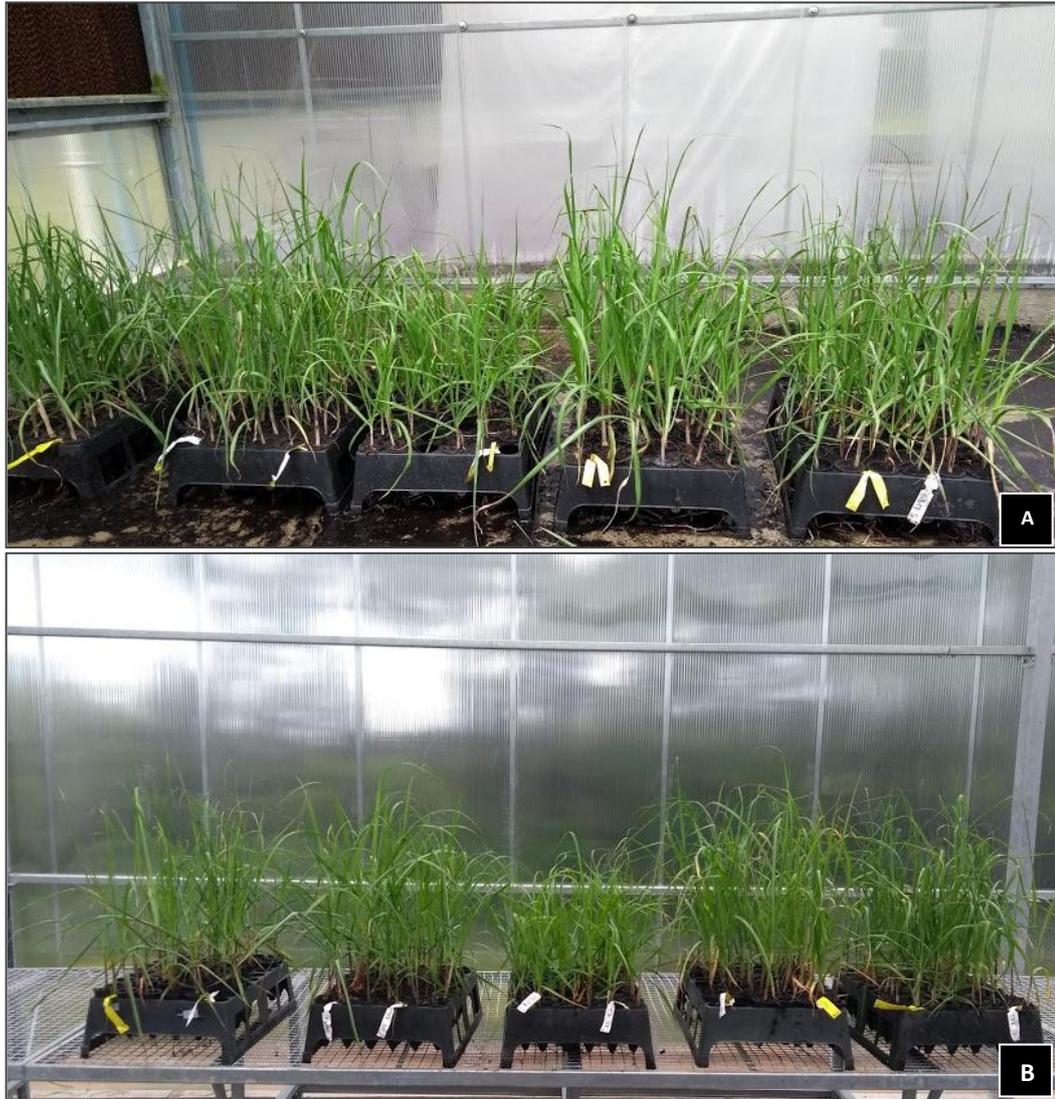


Figura 4. Momento da instalação do experimento de tolerância ao déficit hídrico em mudas de cana-de-açúcar inoculadas ou não com bactérias endofíticas diazotróficas. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS (Imagens: Ester Schiavon Matoso, 2018).

Os parâmetros observados foram: altura da muda, conteúdo de clorofila, com o auxílio de um clorofilômetro, e ainda, aplicou-se uma escala visual de notas de tolerância ao estresse hídrico descrito por Härter, (2018).

Os principais critérios adotados pelo autor, para determinação do nível de tolerância ao déficit hídrico, foram o enrolamento foliar, murcha e descoloração das folhas. Neste sentido, as classes de tolerância são descritas como: Nota 1 (Altamente tolerante) - mudas com ausência de sintomas de déficit hídrico, com folhas verdes e de aparência tenra; Nota 2 (Tolerante) – mudas com sintomas

iniciais de deficiência hídrica, leve murchamento das folhas e com enrolamento nas folhas mais jovens; Nota 3 (Medianamente tolerante) - mudas com sintomas intermediários de deficiência hídrica, murchamento e enrolamento foliar presente em todas folhas, com início de descoloração foliar, porém com ausência de folhas secas; Nota 4 (Sensível) – mudas com sintomas intensos de deficiência hídrica, folhas mais velhas secas e presença de descoloração em todas as folhas; Nota 5 (Altamente sensível) – mudas com sintomas severos de deficiência hídrica, com completo enrolamento foliar, descoloração e folhas totalmente secas (Figura 5).

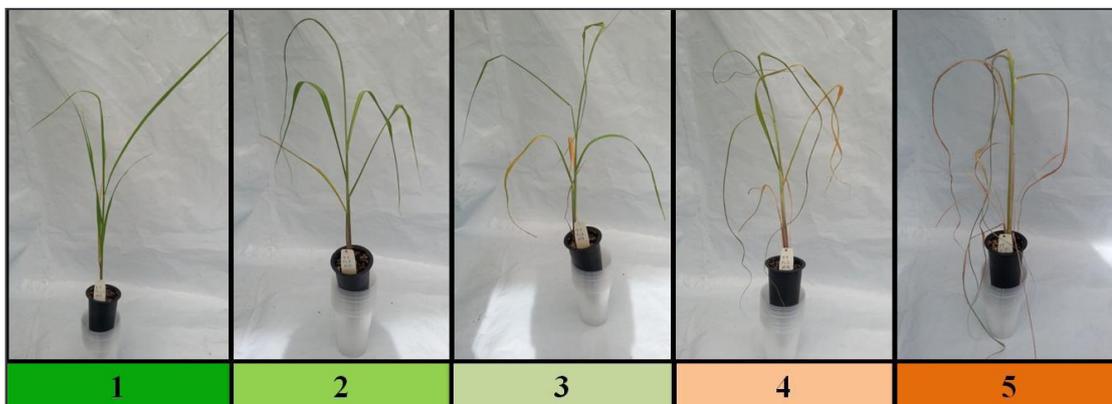


Figura 5. Escala visual de notas para tolerância ao déficit hídrico em plântulas de cana-de-açúcar: 1 - Altamente tolerante; 2 - Tolerante; 3 - Medianamente tolerante; 4 - Sensível; 5 - Altamente sensível (Imagem: Adilson Härter, 2018).

Além disto, foi realizada a avaliação do conteúdo relativo de água nas folhas das mudas ao final do período de estresse hídrico, para fins de comparação com os valores encontrados nas plantas irrigadas. Muitos autores consideram que o conteúdo relativo de água (CRA) seja bem correlacionado com os fatores fisiológicos das plantas, por apresentar forte relação com volume celular, relevante no metabolismo de plantas sob o déficit hídrico (JHONES, 1992).

O CRA foi determinado segundo a metodologia descrita por Silveira et al. (2003), discos foliares de 1 cm de diâmetro foram coletados das mudas de cana-de-açúcar e pesados imediatamente, obtendo-se sua massa fresca (MF). Em seguida, foram dispostos em placas de Petri e imersos em água destilada, por sete horas, em temperatura ambiente sob radiação fotossinteticamente ativa e então, os discos foram secos em papel filtro e pesados novamente, obtendo-se a massa túrgida (MT). O material foi seco em estufa a 60°C por 48 horas e pesados novamente, para a

obtenção da massa seca (MS) e o CRA foi calculado pela equação: $CRA = ((MF - MS) / (MT - MS)) \times 100$.

E com o objetivo de avaliar a sobrevivência das mudas e o reestabelecimento das mesmas após o estresse hídrico, foi efetuado o corte das folhas acima do ponto de crescimento e o encharcamento dos recipientes em lâmina de água por 5 minutos. Em seguida, os tratamentos foram alocados em casa de vegetação, sob regime de irrigação normalmente (Figura 6) e avaliados uma vez a cada três dias, onde foram contadas as mudas sobreviventes e observado o crescimento, através da medida da altura das mudas. As folhas retiradas de todos os tratamentos foram pesadas, secas em estufa a 60°C por 48 horas e pesadas novamente, para determinação do conteúdo de matéria seca.



Figura 6. Avaliação de crescimento e sobrevivência de mudas após estresse hídrico. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS (Imagens: Ester Schiavon Matoso, 2018).

Experimento 2: Características biométricas e índice de clorofila de plantas adultas de cana-de-açúcar em função do uso de bactérias diazotróficas

Aos 30 dias após o plantio mudas foram transplantadas para sacos plásticos pretos de cinco litros, contendo substrato de marca comercial, a base de turfa e casca de arroz carbonizada e foram transferidas para uma estufa tipo telado, onde foi realizado o experimento.

Aos 90 dias após a transferência das plantas para o telado (Figura 7), foram realizadas as avaliações das características biométricas das plantas em fase adulta, priorizando-se o colmo principal e desbastados os demais perfilhos. O número de folhas e de gemas foram realizados através da contagem dos mesmos, a altura da planta foi medida com o auxílio de uma régua graduada em centímetros e o diâmetro do colmo, em milímetros, foi medido com o auxílio de um paquímetro digital na porção intermediária do mesmo. O índice de clorofila foi observado na porção intermediária das folhas +3, através do medidor de clorofila ClorofiLOG, da marca FALKER, modelo CFL 1030. Esse equipamento avalia, quantitativamente, a intensidade do verde da folha, medindo as transmissões de luz a 650 nm, onde ocorre absorção de luz pela molécula de clorofila e a 940 nm, onde não ocorre absorção. Com estes dois valores, o equipamento calcula um número ou índice SPAD (Soil Plant Analysis Development) que, normalmente, é altamente correlacionado com o teor de clorofila da folha (MARKWELL et al., 1995; GUIMARÃES et al., 1999). Os resultados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, à homocedasticidade pelo teste de Hartley e a independência dos resíduos foi verificada graficamente. Posteriormente, foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$) e em caso de significância estatística, compararam-se os efeitos das variedades pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e do uso de bactérias diazotróficas pelo teste t ($p \leq 0,05$).



Figura 7. Visão geral do experimento desenvolvido em telado, Embrapa Clima Temperado, 2019.

Pré-teste 2: Análises da fotossíntese em plantas adultas de cana-de-açúcar com auxílio do analisador de trocas gasosas (IRGA)

A fim de testar os efeitos da aplicação de bactérias diazotróficas sobre a fisiologia de plantas de cana-de-açúcar em situação de déficit hídrico, foram selecionadas três plantas do experimento 2 das variedades RB867515 e RB966928, com e sem a aplicação de bactérias e restringiu-se totalmente a irrigação. As avaliações realizadas foram: atividade fotossintética (P_n), a condutância estomática (g_s) e a transpiração líquida (E) com o auxílio de um analisador de trocas gasosas (IRGA), até o décimo segundo dia de restrição hídrica, momento em que as plantas apresentaram elevada queda nas taxas fotossintéticas (Figura 8). Os resultados apresentados foram bastante promissores e levaram a conclusão de que seria interessante dar continuidade na pesquisa com as demais variedades de cana-de-açúcar.



Figura 8. Avaliações com auxílio do IRGA em plantas adultas de cana-de-açúcar das variedades RB867515 e RB966928, com e sem aplicação de bactérias diazotróficas. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS (Imagens: Ester Schiavon Matoso, 2019).

Experimento 3: Influência de bactérias endofíticas diazotróficas nos efeitos do déficit hídrico em plantas de cana-de-açúcar

Para realização deste experimento, novas mudas foram produzidas, da mesma forma dos experimentos anteriores. Trinta dias após este processo, as mudas de cana-de-açúcar foram transplantadas para sacos plásticos pretos de cinco

litros e foram mantidas por 15 dias em casa de vegetação sob irrigação por microaspersão e temperatura de 28°C (Figura 9).



Figura 9. A) Mudanças de cana-de-açúcar logo após o transplante para os sacos plásticos; B) Plantas de cana-de-açúcar 15 dias após o transplante. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS (Imagens: Ester Schiavon Matoso, 2019).

Em seguida as mudas foram transferidas para outra casa de vegetação (Figura 10), onde se manteve a irrigação por gotejamento, de 2 a 3 vezes ao dia, dependendo da demanda hídrica das plantas e a programação do local de maneira que a temperatura permanecesse o mais próximo de 25°C, sendo as temperaturas mínima de 11,8 e máxima de 32,4°C, registradas pela Estação Meteorológica da Embrapa Clima Temperado. As plantas foram mantidas nestas condições até 90 dias após o plantio quando então, efetuou-se o encharcamento dos recipientes (Figura 11), que foi feito através da imersão dos recipientes em água por 10 minutos ou até que os poros do substrato estivessem totalmente encharcados. Em seguida foi drenado o excesso de água nos sacos e partir deste momento, nos tratamentos de déficit hídrico, a irrigação foi totalmente suspensa para dar início ao experimento.



Figura 10. Instalação do experimento em parcelas subdivididas em função das condições de irrigação. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2019. (Imagem: Ester Schiavon Matoso).



Figura 11. Encharcamento dos recipientes para dar início ao experimento de estresse hídrico. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2019. (Imagem: Ester Schiavon Matoso).

A umidade do experimento foi monitorada (Figura 12) com o auxílio de um sensor de umidade de solo higrômetro com arduíno, que mede o conteúdo relativo de água no substrato ou solo (%) e também, através da pesagem dos recipientes, diariamente, sempre no mesmo horário, 8h30min da manhã.



Figura 12. A) Medida do conteúdo relativo de água no substrato com auxílio de um sensor higrômetro com arduíno. B) Pesagem dos conjuntos recipinete+planta. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2019. (Imagem: Ester Schiavon Matoso).

Com o auxílio de um analisador portátil de gases a infravermelho, IRGA (modelo LI6400XT LI-COR, Inc., Lincoln, NE, EUA), na primeira folha totalmente expandida e com lígula aparente, no terço médio do limbo foliar avaliou-se a assimilação líquida de carbono (A), a condutância estomática (gs) e a transpiração líquida (E), aos 13, 17 e 22 dias após o encharcamento das plantas (Figura 13). A primeira avaliação foi realizada quando sintomas de estresse, como enrolamento das folhas, começaram a aparecer e a última, quando todos os tratamentos mantidos em déficit hídrico apresentavam elevada queda na atividade fotossintética. As medições foram realizadas entre às 09h00min e 11h00min da manhã, com concentração de CO_2 na câmara de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$, 25°C de temperatura e uma densidade de fluxo de fótons de $500 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, usando a fonte de luz da LI-COR anexada na câmara de medição. O conteúdo foliar de clorofila total foi observado nos mesmos dias que as trocas gasosas, através do medidor eletrônico do conteúdo de clorofila ClorofiLOG, da marca FALKER, modelo CFL 1030.



Figura 13. Avaliações fisiológicas em plantas de cana-de-açúcar com o auxílio de analisador portátil de gases a infravermelho (IRGA). Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS (Imagem: Ester Schiavon Matoso).

Os parâmetros da fluorescência da clorofila de plantas adaptadas ao escuro foram medidos usando um fluorômetro de bancada (modelo PAM-2500 da Walz Heinz GmbH, Effeltrich, Alemanha), como pode se observar na figura 14A. No vigésimo primeiro dia de déficit hídrico, folhas foram mantidas no escuro por pelo menos 30 minutos, em seguida foram extraídos discos de 1 cm que foram expostos à fluorescência, induzida por um pulso de flash de saturação com $7000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As leituras foram realizadas por variedade, sendo alocados nove discos foliares em placas de petri de cada um dos tratamentos: inoculado e irrigado; controle e irrigado; inoculado e estressado; e controle estressado (Figura 14B).

A eficiência quântica máxima do FSII (F_v/F_m) foi definida como $(F_m - F_o)/F_m$, onde F_m corresponde a fluorescência máxima e F_o a fluorescência inicial. O rendimento quântico fotoquímico efetivo do FSII ($Y(II)$) foi definido como $(F_m' - F_s)/F_m'$. A dissipação fotoquímica (qP) foi definida como $1 - (F_s F_o')/(F_m' - F')$ e taxa de transporte de elétrons (ETR) definida como $\text{PAR} \cdot \text{ETRfator} \cdot \text{PPS2}/\text{PPPS}$. $Y(II)$ (BAKER, 2008).

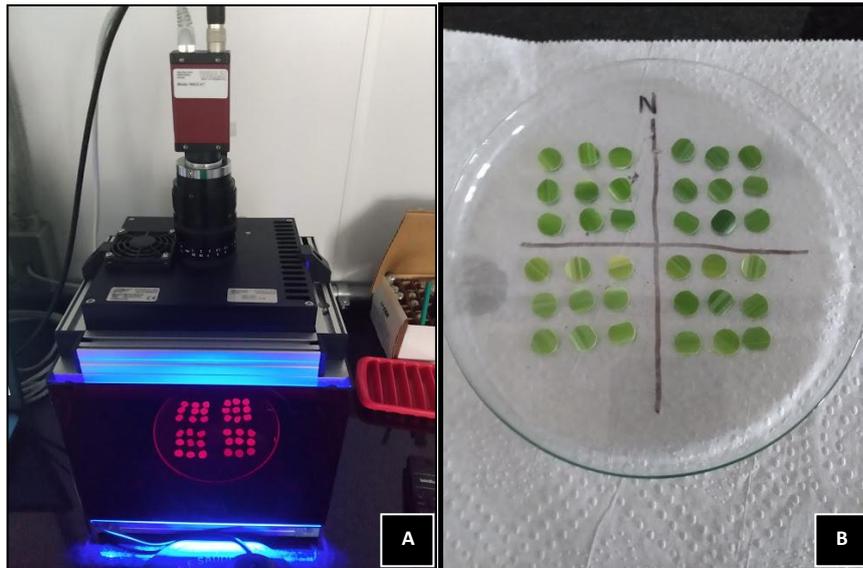


Figura 14. A) Fluorômetro de bancada (modelo PAM-2500); B) Discos de 1 cm alocados em placa de petri para avaliações no fluorômetro da clorofila.

Para a determinação do conteúdo relativo de água (CRA), foram extraídos discos foliares de 1 cm da folha +3 (SILVEIRA et al., 2003), que foram pesados imediatamente após a coleta, em balança de precisão, obtendo-se sua massa fresca (MF). Em seguida, foram dispostos em placas de Petri e imersos em água destilada, por sete horas, em temperatura ambiente sob radiação fotossinteticamente ativa de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 15A). Então, os discos foram secos em papel filtro e pesados novamente, obtendo-se a massa túrgida (MT). O material foi seco em estufa a 80°C por 48 horas e pesados novamente, para a obtenção da massa seca (MS). Por fim, o CRA foi calculado pela equação: $\text{CRA} = ((\text{MF} - \text{MS}) / (\text{MT} - \text{MS})) \times 100$.

O Potencial osmótico (Ψ_s) foi conhecido com o auxílio de um osmômetro de pressão de vapor (Vapro® 5600, Wescor, Inc., Logan, UT, USA). Amostras de folhas de cana-de-açúcar foram previamente pesadas em balança de precisão, padronizando-se o peso de 150 mg. Essas foram alocadas em tubos cônicos tipo eppendorf de 0,5 mL, onde foram maceradas com auxílio de bastão de vidro. Em seguida, adicionou-se 50 μL de água ultrapura em cada um dos tubos, que foram submetidos a um spin de 1 minuto em centrífuga sob 12.000 rpm. A seguir, todo o sobrenadante foi transferido para novos eppendorfs, repetiu-se a centrifugação e então, retirou-se 10 μL do sobrenadante para realizar a leitura da osmolaridade do tecido (Figura 15B). Os valores obtidos em milimoles por quilograma foram convertidos em potencial osmótico, por meio da equação de Van't Hoff (Souza et al., 2012) sendo, em seguida, convertidos em MPa.

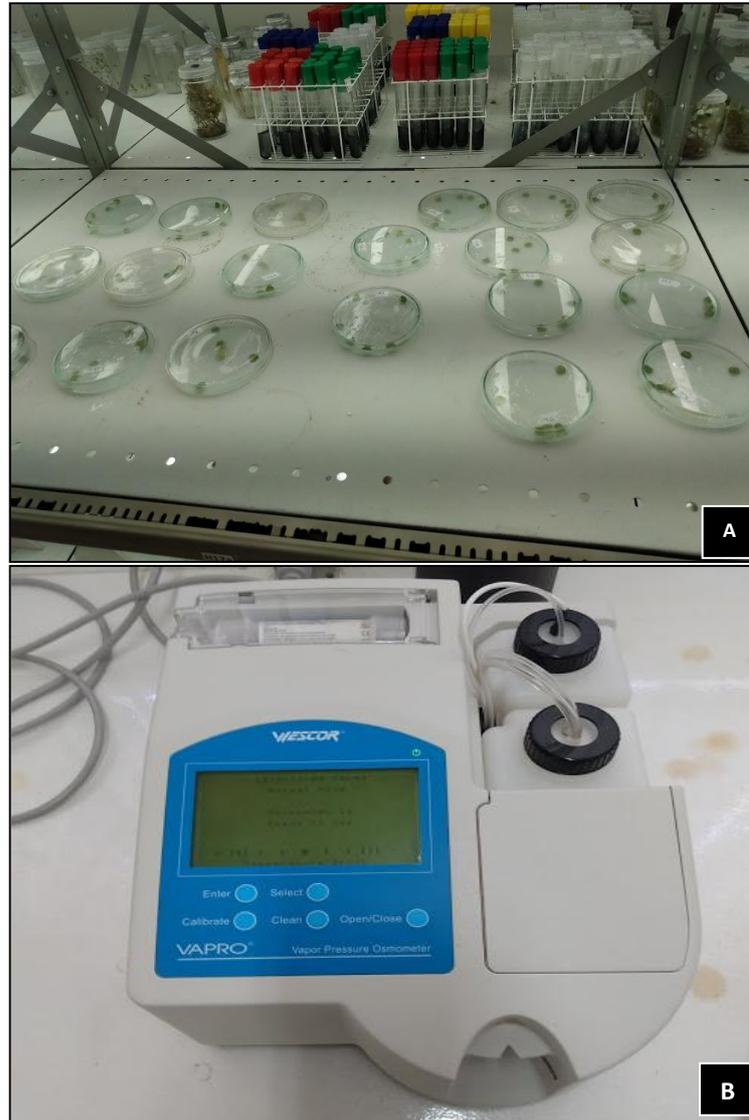


Figura 15. A) Análise do conteúdo relativo de água (CRA) nos tratamentos; B) osmômetro de pressão de vapor (modelo Vapro® 5600). Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2019. (Imagens: Ester Schiavon Matoso).

Além disso, ao final do experimento, medidas de crescimento foram realizadas nas plantas: o número de folhas verdes e de perfilhos emitidos pelas plantas foram conhecidos através da contagem dos mesmos, a altura da planta foi medida com o auxílio de uma régua graduada em centímetros e o diâmetro do colmo, em milímetros, foi medido com o auxílio de um paquímetro digital na porção intermediária. E por fim, a parte aérea das plantas foi cortada e pesada para a determinação da massa fresca, e seguida foram levadas à estufa, onde permaneceram por sete dias a 60°C para determinar a massa seca.

Experimento 4: Aplicação de bactérias endofíticas diazotróficas e adubação nitrogenada em cana-planta

O experimento foi realizado na área experimental da Embrapa Clima Temperado (Sede), em Pelotas/RS, cujas coordenadas são 31° 40' 16" S e 52° 26' 28". O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados, com quatro repetições, onde os fatores foram arranjados em um esquema fatorial 5x4, totalizando 20 tratamentos e 80 parcelas, compostas por três linhas de três metros (Vide anexo). Os tratamentos foram formados conforme a combinação das cinco variedades de cana-de-açúcar (RB867515, RB966928, RB106814, RB106818 e RB106819) com quatro condições de inoculação e adubação nitrogenada em cobertura, sendo elas: C1 - com inoculação; C2 - com adubação nitrogenada (dose recomendada); C3 - com inoculação + adubação nitrogenada e C4 - controle sem nenhum tipo de tratamento.

Antecipando o transplante das mudas para o campo, foi realizada uma adubação de correção com dose recomendada de fósforo e potássio (20 kg ha⁻¹ de N, 140 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 130 kg ha⁻¹ de K₂O) e foi efetuado o preparo do solo da área experimental para o recebimento das mudas. O transplante (Figura 16) foi realizado de forma manual, com uma ferramenta chamada saraquá, adaptada da semeadura antiga de milho.



Figura 16. Transplante de mudas de cana-de-açúcar na área experimental da Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS (Imagens: Ester Schiavon Matoso, 2018).

No decorrer do experimento, foi realizada a adubação com 80 Kg.ha⁻¹ de N em cobertura, apenas nos tratamentos em que deveria conter a mesma. Além disso, foram efetuados os devidos controles de plantas daninhas para que o cultivo da cana-de-açúcar se dê em ambiente limpo, livre de competições.

Quanto às avaliações, foram acompanhados o perfilhamento, a área foliar, e o índice de clorofila dos tratamentos, até o surgimento dos colmos, que se deu em torno dos 120 dias após o transplante. A partir deste momento foram feitas as medidas de sólidos solúveis totais (°Brix) até a colheita, onde foram realizadas avaliações de produtividade e a amostragem de material para as avaliações químico-bromatológicas. Para este fim foram analisadas as seguintes variáveis: nitrogênio acumulado, matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), holocelulose (HOL), celulose (CEL), hemicelulose (HEM), lignina (LIG), extrativos totais (ET) e cinzas (CZ).

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

O parâmetro utilizado na avaliação da maturação dos genótipos foi o teor de sólidos solúveis totais (SST), medido em °Brix com o auxílio de um refratômetro digital (Figura 17A). As avaliações de SST foram realizadas durante o período de desenvolvimento da cultura, a partir do surgimento dos colmos até a maturação. As avaliações foram realizadas em três diferentes colmos, com amostragem em um ponto do colmo, três entrenós acima do solo.

Para avaliar a produtividade foram cortadas duas touceiras em sequência, na linha central da parcela e na parte central da linha, as quais foram pesadas com auxílio de balança digital (Figura 17B). Para biomassa total foram pesadas as touceiras inteiras e aplicada a fórmula $BT = (PT \times ((100/E) \times 100)/1000)$, onde PT se refere a massa de duas touceiras inteiras com colmos e folhas (kg) e E se refere ao espaçamento (1,4 m).



Figura 17. A) Análise de sólidos solúveis totais (°Brix); B) Avaliação do peso de duas touceiras para fins de produtividade, em balança digital, Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS (Imagens: Ester Schiavon Matoso, 2019).

Durante a colheita foi realizada a amostragem de 3 colmos os quais foram triturados individualmente em um triturador de galhos e resíduos orgânicos, da marca Trapp, modelo TR 200 (Figura 18A), pesados e levados à casa de vegetação com circulação de ar forçada, para retirada do excesso de umidade, evitando que as amostras emboloracem. Em seguida, as amostras foram transferidas para estufa onde permaneceram a 60° até que estivessem totalmente secos. Uma amostragem foi realizada e amostras recém-trituradas foram pesadas, e após secagem, pesadas novamente, para determinação da massa seca (Figura 19A). O restante do material foi triturado, porém dessa vez em moinho de facas (Figura 18B), até atingir o tamanho de partícula ideal para as análises químico-bromatológicas.

Para a determinação do conteúdo de cinzas (Figura 19B), foi utilizado o procedimento de laboratório do Instituto Agrônomo (ABREU, 2007), pesou-se cerca de 10g de amostra de cada tratamento em um recipiente de porcelana, denominado cadinho, que foram levados à estufa a 110°C por 2 horas. Passado esse tempo, pesou-se a massa seca e transferiu-se os cadinhos à mufla para carbonização a 550°C. Quando essa temperatura foi atingida, a amostra foi mantida na mufla durante 1 hora, desligando o equipamento depois desse tempo. Quando a amostra atingiu temperatura ambiente, pesou-se a quantidade de cinzas obtida.



Figura 18. A) Triturador de galhos e resíduos orgânicos, modelo TR 200; B) moinho de facas. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2019. (Imagens: Ester Schiavon Matoso)

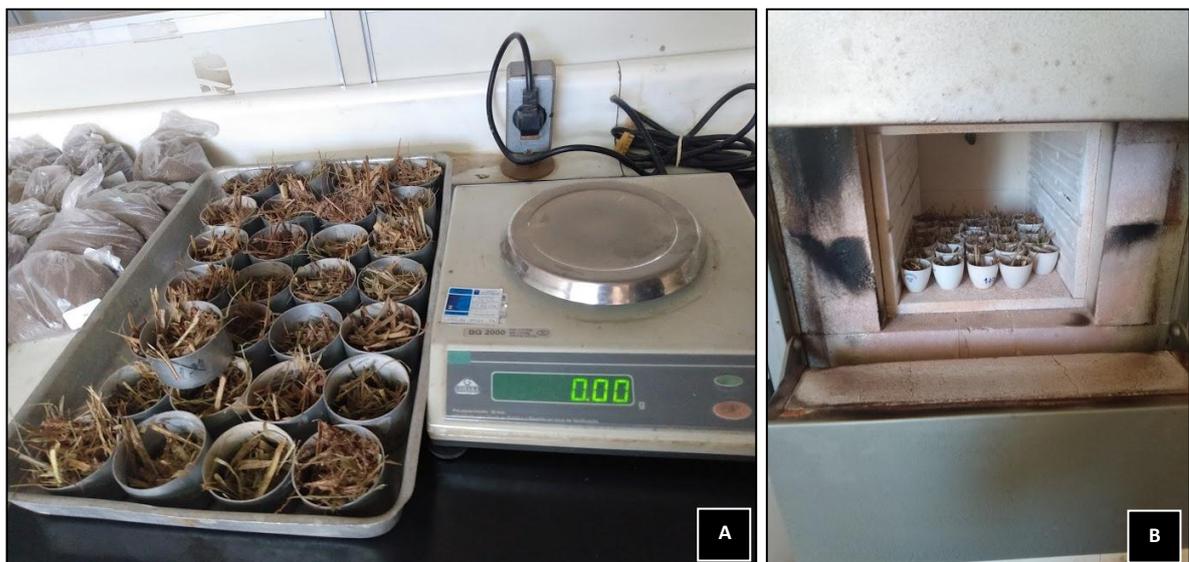


Figura 19. A) Determinação da massa seca e B) Determinação do conteúdo de cinzas em mufla a 550°C. Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2019. (Imagens: Ester Schiavon Matoso)

Para determinação de extrativos totais (ET), pesou-se uma amostra de 4,00 g em um cartucho de celulose para extração e tapou-se aproveitando parte de outro cartucho usado. Colocou-se o conjunto em um soxhlet e se adicionou ao balão 100 ml de tolueno e 50 ml de etanol. Levou-se a mistura a ebulição durante aproximadamente 6h (24 refluxos). Desmontou-se o conjunto e deixou-se evaporar parcialmente o solvente. Secou-se o cartucho em estufa a 105°C durante 24h e deixou-se em dessecador até que alcance a temperatura ambiente para então pesar o conjunto. A amostra livre de extrativos reservou-se para posterior análises. Com o

conhecimento dos valores da massa do recipiente (MR), da massa da amostra (MA), da massa do conjunto recipiente/extrativos (MRE) e da massa do conjunto recipiente/resíduo de solvente (MRRS), foi possível o cálculo da determinação do teor de extrativos (TE%) em percentagem, de acordo com a equação: $TE(\%) = ((MRE - MRRS) / MA) \times 100$.



Figura 20. Determinação de extrativos em aparelhagem de extração por Soxhlet. Laboratório de propriedades da madeira, Universidade Federal de Pelotas, 2019. (Imagens: Nidria Dias Cruz)

Para determinação de lignina de Klason, utilizou-se a norma TAPPI T 222 om-22 (2002), com modificações. Cerca de 1 g de amostra moída, sem umidade nem extrativos foi colocada em um almofariz e adicionado de 15 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m). Agitou-se por 15 minutos e deixou-se a amostra em repouso 2 horas, para ocorrer a digestão. Em seguida adicionou-se 306 mL de água destilada ao almofariz para diluir o ácido sulfúrico a 4%, transferiu-se o conteúdo para um erlenmeyer de 1.000 mL, adicionou-se o material que estava em ácido e acrescentou-se 560 ml de água destilada de modo a obter-se a porcentagem de ácido sulfúrico igual a 3%. Levou-se o conteúdo para ebulição por um período de quatro horas. Terminado o processo, filtrou-se (a vácuo) a solução em filtro (cadinho de gooch) de porosidade número 3.

Para cálculo da lignina (%) usou-se a fórmula: $((P_i / P_f) \times 100 - \text{extrativos})$, sendo P_i - Peso inicial da amostra (livre de extrativos) (g); P_f - Peso final da amostra (g).



Figura 21. Determinação de lignina insolúvel. Laboratório de propriedades da madeira, Universidade Federal de Pelotas, 2020. (Imagem: Nidria Dias Cruz)

O termo holocelulose é geralmente usado para designar os carboidratos totais presentes em uma célula vegetal. Ou seja, ela engloba os valores da celulose e dos demais carboidratos, notadamente as pentoses, denominados em conjunto como hemicelulose (TAHERZADEH; KARIMI, 2007). Dessa forma, depois de conhecidos os valores de holocelulose e de celulose dos tratamentos, pode-se, por meio do cálculo da diferença, determinar o teor de hemicelulose.

Para determinar a holocelulose, pegou-se aproximadamente 2,5 g de amostra livre de extrativos, misturou-se com 80 ml de água quente destilada e submergeu-se no banho-maria a 70°C, tapando o erlenmeyer com uma placa de petri. Com duas seringas adicionou-se 0,5 ml de ácido acético glacial e 2,6 ml de clorito de sódio a 25% a cada hora durante 6 -8h, após isso se manteve em banho-maria durante mais 12h. Filtrou-se reservando uma amostra para posterior análise, lavou-se com água quente até pH neutro e levou-se o conjunto para estufa durante 24h, pesando-o posteriormente e então, calculou-se a % de holocelulose a partir da fórmula: $HOL = ((MF / MI) * 100 - \% \text{ extrativos})$, onde MF = massa final (massa seca de holocelulose após filtragem), MI = massa inicial livre de extrativos.

Segundo a definição da norma TAPPI T 203 cm-99 (2009), a determinação da celulose foi feita a partir da pesagem $2,0 \pm 0,1$ g de holocelulose que misturou-se com 10 ml de NaOH a 17,5% em um Becker. Fez-se 3 adições a mais de 5 ml a cada 5 minutos (total adicionado de 25 ml) e deixou-se em repouso por 30 min, logo

após adicionou-se 33 ml de água destilada (agitando bem) e deixou-se repousar durante mais 1h. Filtrou-se a mistura e a seguir lavou-se com 100 ml de NaOH a 8,3% e duas vezes mais com água destilada quente. Cobriu-se a amostra com 15 ml de acético a 10% durante 3 min (neste momento parou-se o vácuo) e posteriormente lavou-se com água destilada até pH neutro. O conjunto foi pesado depois de secar durante 24h e determinou-se a % de celulose a partir da fórmula: $CEL = ((MF / MIH) \times \% \text{ holocelulose})$, onde, MF = massa final de celulose; MIH = massa inicial de holocelulose.



Figura 22. Determinação de celulose. Laboratório de propriedades da madeira, Universidade Federal de Pelotas, 2020. (Imagem: Nidria Dias Cruz)

A Fibra Detergente Neutro (FDN) corresponde à celulose, hemicelulose e lignina. É o melhor indicativo para saber o teor de fibra e também ter uma estimativa da qualidade de uma forragem. Já a Fibra Detergente Ácido (FDA) representa as frações celulose e lignina. A lignina é fração não digestível da planta, que dá resistência ao caule. Quanto maior o teor de FDA menor a qualidade e a digestibilidade da forragem.

Para a avaliação do nitrogênio acumulado, determinou-se a quantidade do nutriente através da análise do tecido vegetal, com amostra sólida em Analisador Elementar (Flash EA1112, Thermo Electron Corporation, Milan, Italy), no Laboratório de Ciência do Solo da Universidade Federal de Santa Maria. Esta técnica se baseia no método de Pregal e Dumas, onde as amostras são queimadas em um ambiente

de oxigênio puro, e os gases resultantes desta combustão são carreados por hélio de alta pureza (um gás inerte) até a zona de detecção (Carmo et al. 2000). E a proteína bruta é determinada através da multiplicação do total de nitrogênio 6,25, pois as proteínas têm em média 16% de N no aminoácido.

Os dados gerados no experimento foram submetidos à análise de pressupostos e em seguida, esses foram submetidos à análise de variância. Em caso de significância, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para análise estatística utilizou-se o software SAS versão 8.2 e em caso de síntese gráfica, essa foi realizada com o auxílio do SigmaPlot, versão 10.0.

4. Artigo 1

Aplicação de uma mistura de cinco diazotróficos no cultivo de cana-de-açúcar no sul do Brasil

(Segundo norma da Revista Brasileira de Ciências Agrárias)

Aceito em inglês e previsto para publicação no v.15, n.4, dezembro de 2020

1 **Aplicação de uma mistura de cinco diazotróficos no cultivo de cana-de-açúcar no**
2 **sul do Brasil**

3 **Resumo**

4 A produção de cana-de-açúcar no Brasil para a safra 2019/20 é estimada em
5 aproximadamente 615 milhões de toneladas. No entanto, no estado do Rio Grande do
6 Sul, estima-se em apenas 42,5 mil toneladas. Contudo, acredita-se que o uso de
7 bactérias diazotróficas possa contribuir para a expansão do cultivo da cana no estado,
8 através do aumento da produtividade, portanto, este estudo teve como objetivo avaliar
9 os efeitos dos diazotróficos no cultivo de cana-de-açúcar. Utilizou-se as variedades de
10 cana-de-açúcar: RB867515, RB92579, RB966928 e RB975932, que foram tratadas com
11 bactérias diazotróficas ou deixadas como controle. A aplicação de bactérias
12 diazotróficas resultou em aumento da área foliar e número de colmos na variedade
13 RB867515 (ciclo de cultivo da cana) e aumento no teor relativo de clorofila de todas as
14 variedades de cana-de-açúcar, exceto RB92579. Além disso, a maioria das variedades
15 respondeu positivamente em termos de biomassa, matéria seca, nitrogênio total e
16 sólidos solúveis. Esses resultados sugerem que a aplicação de bactérias diazotróficas
17 auxilia no crescimento e desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar cultivadas
18 no Rio Grande do Sul.

19 **Palavras-chave:** *Saccharum* spp.; fixação biológica de nitrogênio; crescimento; sólidos solúveis
20 totais.

21 **Application of a mixture of five diazotrophs on sugarcane cultivated in the south of**
22 **Brazil**

23 **Abstract**

24 The sugarcane production in Brazil for the 2019/20 harvest is estimated at
25 approximately 615 million tons. However, in the state of Rio Grande do Sul it is
26 estimated at only 42.5 thousand tons. It is believed that the use of diazotrophic bacteria

27 can contribute to the expansion of sugarcane cultivation in the state, through increased
28 productivity, so, this study aimed to evaluate the effects of diazotrophs on the
29 sugarcane grown. The study was conducted using sugarcane varieties: RB867515,
30 RB92579, RB966928 and RB975932, that were either treated with diazotrophic bacteria
31 or left as a control. The application of diazotrophic bacteria resulted in increased leaf
32 area and stem number in variety RB867515 (cane plant cultivation cycle), and an
33 increase in the relative chlorophyll content of all varieties of sugarcane except
34 RB92579. Furthermore, most varieties responded positively in terms of biomass, dry
35 matter, total nitrogen and soluble solids. These results suggest that the application of
36 diazotrophs assists in the growth and development of sugarcane varieties grown in Rio
37 Grande do Sul.

38 **Keywords:** *Saccharum* spp.; biological nitrogen fixation; yield; total soluble solids.

39

40

INTRODUÇÃO

41 A produção de cana-de-açúcar no Brasil para a safra 2019/20 está estimada em
42 aproximadamente 615 milhões de toneladas, com uma área colhida de 8 milhões de
43 hectares. O Rio Grande do Sul aparece em último lugar no ranking nacional, com uma
44 área cultivada de apenas 22 mil hectares, produtividade média de 45 ton ha⁻¹ e produção
45 esperada, na ordem de 42,5 mil toneladas (CONAB, 2019). Entretanto, o estado
46 apresenta uma vasta área de aptidão ao cultivo, descrita por Manzatto; Baca; Pereira
47 (2010) no zoneamento agroclimático. Além disso, a cana-de-açúcar está entre as sete
48 principais culturas de valor econômico depois dos grãos soja, arroz, milho e trigo,
49 contribuindo em aproximadamente 70 milhões de reais para a economia do Rio Grande
50 do Sul (Silva et al., 2016).

51 A baixa produtividade de cana-de-açúcar no RS se dá pelo uso de variedades
52 antigas que geralmente apresentam baixo rendimento e pouca adaptação às condições
53 ambientais. Neste sentido, tem sido desenvolvidos estudos que visam o aumento da
54 produtividade, sendo eles no âmbito da utilização de cultivares adaptadas às diferentes

55 condições de clima e solo (Antunes et al., 2017) e uso de bactérias diazotróficas
56 promotoras de crescimento vegetal (Oliveira et al., 2006; Schultz et al., 2014).

57 Bactérias diazotróficas endofíticas habitam o interior das plantas de cana-de-açúcar
58 e auxiliam na obtenção de nutrientes, através da fixação biológica de nitrogênio,
59 produção de fitohormônios que modificam a arquitetura radicular, assimilação de CO₂ e
60 número de folhas (Fischer et al., 2012). Além disso, atuam em outros processos como a
61 solubilização de fosfatos e zinco (Estrada et al., 2013), produção de auxinas, giberilinas
62 e citocininas (Lin et al., 2012) e proteção contra patógenos, que resultam no aumento do
63 crescimento e da produtividade (Pedula et al., 2016; Schultz et al., 2017).

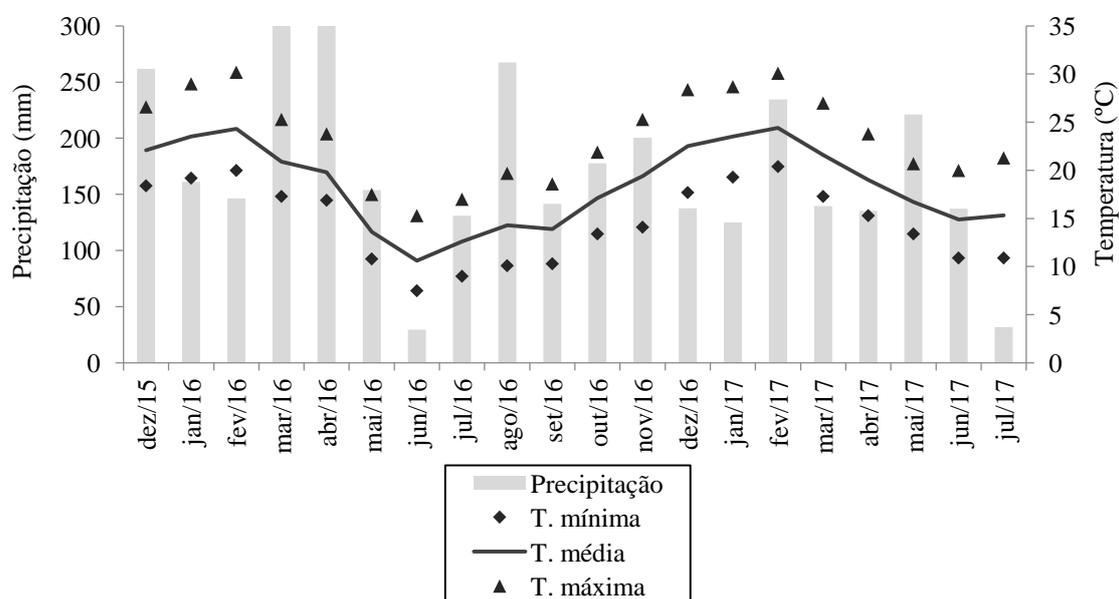
64 A aplicação de bactérias apresenta variabilidade oriunda do solo, da variedade
65 estudada e das estirpes aplicadas (Oliveira et al., 2006). O inoculante utilizado no
66 trabalho contendo um pool de cinco estirpes vem apresentando benefícios à cana-de-
67 açúcar, como aumento na produtividade (Schultz et al., 2017), no entanto, pouco se sabe
68 sobre o cultivo de cana-de-açúcar inoculada no Rio Grande do Sul. Acredita-se que o
69 uso de bactérias diazotróficas pode contribuir para a expansão da cultura no estado,
70 através do aumento da produtividade. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar
71 os efeitos da aplicação de um mix de bactérias diazotróficas no crescimento, maturação
72 e produtividade de quatro variedades de cana-de-açúcar cultivadas no estado do Rio
73 Grande do Sul.

74 MATERIAL E MÉTODOS

75 Caracterização do local e preparo da área experimental

76 O estudo foi desenvolvido de novembro de 2015 a julho de 2017, em uma propriedade
77 rural no Monte Bonito, 9º distrito do município de Pelotas, localizada em latitude
78 52°22'10" Oeste e 32°41'08" Sul e altitude de 50 m. O clima na região é quente e
79 temperado, classificado como Cfa. A temperatura média é 18 °C e existe uma
80 pluviosidade significativa ao longo do ano, sendo a média anual de pluviosidade de
81 1378 mm (Fig 1). O solo é caracterizado como Argissolo Bruno-acinzentado Distrófico,
82 o preparo da área experimental foi feito através de aração, gradagem e calagem do solo
83 com 4,8 Mg ha⁻¹ de calcário dolomítico (PRNT 100%) e também foram adicionados
84 210 Kg ha⁻¹ de superfosfato triplo e 120 Kg ha⁻¹ de cloreto de potássio. A fertilização
85 foi feita de acordo com as recomendações oficiais de adubação e de calagem adotadas
86 nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (COMISSÃO DE QUÍMICA E
87 FERTILIDADE DO SOLO RS/SC, 2004) e baseando-se na análise química de solo,
88 realizada em amostragem retirada de profundidade 0-20 cm, com os seguintes

89 resultados: pH (H₂O) 5,5; Índice SMP 5,7, 0,4 cmolc dm⁻³ Al; 1,4 cmolc dm⁻³ Ca; 0,7
 90 cmolc dm⁻³ Mg; 70 mg dm⁻³ K e 2,9 mg dm⁻³ de P.



91

Fig 1. Dados de precipitação (mm) e temperaturas mínimas, médias e máximas (°C) no período de dezembro de 2015 até julho de 2017, fornecidos pela Estação Meteorológica da Embrapa Clima Temperado

92

93 **Instalação e condução do experimento**

94 O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com quatro
 95 repetições e adotou-se o esquema bifatorial 4 x 2, ao utilizar quatro variedades de cana-
 96 de-açúcar (RB867515; RB92579; RB966928; e RB975932), com e sem inoculação de
 97 bactérias diazotróficas, o que totalizou oito tratamentos.

98 A propagação da cana-de-açúcar foi feita por meio do transplante de mudas pré-
 99 brotadas produzidas na Embrapa Clima Temperado, a partir de toletes de uma gema,
 100 também conhecidos como minitoletes, previamente tratados por termoterapia a 52°C por
 101 30 minutos e fungicida de ação sistêmica a base de piraclostrobina, através de uma
 102 solução contendo 50 mL do produto em 50 L de água, onde ficaram imersos durante 3
 103 min (Santos et al., 2019). Os minitoletes foram inoculados com um pool de bactérias
 104 diazotróficas contendo as estirpes: *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe
 105 BR11281T = PAL-5T (Cavalcante e Döbereiner, 1988); *Herbaspirillum seropedicae* -
 106 BR11335 = HRC54 (Baldani et al., 1986); *Herbaspirillum rubrisubalbicans* - BR11504
 107 = HCC103 (Baldani et al., 1996); *Paraburkholderia tropica* - BR11366T = PPe8T (Reis

108 et al., 2004) e recentemente reclassificado por Oren e Garrity (2015) e *Nitrospirillum*
109 *amazonense* BR11145 = CBAMc (Magalhães et al., 1983) e reclassificado por Lin et al.
110 (2014). Essas bactérias foram previamente testadas e selecionadas por Oliveira et al.
111 (2006, 2002) e foram fornecidas pela Coleção de Bactérias Diazotróficas da Embrapa
112 Agrobiologia - CBR Johanna Döbereiner. Cada estirpe foi crescida separadamente em
113 meio DYGS (Baldani et al., 2014) a 175 rpm por 24-48 hs dependendo da estirpe e
114 veiculada em turfa moída, neutralizada (pH 6,0) e esterilizada por autoclavagem (121
115 °C, 20 min, 2 vezes) na proporção de 70 mL de suspensão celular em 250 g de turfa. Os
116 inoculantes turfosos foram diluídos na proporção de 250 g / 50 L de água. Os
117 minitoletes foram imersos na solução por 30 min (Reis et al., 2009), após inoculação
118 foram plantados em tubetes de 290 cm³ contendo substrato da marca Turfa Fértil® e
119 foram mantidos por cerca de 30 dias em casa de vegetação climatizada para brotação e
120 crescimento das mudas. Após este período as mudas foram transferidas para tela de
121 sombreamento 35%, para que ocorresse a primeira fase da aclimação, em seguida
122 foram deixadas a céu aberto para finalizar a aclimação em pleno sol, num total de 15
123 dias, e então, foram levadas para o campo.

124 O plantio das mudas foi realizado de forma manual, com o auxílio de um
125 saraquá, onde cada parcela foi representada por três linhas de três metros. Cada uma das
126 linhas possuía seis plantas, com espaçamento de 0,5 m entre plantas e 1,4 m entre
127 linhas, sendo a área útil da parcela representada pela linha central. Aos 90 dias após o
128 transplante realizou-se a adubação de cobertura da cana-planta com 20 kg ha⁻¹ de N e
129 aos 30 dias após o primeiro corte foi adicionado 150 Kg ha⁻¹ de superfosfato triplo, 135
130 Kg ha⁻¹ de cloreto de potássio e 100 Kg ha⁻¹ de ureia para fins de fertilização da cana-
131 soca. O manejo de plantas daninhas na área experimental foi feito através da passagem
132 de enxada rotativa entre as linhas de plantio, capinas nas linhas e aplicações de 400 mL
133 ha⁻¹ de herbicida seletivo e pós-emergente a base de Mesotriona. A primeira colheita foi
134 realizada em setembro de 2016 e a segunda colheita, em julho de 2017.

135

136 **Parâmetros de avaliação e análise estatística**

137 Aos 120 dias após o transplante das mudas para o campo no ciclo de cana-planta e após
138 o rebrote da soqueira em cana-soca, foi estimada a área foliar a partir do número de
139 folhas e medidas de comprimento e largura das folhas de um perfilho. Os valores foram
140 inseridos na equação descrita por Hermann e Câmara (1999), onde $AF = [C \times L \times 0,75 \times$
141 $(NF + 2)]$. A fórmula leva em consideração o comprimento (C) e a largura (L) das

142 folhas +3 e o número de folhas abertas com pelo menos 20% de área verde na planta
143 (NF). E então, através da relação entre a área foliar e a área de solo ocupada pela planta,
144 foi conhecido o índice de área foliar (IAF).

145 O índice relativo de clorofila foi observado na porção intermediária das folhas
146 +3, através do medidor de clorofila ClorofiLOG, da marca FALKER, modelo CFL
147 1030. Esse equipamento usa três faixas de frequência de luz, permitindo uma análise
148 detalhada que pode ser visualizada instantaneamente ou armazenada no computador. A
149 medição ótica analisa a absorção de luz pela folha, indicando a presença de clorofila em
150 valores SPAD (Soil Plant Analysis Development).

151 No momento da colheita foi determinado o número de colmos e foram pesadas
152 duas touceiras por parcela, a fim de estimar a partir do peso de cana por metro linear, a
153 produção de biomassa da parte aérea total por hectare. Para determinação da massa
154 seca, amostras de folhas e colmos foram trituradas individualmente em um triturador de
155 galhos e resíduos orgânicos, da marca Trapp, modelo TR 200, depois pesadas e levadas
156 à estufa, onde permaneceram a 60° por volta de sete dias e depois pesadas novamente
157 para obtenção do peso seco. E o nitrogênio total (g) foi avaliado a partir de amostras
158 sólidas de 2 mm de tecido vegetal em Analisador Elementar Perkin-Elmer (padrão
159 mundial). Além disso, em cana-soca, como houve um melhor desenvolvimento de
160 colmos, se pode observar na colheita, o teor de sólidos solúveis totais (°Brix), e
161 também, com a retirada do ponteiro contendo as folhas, foi possível estimar a
162 produtividade de colmos (Mg ha⁻¹) e de açúcar (Mg brix ha⁻¹).

163 A análise estatística foi desenvolvida com o auxílio do programa SAS 8.2 e a
164 síntese gráfica foi realizada no SigmaPlot 10.0. Os dados obtidos foram analisados
165 quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, à homocedasticidade pelo teste de
166 Hartley e a independência dos resíduos foi verificada graficamente. Posteriormente, os
167 dados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0.05$) e em caso de significância
168 estatística, compararam-se os efeitos das variedades pelo teste de Tukey e da inoculação
169 pelo teste t.

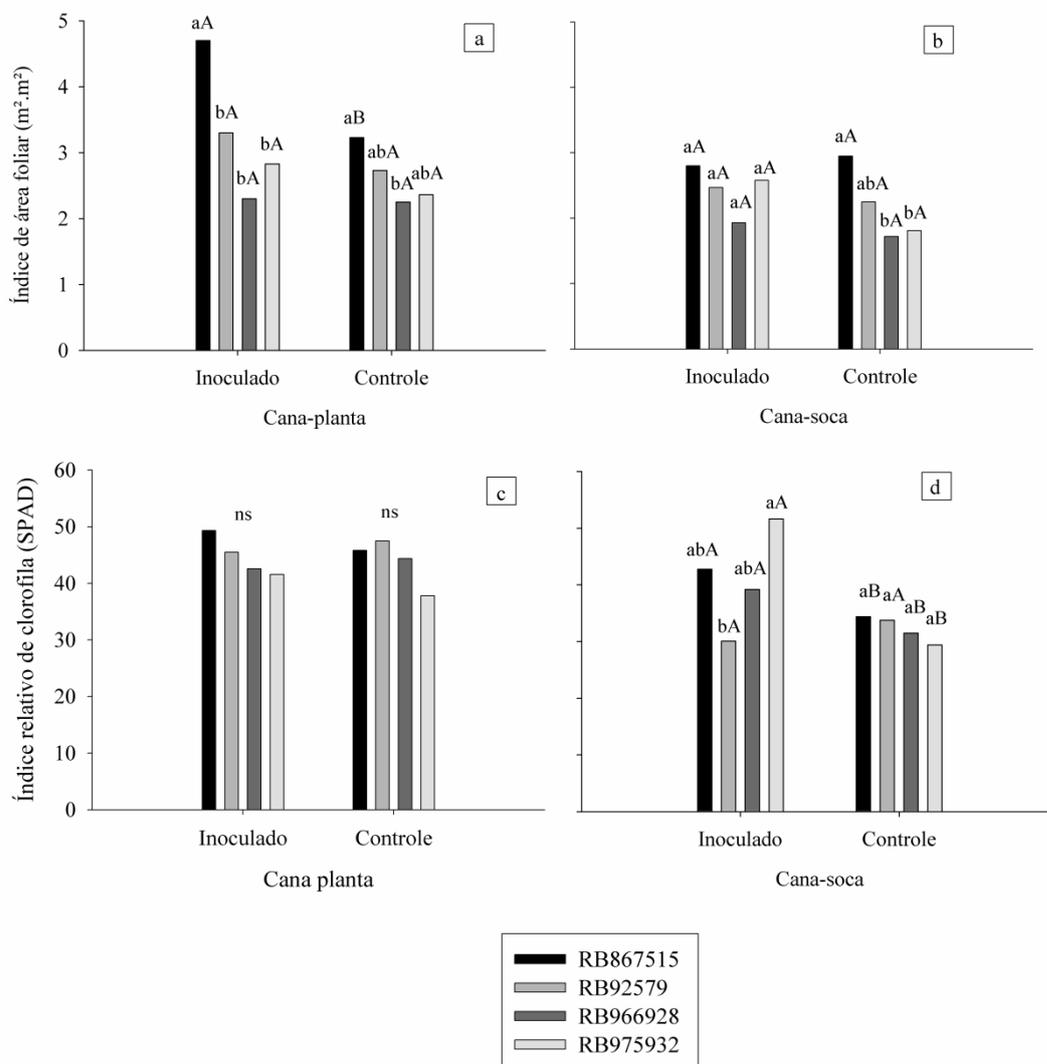
170

RESULTADOS

171 Com a aplicação do teste F na análise da variância, identificou-se a significância da
172 interação bifatorial (variedades x inoculação) para todos os parâmetros de avaliação, nos
173 dois ciclos produtivos. Assim, os efeitos isolados dos fatores foram desconsiderados e
174 analisaram-se detalhadamente as interações (Figuras 2, 3, 4 e 5).

175 Em cana-planta o maior índice de área foliar (Fig. 2a) foi apresentado pela
 176 variedade RB867515 no tratamento inoculado e também no controle, onde não diferiu
 177 da RB975932. Além disso, esta variedade foi a única que teve aumento no IAF quando
 178 inoculada com bactérias diazotróficas. No entanto, em cana-soca (Fig. 2b) as diferenças
 179 entre as variedades foram observadas apenas no controle, onde o IAF foi superior nas
 180 variedades RB867515 e RB966928.

181 O índice SPAD, que reflete teores relativos de clorofila, foi semelhante em todos
 182 os tratamentos de cana-planta, variando de 37.8 até 49.3 (Fig. 2c) e em cana-soca foi
 183 superior nas variedades RB966928, RB867515 e RB975932 nos tratamentos
 184 inoculados, com valores de 49,2, 44,7 e 42,76 respectivamente (Fig. 2d).



185

Fig 2. Área foliar (a e b) e índice relativo de clorofila (c e d) de quatro variedades de cana de açúcar inoculada ou não com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas em dois ciclos de cultivo (cana-planta e cana-soca). ns não-significativo e barras seguidas pela mesma letra maiúscula e mesma letra

minúscula, não diferem entre si, comparando a inoculação dentro de cada variedade pelo teste t, e a variedade dentro da inoculação pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

186 Os tratamentos inoculados apresentaram maior conteúdo de massa seca que o
 187 controle nas variedades RB867515 e RB975932 nos dois anos de avaliação e na
 188 RB966928 apenas no cultivo de cana-soca (Fig. 3a e 3b). Já para o acúmulo de
 189 nitrogênio (Fig. 3c e 3d), a inoculação promoveu aumento em todas as variedades, nos
 190 dois ciclos de cultivo, com exceção da RB966928 em cana-planta.
 191

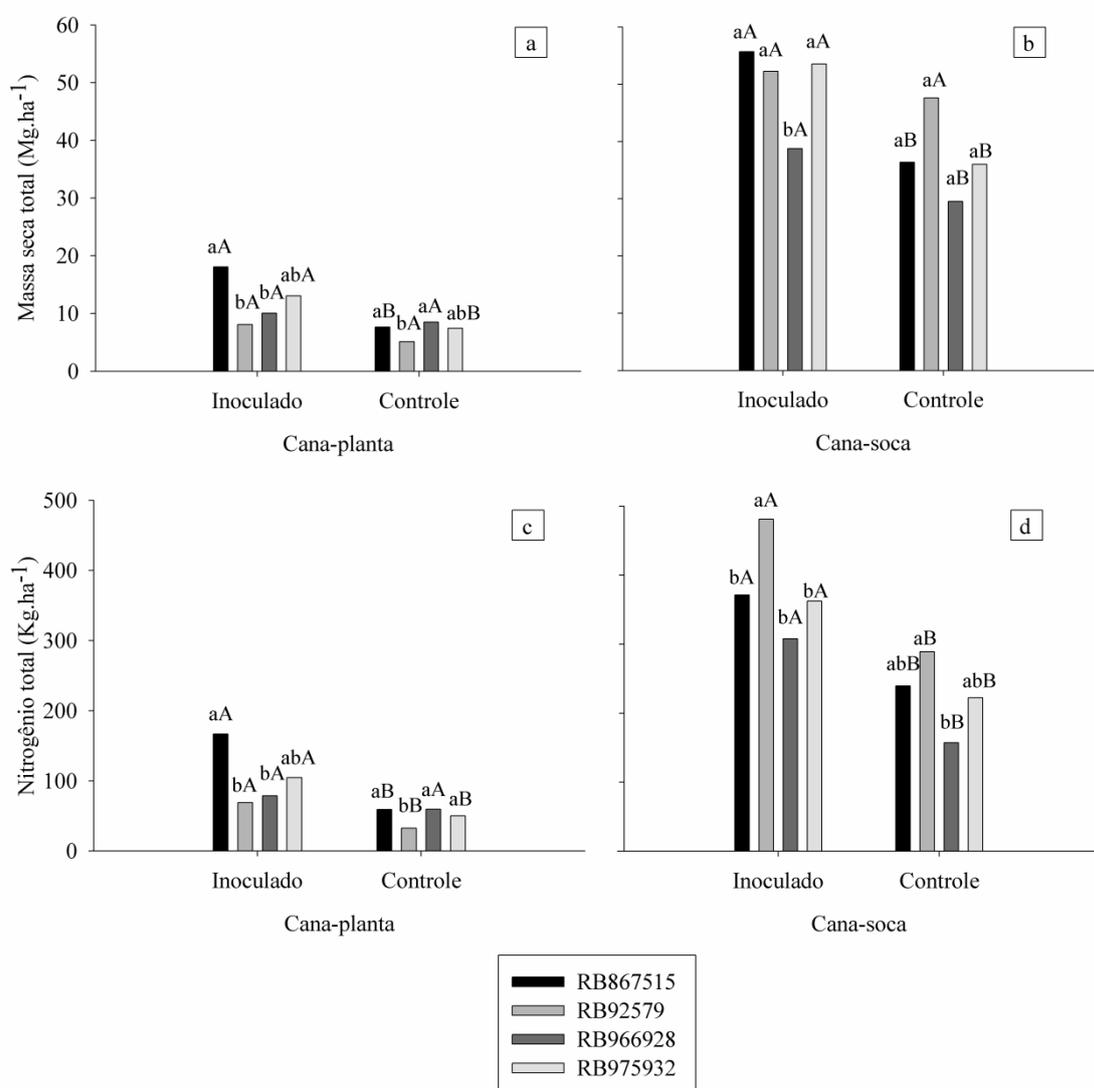
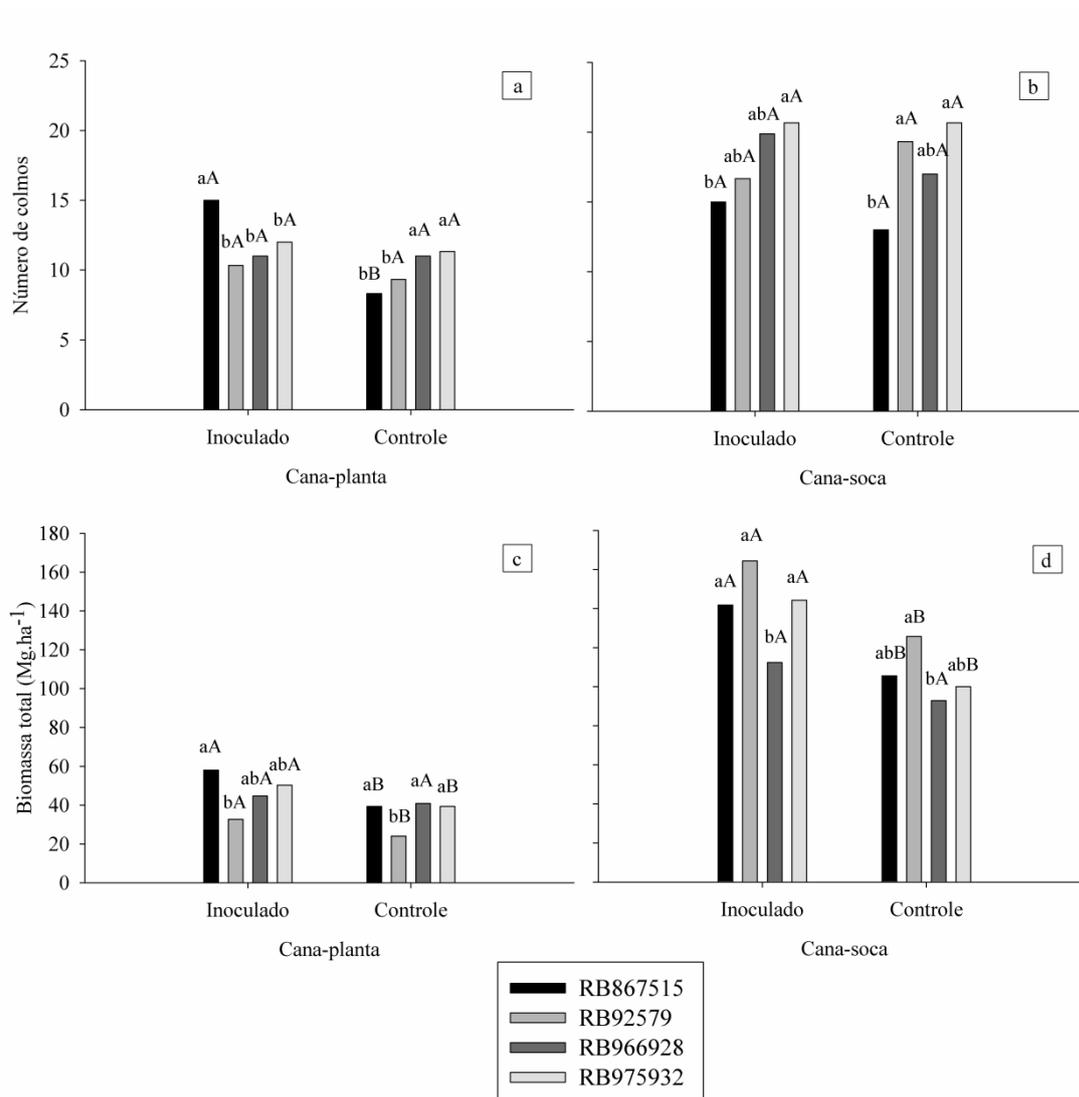


Fig 3. Massa seca (a e b) e nitrogênio total (c e d) de quatro variedades de cana-de-açúcar inoculada ou não com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas em dois ciclos de cultivo (cana-planta e cana-soca). Barras seguidas pela mesma letra maiúscula e mesma letra minúscula, não diferem entre si,

comparando a inoculação dentro de cada variedade pelo teste t, e a variedade dentro da inoculação pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

193 O número de colmos, como pode se observar na Fig. 4 (a e b), sofreu pouca
194 influencia da inoculação de bactérias diazotróficas, sendo que a única variedade que
195 apresentou aumento neste parâmetro foi a RB867515 no ciclo de cana-planta, onde o
196 número de colmos superior às demais variedades. No entanto, em cana-soca, os maiores
197 resultados foram apresentados pelas variedades RB92579 e RB975932, que não
198 diferenciaram da RB966928. Em contrapartida, a inoculação proporcionou um aumento
199 na biomassa total (Fig. 3c e 3d) das variedades RB867515, RB92579 e RB975932, tanto
200 em cana-planta, quanto em cana-soca.

201 Entretanto, o teor de sólidos solúveis totais (°Brix) e a produtividade de açúcar,
202 estimada em Mg ha⁻¹, foram influenciados pela inoculação de bactérias endofíticas
203 diazotróficas, em todas as variedades (Fig. 5a e 5c). Já para a produtividade de colmos
204 (Fig. 5b), apenas a variedade RB867515 respondeu à inoculação. Entre as variedades, a
205 RB966928 apresentou o maior °Brix, independente do tratamento de inoculação e a
206 produtividade de colmos foi superior na variedade RB867515 inoculada e na RB92579
207 no controle, resultando numa maior produtividade de açúcar também nestes dois
208 tratamentos.



209

Fig 47. Número de colmos (a e b) e biomassa total (c e d) de quatro variedades de cana-de-açúcar inoculada ou não com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas em dois ciclos de cultivo (cana-planta e cana-soca). Barras seguidas pela mesma letra maiúscula e mesma letra minúscula, não diferem entre si, comparando a inoculação dentro de cada variedade pelo teste t, e a variedade dentro da inoculação pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

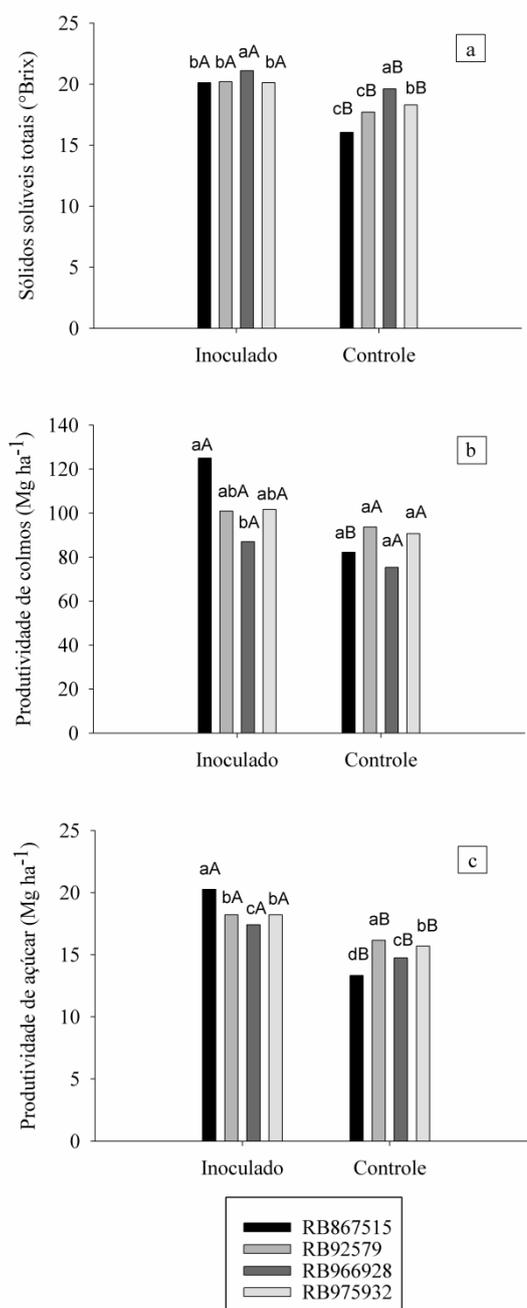


Fig 5. Sólidos solúveis totais (a), produtividade de colmos (b) e produtividade de açúcar (c) de quatro variedades de cana-de-açúcar inoculada ou não com mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas no ciclo de cana-soca. Barras seguidas pela mesma letra maiúscula e mesma letra minúscula, não diferem entre si, comparando a inoculação dentro de cada variedade pelo teste t, e a variedade dentro da inoculação pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

210

DISCUSSÃO

211

O estudo da área foliar em variedades de cana-de-açúcar permite correlacioná-la

212

com seu potencial produtivo, seja nas taxas de crescimento, produção de colmos, massa

213

seca ou quantidade de açúcar. A folha é a estrutura responsável por produzir a maioria

214 dos carboidratos essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas através da
215 fotossíntese, de modo que o rendimento das culturas será maior quanto mais rápido a
216 planta atingir a área máxima da folha e quanto mais tempo a área da folha permanecer
217 ativa. Assim, a inoculação com bactérias diazotróficas desempenha um papel importante
218 devido à fixação biológica de nitrogênio, que atua no alongamento foliar das plantas e,
219 conseqüentemente, no aumento da taxa fotossintética (Schultz et al., 2017).

220 O índice ótimo de área foliar não é necessariamente o índice mais alto registrado,
221 mas aquele em que as folhas fotossinteticamente ativas são mantidas um pouco acima
222 do ponto de compensação. Segundo Machado et al. (1982), para cana-de-açúcar, o IAF
223 próximo a 4,0 é suficiente para interceptar 95% da radiação solar incidente, no entanto,
224 no presente estudo, foram registrados valores de 1,7 a 4,7, como pode ser visto nas
225 Figuras 2a e 2b, o que é comum ocorrer devido a diferenças entre as variedades de cana
226 (Santos, 2018).

227 O teor de clorofila está relacionado à maior produção de massa seca e é
228 proporcional à quantidade de nitrogênio absorvida pela planta (Martuscello et al., 2009).
229 Isso pode ser observado nas plantas inoculadas das variedades RB867515, RB966928 e
230 RB975932 que apresentaram valores de clorofila superiores ao controle sem inoculação
231 no ciclo da cana-de-soca (Fig. 2d) e foram proporcionais ao aumento de massa seca e
232 nitrogênio nestes mesmos tratamentos (Fig. 3b e 3d). No entanto, um aumento no teor
233 de N foi observado no RB92579, embora não houvesse diferenças na clorofila em
234 relação ao controle. Esse aumento também foi observado por outros autores que usaram
235 a mesma mistura de bactérias diazotróficas na variedade RB92579 (Pedula et al., 2016).

236 A emissão de caules nas plantas da família Poaceae é denominada perfilhamento,
237 que começa cerca de 40 dias após o plantio e pode durar até 120 dias. Este é um
238 processo fisiológico de ramificação subterrânea contínua das articulações nodais
239 compactadas para a parte aérea primária, o que fornece ao cultivo o número de colmos
240 necessários para uma boa produção (Diola & Santos, 2010).

241 Em geral, todos os tratamentos em cana-de-soca apresentaram melhor desempenho
242 na formação de colmos e produção de biomassa (Fig. 4), provavelmente devido à época
243 em que o perfilhamento e o desenvolvimento ocorreram em cada um dos anos de
244 crescimento. O maior desenvolvimento de cana-de-açúcar no Rio Grande do Sul ocorre
245 nos primeiros meses do ano, principalmente devido às condições ótimas de temperatura
246 e luz no período, considerando que é uma planta com metabolismo C4, altamente

247 eficiente na conversão de energia luminosa em energia na química através do processo
248 fotossintético (Kluge et al., 2015). Os dados mensais das temperaturas mínimas, médias
249 e máximas, bem como da precipitação, durante a condução do experimento, nas safras
250 2015/2016 e 2016/2017 (Fig. 1) confirmam a ocorrência de altas temperaturas e isso
251 explica o desempenho observado em cana-de-soca. Entretanto, em cana-planta, esse
252 período coincidiu com a fase de perfilhamento, atrasando o crescimento e
253 desenvolvimento dos colmos e, conseqüentemente, a produção de biomassa.

254 Além disso, fatores genéticos e produção de auxinas também influenciam o
255 perfilhamento, portanto, a inoculação com bactérias amplamente reconhecidas como
256 produtoras de substâncias promotoras de crescimento (Cassán et al., 2014) combinadas
257 com fatores intrínsecos das variedades, estão intimamente ligadas à emissão de colmos
258 e produção de biomassa de cana-de-açúcar.

259 Vários fatores podem afetar a produtividade da cana e a sua qualidade tecnológica,
260 como genéticos, climáticos e de manejo da cultura (Thomé et al., 2018). A inoculação
261 bacteriana promoveu aumentos no °Brix, bem como a antecipação da maturação das
262 plantas de cana-de-açúcar, incluindo materiais conhecidos médio-tardios, como
263 RB867515 e RB92579, que no tratamento controle não estavam maduros para a
264 colheita. A variedade RB966928 não respondeu à inoculação, apresentando valores
265 altos e semelhantes nos dois tratamentos, pois é característico dessa variedade ter um
266 comportamento de maturação precoce.

267 Esses resultados são bastante promissores, principalmente considerando que os
268 genótipos RB867515, RB92579 e RB966928 estão entre os genótipos mais cultivados
269 no Brasil. Ainda assim, são necessários mais estudos sobre a qualidade da cana-de-
270 açúcar para confirmar se esses aumentos nos sólidos solúveis totais com a inoculação de
271 bactérias endofíticas diazotróficas são relativos ao teor de sacarose. O acúmulo máximo
272 de sacarose ocorre apenas quando a planta encontra alguma restrição para o seu
273 crescimento (Cultivar, 2015), o que também ocorreria em tratamentos não inoculados,
274 portanto, essa antecipação da maturação da cana mostra que o conhecimento sobre o
275 potencial de bactérias diazotróficas na cana ainda é escasso.

276 CONCLUSÃO

277 A aplicação de uma mistura de cinco espécies de bactérias diazotróficas auxilia no
278 crescimento e desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Rio
279 Grande do Sul, resultando no aumento da produtividade, incremento de massa seca,

280 acúmulo de nitrogênio e antecipação da maturação, o que é promissor para expansão da
281 cultura no estado.

282 **AGRADECIMENTOS**

283 Os autores gostariam de agradecer à Universidade Federal de Pelotas e à
284 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas
285 dos alunos. Além disso, grande consideração é dada à Embrapa Clima Temperado pela
286 disponibilidade de espaço e equipamentos para o desenvolvimento do trabalho e à
287 Embrapa Agrobiologia, pelo fornecimento das bactérias diazotróficas utilizadas na
288 pesquisa.

289 **REFERÊNCIAS**

290 Antunes, W.R.; Schöffel, E. R.; Silva, S. D. A.; Härter, A.; Campos, A. D. S.; C.R.S.
291 Montero, C. R. S. Productive performance of early sugarcane genotypes in Rio Grande
292 do Sul state, Revista Scientia Agraria. v.18, n.2, p.136-142, 2017.
293 <http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v18i2.50533>

294

295 Baldani, I., Videira, S., Reis, V. M., Boddey, L. H. The art of isolating nitrogen-fixing
296 bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide
297 for microbiologists. Plant and Soil. v.384, n.1-2, p.413-431, 2014.
298 <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2186-6>.

299

300 Cassán, F., J. Anderleyden and S. Spaepen. Physiological and agronomical aspects of
301 phytohormone production by model plant-bacterias-promoting rhizobacteria (PGPR)
302 belonging to the genus Azospirillum. Journal Plant Growth Regulation. V.33, n.2,
303 p.440-459, 2014.<https://doi.org/10.1007/s00344-013-9362-4>.

304

305 Comissão de química e fertilidade do solo RS/SC. (2004). Manual de adubação e
306 calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. 10 ed., Sociedade
307 Brasileira de Ciência do Solo, Porto Alegre, 400p.

308

309 CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento, 2019. Acompanhamento da safra
310 brasileira de cana-de-açúcar, v.6 - Safra 2019/20, n.1 - Primeiro levantamento, maio de
311 2019. <https://www.conab.gov.br>. 20 out. 2019.

312

313 Diola, V.; F. Santos. 2010. Fisiologia. In: Santos, F., Borém, A., Caldas, C. (Eds.),
314 Cana-de-açúcar: Bioenergia, açúcar e álcool: Tecnologias e perspectivas. Viçosa, 257p.

315

316 Estrada, G.A., V.L.D. Baldani, D.M. Oliveira, S. Urquiaga and J.I. Baldani. Selection of
317 phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their
318 effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant and Soil*. v.369, n.1-2, p.115-129,
319 2013. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1550-7>.

320

321 Fischer, D., B. Pfitzner, M. Schmid, J.L. Simões-Araújo, V.M. Reis, W. Pereira, E.
322 Ormeñoorrillo, B. Hai, A. Hofmann, M. Schloter, E. Martinez-Romero, J.I. Baldani and
323 A. Hartmann. Molecular characterization of the diazotrophic bacterial community in
324 uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). *Plant and Soil*.
325 v.356, n.1-2, p.83-99, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0812-0>.

326

327 Hermann, E. R.; Câmara, G. M. S. Um método simples para estimar a área foliar de
328 cana-de-açúcar. *STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos*, Piracicaba, v.17, n. 1, p. 32-34,
329 1999.

330

331 Kluge, R. A.; Tezotto-Uliana, J. V.; da Silva, P. P. M. Aspectos Fisiológicos e
332 Ambientais da Fotossíntese. *Revista Virtual de Química*, 2015, v.7, n. 1, p.56-73.

333

334 Lin, L.; Li, Z.; Hu, C.; Zhang, X.; Chang, S.; Yang, L.; Li, Y.; An, Q. Plant
335 growthpromoting nitrogen-fixing enterobacteria are in association with sugarcane
336 growing in Guangxi, China. *Microbes and Environments*, v.27, n.4, p.391–398, 2012.
337 <https://doi.org/10.1264/jsme2.me11275>.

338

339 Machado, E.C., A.R. Pereira, J.I. Fahl, H.V. Arruda and J. Cione. Índices biométricos
340 de duas variedades de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 1982. v.17,
341 p.1323-1329.

342

343 Manzatto, C.V., J.F.M. Baca and S.E.M. Pereira. 2010. Zoneamento agroecológico da
344 cana-de-açúcar: abordagem metodológica para integração temática de grandes áreas
345 territoriais. In: Prado, R.B., A.P.D. Turetta and A.G.de Andrade (Eds.). *Manejo e*
346 *conservação do solo e da água no contexto das mudanças ambientais*. Embrapa Solos,
347 Rio de Janeiro, p.193-214.

348

349 Martuscello, J. A., L. Jank, M.M. Gontijo Neto, V.A. Laura and D.N.F.V. Cunha.
350 Produção de gramíneas do gênero *Brachiaria* sob níveis de sombreamento. *Revista*
351 *Brasileira de Zootecnia*. v.38, n.7, p.1183-1190, 2009. [http://dx.doi.org/10.1590/S1516-](http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982009000700004)
352 [35982009000700004](http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982009000700004).

353

354 Oliveira, A.L.M., S. Urquiaga, J. Döbereiner and J.I. Baldani.. The effect of inoculating
355 endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*. v.
356 242, n.2, p.205-215, 2002 <https://doi.org/10.1023/A:101624970>.

357

358 Oliveira, A.L.M., E.L. Canuto, S. Urquiaga, V.M. Reis and J.I. Baldani. Yield of
359 micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with
360 diazotrophic bacteria. *Plant and Soil*. v.284, n.1-2, p.23-32, 2006.
361 <https://doi.org/10.1007/s11104-006-0025-0>.

362

363 Pedula, R.O., N. Schultz, R.C. Monteiro, W. Pereira, A.P.de Araújo, S. Urquiaga and
364 V.M. Reis Growth analysis of sugarcane inoculated with diazotrophic bacteria and
365 nitrogen fertilization. *African Journal of Agricultural Research*. v.11, n.30, p.2786-
366 2795, 2016. <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11141>.

367

368 Podesta, I. Fatores climáticos influenciam produção de café e cana-de-açúcar.
369 [https://www.grupocultivar.com.br/noticias/fatores-climaticos-influenciam-producao-de-](https://www.grupocultivar.com.br/noticias/fatores-climaticos-influenciam-producao-de-cafe-e-cana-de-acucar)
370 [cafe-e-cana-de-acucar](https://www.grupocultivar.com.br/noticias/fatores-climaticos-influenciam-producao-de-cafe-e-cana-de-acucar). 17 Dez. 2015.

371

372 Reis, V. M., Baldani, I. J., Urquiaga, S. Recomendação de uma mistura de estirpes de
373 cinco bactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação de cana-de-açúcar:
374 *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335),
375 *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Azospirillum amazonense* (BR 11145) e
376 *Burkholderia tropica* (BR 11366). Circular Técnica, Embrapa Agrobiologia, Seropédica,
377 RJ. 2009.

378

379 Santos, J. M. Índice de área foliar de cana-de-açúcar submetida a diferentes regimes
380 hídricos no cerrado. Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, 2018. 105 p.
381 Dissertação Mestrado.

382

383 Santos, S. G. dos; Ribeiro, F. S.; Alves, G. C.; Santos, L. A.; Reis, V. M. Inoculation
384 with five diazotrophs alters nitrogen metabolism during the initial growth of sugarcane
385 varieties with contrasting responses to added nitrogen. *Plant and Soil*. p. 1-20, 2019.
386 <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04101-1>.

387

388 Schultz, N., W. Pereira, P.A. Silva, J.I. Baldani, R.M. Boddey, B.J.R. Alves, S.
389 Urquiaga and V.M. Reis. Yield of sugarcane varieties and their sugar quality grown in
390 different soil types and inoculated with diazotrophic bacteria consortium. *Plant*
391 *Production Science*. v.20, n.4, p.366-374, 2017.
392 <https://doi.org/10.1080/1343943X.2017.1374869>.

393

394 Schultz, N., J.A.da Silva, J.S. Sousa, R.C. Monteiro, R.P. Oliveira, V.A. Chaves, W.
395 Pereira, M.F.da Silva, J.I. Baldani, R.M. Boddey, V.M. Reis and S. Urquiaga.
396 Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. *Revista Brasileira de Ciência do*
397 *Solo*. v. 38, n. 2, p. 407-414, 2014. [http://dx.doi.org/10.1590/S0100-](http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832014000200005)
398 [06832014000200005](http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832014000200005).

399

400 Silva, M.A., E.M. Jeronimo and A.D. Lúcio. Perfilhamento e produtividade de cana-de-
401 açúcar com diferentes alturas de corte e épocas de colheita. *Pesquisa Agropecuária*
402 *Brasileira*. v. 43, n. 8, p. 979-986, 2008. [https://doi.org/10.1590/S0100-](https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000800005)
403 [204X2008000800005](https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000800005).

404

405 Silva, S.D. dos A. e, C.R.S. Montero, R.C. Santos, D.E. Nava, C.B. Gomes and I.R.
406 Almeida. Sistema de produção da cana-de-açúcar para o Rio Grande do Sul. Embrapa
407 *Clima Temperado*, Pelotas, RS, Brasil. 2016. <https://www.embrapa.br/en/busca-de->

408 publicacoes/-/publicacao/1076589/sistema-de-producao-de-cana-de-acucar-para-o-rio-
409 grande-do-sul. 23 out. 2019.

410

411 Thomé, P.; Vaz, T. A.; Groff, A. M. Fatores e Técnicas do cultivo de cana-de-açúcar e
412 sua correlação com a qualidade e a produtividade. In: A engenharia de produção na
413 contemporaneidade 2. 1ed.: Atena Editora, 2018, v.2, p.1-10. DOI
414 10.22533/at.ed.9871809121

5. Artigo 2

Influência do uso de um mix de bactérias diazotróficas na biometria e no conteúdo de clorofila de plantas de cana-de-açúcar

(Segundo norma da Revista Brazilian Journal Development)

Publicado em fevereiro de 2020

DOI:10.34117/bjdv6n2-141

**Influência do uso de um mix de bactérias diazotróficas na biometria e
no conteúdo de clorofila de plantas de cana-de-açúcar**

**Use of a mix of diazotrophic bacteria on the biometrics and
chlorophyll content of sugarcane plants**

RESUMO: A cana-de-açúcar é uma cultura com grande potencial econômico para o Brasil, sendo o país responsável por mais de 25% da produção mundial. A região de São Paulo é a maior produtora, ficando o Rio Grande do Sul responsável por menos de 5% do total produzido, isso porque a produtividade média do estado é baixa, devido ao uso de variedades antigas que geralmente apresentam baixo rendimento e pouca adaptação às condições ambientais. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do uso de um mix de cinco espécies de bactérias diazotróficas nas características biométricas e conteúdo de clorofila de plantas de cana-de-açúcar. O trabalho foi desenvolvido na Embrapa Clima Temperado, sob ambiente protegido, tipo telado. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com 6 repetições, onde cada parcela foi representada por três plantas de cana-de-açúcar. Os fatores foram arranjos em esquema bifatorial (5x2), ao testar cinco variedades de cana-de-açúcar e o uso de bactérias diazotróficas (com e sem uso de inoculante bacteriano), totalizando 10 tratamentos. Aos 120 dias foram realizadas as avaliações de número de folhas, número de gemas, altura de planta, diâmetro de colmo e índice de clorofila (SPAD). Pode-se concluir que o uso de bactérias diazotróficas no cultivo de cana-de-açúcar promove aumentos significativos em características importantes, como altura de planta, diâmetro de colmo e índice de clorofila. E através da fixação biológica de nitrogênio, pode melhorar o estado nutricional das plantas, levando ao uso de menor quantidade de fertilizantes nitrogenados, o que diminui os impactos ambientais da utilização desses insumos e torna o cultivo da cana-de-açúcar mais sustentável.

Palavras-chave: *Saccharum* sp, inoculante bacteriano, fixação biológica de nitrogênio, crescimento vegetativo

ABSTRACT: Sugar cane is a crop with great economic potential for Brazil, being the country responsible for more than 25% of world production. The São Paulo region is the largest producer of the culture being Rio Grande do Sul responsible for less than 5% of the total produced. The state's average productivity is low due to the use of old varieties that generally have low yield and little adaptation to environmental conditions. This work aimed to evaluate the effects of using a mix of five species of diazotrophic bacteria on the biometric characteristics and chlorophyll content of sugarcane plants. The work was developed at Embrapa Temperate Climate, under protected environment, screened type. The experimental design used was randomized blocks with 6 replications, where each plot was represented by three sugar cane plants. The factors were arranged in a bifactorial scheme (5x2), by testing five sugarcane varieties and the use of diazotrophic bacteria (with and without the use of bacterial inoculant), totaling 10 treatments. At 120 days, leaf number, bud number, plant height, stem diameter and chlorophyll index (SPAD) were evaluated. It can be concluded that the use of diazotrophic bacteria in sugarcane cultivation promotes significant increases in important characteristics such as plant height, stem diameter and chlorophyll index. Through biological nitrogen fixation, it can improve the nutritional status of plants, leading to the use of less nitrogen fertilizers, which reduces the environmental impacts of using these inputs turning sugarcane cultivation more sustainable.

Key words: *Saccharum* sp, bacterial inoculant, biological nitrogen fixation, vegetative growth

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma planta pertencente à família Poaceae, que perfilha de maneira abundante na fase inicial do desenvolvimento e em seguida vai formando touceiras, compostas por partes aéreas e subterrâneas. E por possuir uma estrutura tipo rizoma, constituída por nós, entrenós e gemas, rebrota sempre que a parte aérea é cortada, sendo a nova brotação conhecida como soqueira. Após o plantio a primeira vegetação é denominada cana-planta, enquanto as soqueiras são denominadas de cana de primeira soca, segunda soca e assim por diante. As soqueiras são de grande importância, pois é delas que se retira o maior retorno econômico dessa cultura (MATSUOKA; STOLF, 2012).

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

O Brasil é responsável por mais de 25% da produção mundial de cana-de-açúcar, é também o primeiro do mundo na produção de açúcar e conquista, cada vez mais, o mercado externo com o uso do etanol como alternativa energética (OECD/FAO, 2018). No país a região de São Paulo é a maior produtora, mas no Rio Grande do Sul (RS) possui vasta área de aptidão ao cultivo canavieiro apresentada no zoneamento agroclimático para o estado (MANZATTO; BACA; PEREIRA, 2010), e no estado está concentrado 40% das agroindústrias de produtos derivados de cana-de-açúcar (VERÍSSIMO et al., 2012). Entretanto, a produtividade média do estado é de 40 Mg.ha⁻¹, aproximadamente 50% da média nacional (CONAB, 2018), o que ocorre devido ao uso de variedades antigas que geralmente apresentam baixo rendimento e pouca adaptação às condições ambientais, o que leva à cultura a não resistir a situações de geadas no inverno e falta de chuva no verão que comumente ocorrem na região. Contudo, a grande importância da cultura canavieira no estado tem levado à busca por ganhos produtivos, que trás a tona uma preocupação com os impactos ambientais que esta situação pode causar (CEZARINO; LIBONI, 2012). Neste sentido, tem sido

desenvolvidos estudos que visam o aumento da produtividade através de um cultivo mais sustentável, sendo eles no âmbito da utilização de cultivares adaptadas às diferentes condições de clima e solo (ANTUNES et al., 2017), aproveitamento de resíduos da cultura (MENDES et al., 2012) e uso de bactérias promotoras de crescimento (PEDULA et al., 2016; OLIVER; SILVA, 2018; OLIVEIRA et al., 2018).

Bactérias endofíticas diazotróficas habitam o interior das plantas de cana-de-açúcar e auxiliam na obtenção de nutrientes, através do aumento das raízes, assimilação de CO₂ e número de folhas (SCHULTZ et al., 2014). Além disso, atuam em outros processos como a solubilização de fosfatos e zinco (ESTRADA et al., 2013) e a produção de auxinas, giberilinas e citocininas (LIN et al., 2012). Outro aspecto importante é a fixação biológica de nitrogênio (FBN), pois diante dos impactos ambientais decorrentes das práticas da cultura canavieira, a menor utilização da adubação química de nitrogênio pode proporcionar uma melhoria da qualidade do solo, dos mananciais e de outros componentes ambientais. A FBN está incluída em um plano estratégico do Brasil, o da Agricultura de Baixo Carbono (ABC), que foi desenvolvido devido à crescente demanda global por uma agricultura sustentável (BRASIL, 2012). Bactérias diazotróficas são capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico, tornando-o assimilável pelas plantas, por isso a inoculação desses microrganismos pode substituir, total ou parcialmente, o uso de fertilizante nitrogenado na cultura da cana-de-açúcar. Mas assim como na adubação nitrogenada, as respostas à inoculação dependem da variedade empregada (SCHULTZ et al. 2012; URQUIAGA et al., 2012; PEREIRA et al., 2013) e costumam ser mais frequentes em solos de média e baixa fertilidade (GOSAL et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2006). Entretanto, estudos sobre o cultivo sustentável da cana-de-açúcar ainda são escassos, principalmente no que tange ao uso de bactérias diazotróficas para promoção de crescimento. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do uso de um mix de cinco espécies de bactérias diazotróficas nas características biométricas e índice de clorofila de plantas de cana-de-açúcar.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido sob ambiente protegido (telado) na Embrapa Clima Temperado (sede), localizada no município de Pelotas, no Rio Grande do Sul, com latitude 52°26'25" Oeste e 31°40'41" Sul e altitude de 60 metros. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com 6 repetições, onde cada parcela foi representada por três plantas de cana-de-açúcar. Os fatores foram arranjos em

esquema bifatorial (5x2), com o objetivo de testar cinco variedades de cana-de-açúcar e o uso de bactérias diazotróficas (com e sem uso de inoculante bacteriano), totalizando 10 tratamentos. As variedades de cana-de-açúcar utilizadas foram: RB867515; RB966928; RB106814; RB106818 e RB106819 e o inoculante bacteriano utilizado continha cinco estirpes de bactérias diazotróficas, sendo elas: BR11281T = PAL-5T de *Gluconacetobacter diazotrophicus* descrita por Cavalcante e Döbereiner (1988); BR11335 = HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae*, descrita por Baldani et al. (1986); BR11504 = HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, descrita por Baldani et al. (1996); BR11366T = PPe8T de *Paraburkholderia tropica*, anteriormente pertencente ao gênero *Burkholderia*, descrito por Reis et al. (2004) e recentemente reclassificado por Oren e Garrity (2015); e BR11145 = CBAMc de *Nitrospirillum amazonense*, anteriormente pertencente ao gênero *Azospirillum*, descrito por Magalhães et al. (1983) e reclassificado por Lin et al. (2014). Essas bactérias foram previamente testadas e selecionadas por Oliveira et al. (2002, 2006) e foram fornecidas pela Coleção de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia - CBR Johanna Döbereiner.

A propagação da cana-de-açúcar foi feita através da produção de mudas, a partir da utilização de minitoletes, baseado no manual desenvolvido na Índia pelo ICRISAT (2009) e semelhante à metodologia de Landell et al. (2012). Onde foram coletados colmos de cana-de-açúcar inteiros no campo com o auxílio de um “podão” e feita a despalha desses. Em seguida os colmos foram cortados em toletes de uma gema, também conhecidos como minitoletes ou minirrebolos, separando as gemas viáveis e sem o ataque de pragas. Para o corte e preparo destes minitoletes foi utilizado um sistema de guilhotina com lâmina dupla devidamente desinfestado (XAVIER et al., 2008). Com intuito de eliminar microrganismos já presentes na cana e para evitar uma possível interferência com as estirpes de bactérias, os minitoletes foram submetidos à termoterapia por 30 minutos a 52 °C (SANGUINO; MORAES; CASAGRANDE, 2006) e tratamento com fungicida de ação sistêmica a base de piraclostrobina por 3 minutos. A inoculação foi realizada através da imersão dos minitoletes tratados, por 30 minutos em solução bacteriana turfosa, contendo um mix das cinco estirpes de bactérias diazotróficas, sendo plantados em seguida em tubetes contendo substrato (PEREIRA et al., 2013). As bandejas de tubetes com volume de 290 cm³ cada, foram mantidas sob ambiente protegido por um período de aproximadamente 30 dias, para que ocorresse a brotação das gemas. Após este período, as mudas foram transplantadas para sacos plásticos pretos de cinco litros, contendo substrato de marca comercial, a base de turfa e

casca de arroz carbonizada e então, as plantas foram transferidas para telado, onde foi realizado o experimento.

Aos 90 dias após a transferência das plantas para o telado, foram realizadas as avaliações das características biométricas das plantas em fase adulta, priorizando-se o colmo principal e desbastados os demais perfilhos. O número de folhas e de gemas foram realizados através da contagem dos mesmos, a altura da planta foi medida com o auxílio de uma régua graduada em centímetros e o diâmetro do colmo, em milímetros, foi medido com o auxílio de um paquímetro digital na porção intermediária do mesmo. O índice de clorofila foi observado na porção intermediária das folhas +3, através do medidor de clorofila ClorofiLOG, da marca FALKER, modelo CFL 1030. Esse equipamento usa três faixas de frequência de luz, permitindo uma análise detalhada que pode ser visualizada instantaneamente ou armazenada no computador. A medição ótica analisa a absorção de luz pela folha, indicando a presença de clorofila em valores SPAD (Soil Plant Analysis Development).

Os resultados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, à homocedasticidade pelo teste de Hartley e a independência dos resíduos foi verificada graficamente. Posteriormente, foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$) e em caso de significância estatística, compararam-se os efeitos das variedades pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e do uso de bactérias diazotróficas pelo teste t ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a aplicação do teste F na análise da variância, identificou-se a significância da interação bifatorial (variedades x uso de bactérias diazotróficas) para todas as variáveis avaliadas. Assim, os efeitos isolados dos fatores foram desconsiderados e analisaram-se detalhadamente as interações (Tabelas 1 até 3).

O uso de bactérias diazotróficas proporcionou um aumento no número de folhas da variedade RB106819 e no número de gemas da RB966928 (Tabela 1). Observou-se ainda, que dentre as variedades, de forma geral a RB106819 independente do uso de bactérias diazotróficas, foi a que apresentou os maiores números de folhas e de gemas. Conforme Falconer (1987), o número de folhas sofre variação genética e ambiental, ou seja, pode ser influenciado pela variedade de cana-de-açúcar e também pelas condições em que a planta se encontra. A importância da cobertura foliar das plantas é amplamente conhecida por ser um indicativo de produtividade e fitomassa nos cultivos (FIGUEIREDO et al., 2010). O número de gemas também é uma característica

extremamente influenciada por fatores genéticos, mas sofreu influência do uso de bactérias. Esse aumento é bastante importante, tendo em vista o sistema de produção de mudas pré-brotadas que vem sendo utilizado no cultivo de cana-de-açúcar atualmente (LANDELL et al., 2012).

Tabela 1. Número de folhas e número de gemas de plantas de cana-de-açúcar em função das variedades e do uso de bactérias diazotróficas. Embrapa Clima Temperado, 2019.

Variedade de cana-de-açúcar	Número de folhas		Número de gemas	
	Sem BD	Com BD	Sem BD	Com BD
RB867515	5,83 ab ^{ns}	5,67 b	4,83 ab ^{ns}	5,33 ab
RB966928	6,67 a ^{ns}	6,83 ab	3,66 bc*	4,67 ab
RB106814	4,83 b ^{ns}	6,16 b	3,16 c ^{ns}	3,83 b
RB106818	6,16 ab ^{ns}	6,50 ab	5,17 a*	3,83 b
RB106819	6,67 a*	8,33 a	5,67 a ^{ns}	6,17 a
Média	6,03	6,70	4,50	4,77
CV (%)	15,9	16,3	10,5	19,3

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), comparando as variedades de cana-de-açúcar sem e com o uso de bactérias diazotróficas. * e ns significativo e não significativo, pelo teste t ($p \leq 0,05$), quando comparado o uso de bactérias diazotróficas, dentro de cada variedade de cana-de-açúcar. BD: Bactérias diazotróficas.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados de altura de planta e diâmetro de colmo das plantas. A variedade RB966928 foi a única que respondeu ao uso de bactérias diazotróficas, para os dois parâmetros observados. Nos tratamentos com uso de bactérias, não houve diferença na altura das plantas entre as variedades, enquanto que sem o uso, a variedade RB106819 se destacou entre as demais, com altura acima de 120 centímetros. Em relação ao diâmetro de colmo, os maiores valores foram observados nas variedades RB867515 e RB106818, sendo a média dos tratamentos com bactérias, superior aos tratamentos sem. Os parâmetros biométricos de plantas de cana-de-açúcar produzidas a partir de minitoletes têm sido estudados por diversos autores, uma vez que, o potencial de acúmulo de sacarose por plantas de cana-de-açúcar está mais relacionado às medidas de dimensões lineares, como a altura e o diâmetro do colmo (MARAFON et al., 2012). Além disso, Landell & Silva (2004) salientam que o diâmetro de colmos é um dos principais componentes analisados para a formação do potencial agrícola, pois está relacionado à produtividade. A disponibilidade de nutrientes está diretamente ligada ao desenvolvimento de parte aérea, portanto, a inoculação de bactérias diazotróficas também promove o crescimento das mudas de cana-de-açúcar, pois torna os nutrientes disponíveis para as plantas.

Tabela 2. Altura de planta e diâmetro de colmo de plantas de cana-de-açúcar em função das variedades e do uso de bactérias diazotróficas. Embrapa Clima Temperado, 2019.

Variedade de cana-de-açúcar	Altura de planta (cm)		Diâmetro de colmo (mm)	
	Sem BD	Com BD	Sem BD	Com BD
RB867515	108,00 b ^{ns/1}	123,67 a	19,88 a ^{ns}	21,70 a
RB966928	82,00 b*	105,83 a	14,35 b*	17,36 bc
RB106814	86,33 b ^{ns}	98,93 a	16,88 ab ^{ns}	17,76 bc
RB106818	105,83 b ^{ns}	104,67 a	19,13 a ^{ns}	18,49 b
RB106819	123,50 a ^{ns}	118,17 a	14,89 b ^{ns}	16,21 c
Média	101,13	110,13	17,03	18,30
CV (%)	13,1	17,8	10,6	6,6

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), comparando as variedades de cana-de-açúcar sem e com o uso de bactérias diazotróficas. * e ns significativo e não significativo, pelo teste t ($p \leq 0,05$), quando comparado o uso de bactérias diazotróficas, dentro de cada variedade de cana-de-açúcar. BD: Bactérias diazotróficas.

O índice de clorofila foi influenciado pelo uso de bactérias diazotróficas nas variedades RB867515, RB966928 e RB106819, sendo que essa última se destacou por apresentar o maior conteúdo de clorofila dentre os tratamentos (Tabela 3). O nitrogênio (N) é o nutriente absorvido em maior quantidade pelas plantas em geral, e é utilizado na síntese de compostos celulares, como a clorofila, sendo, portanto, o seu teor nas folhas da planta, proporcional à quantidade de nitrogênio que ela absorveu. Dessa forma, conhecendo o índice de clorofila é possível saber se as plantas estão com deficiência de N (BLACKMER; SCHEPERS, 1994). Alguns autores ao observar o índice de clorofila (SPAD) em plantas de milho, concluíram que valores por volta de 45 são considerados ótimos para gramíneas (FONSECA et al., 2012), estando, portanto, as plantas do presente estudo, com deficiência de N. Contudo, diante das diferenças entre os tratamentos com e sem o uso de bactérias diazotróficas, pode-se observar que a fixação biológica de nitrogênio é eficiente em algumas variedades, aumentando a disponibilidade do nutriente para as plantas de cana-de-açúcar.

Tabela 3. Índice de clorofila (SPAD) de plantas de cana-de-açúcar em função das variedades e do uso de bactérias diazotróficas. Embrapa Clima Temperado, 2019.

Variedade de cana-de-açúcar	Índice de clorofila (SPAD)	
	Sem BD	Com BD
RB867515	19,87 b ^{*1}	28,50 b
RB966928	22,37 ab [*]	27,63 b
RB106814	27,20 a ^{ns}	28,08 b
RB106818	25,08 ab ^{ns}	28,67 b
RB106819	25,27 ab [*]	35,63 a
Média	23,96	26,83
CV (%)	13,5	13,4

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), comparando as variedades de cana-de-açúcar sem e com o uso de bactérias diazotróficas. * e ns significativo e não significativo, pelo teste t ($p \leq 0,05$), quando comparado o uso de bactérias diazotróficas, dentro de cada variedade de cana-de-açúcar. BD: Bactérias diazotróficas.

CONCLUSÕES

O uso de bactérias diazotróficas no cultivo de cana-de-açúcar promove aumentos significativos em características importantes, como altura de planta, diâmetro de colmo e índice de clorofila, que reflete o conteúdo de nitrogênio. Portanto, pode-se concluir que esta prática melhora o estado nutricional das plantas, podendo levar ao uso de menor quantidade de fertilizantes nitrogenados, o que diminui os impactos ambientais da utilização desses insumos e torna o cultivo da cana-de-açúcar mais sustentável. No entanto, as respostas positivas ao uso das bactérias são variáveis, sendo algumas variedades de cana-de-açúcar, mais responsivas que outras. As variedades RB867515 e RB966928 estão entre as mais cultivadas no Brasil, sendo os resultados do presente estudo extremamente positivos.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à Embrapa Clima Temperado pela estrutura e materiais disponíveis para o desenvolvimento do trabalho e à Embrapa Agrobiologia pelo envio dos inoculantes bacterianos. Também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsas de estudo que possibilitaram aos alunos desenvolver a pesquisa. E por fim, a Universidade Federal de Pelotas, especialmente ao Programa de Pós-graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar por tornarem possível a realização de trabalhos e a divulgação destes, através dos cursos de mestrado e doutorado.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, W. R.; SCHÖFFEL, E. R.; SILVA, S. D. A.; HÄRTER, A.; CAMPOS, A. D. S.; MONTERO, C. R. S. Productive performance of early sugarcane genotypes in Rio Grande do Sul state, Brazil. *Revista Scientia Agraria*, v. 18, n. 2, p. 136-142, 2017. <http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v18i2.50533>.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology*, v. 36, p. 86–93, 1986. <https://doi.org/10.1099/00207713-36-1-86>.

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates EF group 1 as *Herbaspirillum* species 3. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology*, v. 46, p. 802–810, 1996. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-3-802>.

BLACKMER, T. M.; SCHEPERS, J. S. Techniques for monitoring crop nitrogen status in corn. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 25, p. 1791-1800, 1994. <https://doi.org/10.1080/00103629409369153>.

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

CAVALCANTE, V.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium isolated from sugarcane. *Plant and Soil*, v. 108, p. 23–31, 1988. <https://doi.org/10.1007/BF02370096>.

CEZARINO, L. O.; LIBONI, L. B. Impactos sociais e ambientais da indústria da cana-de-açúcar. *Future Studies Research Journal*, v. 4, n. 1, p. 202-230, 2012. <https://doi.org/10.24023/FutureJournal/2175-5825/2012.v4i1.101>.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. *Acomp. safra bras. cana*, v. 5 - Safra 2017/18, n. 1 - Primeiro levantamento, maio de 2018.

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

ESTRADA, G. A.; BALDANI, V. L. D.; OLIVEIRA, D. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant and Soil*, v. 369, p. 115-129, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1550-7>.

FALCONER, D. S. *Introdução à genética quantitativa*. Viçosa: UFV. 1987, 359 p.

FIGUEIREDO, R. T.; GUISTEM, J. M.; CHAVES, A. M. S.; AGUIAR JUNIOR, D. A.; SILVA, A. G. P.; PAIVA, J. B. P., SANTOS, F. N. Relação entre a área foliar, número de folhas e biomassa seca e fresca da planta de rúcula. *Horticultura Brasileira*, v. 28, p. 913-918, 2010.

GOSAL, S. K.; KALIA, A.; UPPAL, S. K.; KUMAR, R.; WALIA, S. S.; SINGH, K.; SINGH, H. Assessing the benefits of *Azobacter* bacterization in sugarcane: a field appraisal. *Sugar Tech*, v. 14, n. 1, p. 61-67, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12355-011-0131-z>.

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

LANDELL, M. G.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A.; DINARDO-MIRANDA, L. L.; SCARPARI, M. S.; GARCIA, J. C.; BIDÓIA, M. A. P.; SILVA, D. N.; MENDONÇA, J. R.; KANTHACK, R. A. D.; CAMPOS, M. F.; BRANCALIÃO, S. R.; PETRI, R. H.; MIGUEL, P. E. M. Sistema de multiplicação de

de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas. Ribeirão Preto: Instituto Agrônomo de Campinas (Documentos IAC, 109), 2012. 17 p.

LANDELL, M. G. A.; SILVA, M. A. As estratégias de seleção da cana em desenvolvimento no Brasil. *Visão Agrícola*, v. 1, p. 18-23, 2004. <https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/cana-melhoramento-genetico.pdf>. 13 Jan. 2020.

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. 1149–1162, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0176-6>.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 55, p. 417–430, 1983.

MANZATTO, C. V.; BACA, J. F. M.; PEREIRA, S. E. M. Zoneamento agroecológico da cana-de-açúcar: abordagem metodológica para integração temática de grandes áreas territoriais. In: PRADO, R. B.; TURETTA, A. P. D.; ANDRADE, A. G. (Org.). *Manejo e conservação do solo e da água no contexto das mudanças ambientais*. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2010, 486 p.

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

MATSUOKA, S.; STOLF, R. Sugarcane tillering and ratooning: key factors for a profitable cropping. In: *Sugarcane: Production, Cultivation and Uses*. Nova Science Publishers, 2012, 21 p.

MENDES, R. F.; GUIMARÃES JUNIOR, J. B.; SANTOS, R. C.; CÉSAR, A. A. S. Efeito da associação de bagaço de cana, tipo e teor de adesivo na produção de painéis aglomerados com madeira de pinus. *Ciência Florestal*, v. 22, p. 187-196, 2012. <http://dx.doi.org/10.5902/198050985088>.

OECD/FAO. *Agricultural Outlook 2018-2027*. OECD Publishing, Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2018. https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2018-en.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant and Soil*, v. 284, p. 23-32, 2006. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-0025-0>.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*, v. 242, p. 205-215, 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1016249704336>.

OLIVEIRA, H. P.; MELO, R. O.; BALDOTTO, M. A.; ANDRADE, M. A.; BALDOTTO, L. E. B. Performance of pre-sprouted sugarcane seedlings in response to the application of humic acid and plant growth-promoting bacteria. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 39, n. 3, p. 1365-1370, 2018. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n3p1365>.

OLIVER, R.; SILVA, M. A. Interaction between diazotrophic bacteria and N-fertilizer doses on sugarcane crop. *Journal of Plant Nutrition*, v. 41, p. 722-736, 2018. <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1425436>.

OREN, A.; GARRITY, G. M. Notification that new names of prokaryotes, new combinations, and new taxonomic opinions have appeared, of the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 65, p. 1397–1399, 2015. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.000142>.

PEDULA, R. O.; SCHULTZ, N.; MONTEIRO, R. C.; PEREIRA, W.; ARAÚJO, A. P.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Growth analysis of sugarcane inoculated with diazotrophic bacteria and nitrogen fertilization. *African Journal of Agricultural Research*, v. 11, n. 30, p. 2786-2795, 2016. <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11141>.

PEREIRA, W.; LEITE, J. M.; HIPÓLITO, G. S.; SANTOS, C. L. R.; REIS, V. M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. *Revista Ciência Agronômica*, v. 44, p. 363-370, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902013000200020>.

REIS, V. M.; SANTOS, P. E.; TENORIO-SALGADO, S.; VOLGEL, J.; STROFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 54, p. 2155-2162, 2004. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.02879-0>.

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

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, 2012. <http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/11413>. 13 Jan. 2020.

SCHULTZ, N.; SILVA, J. A.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; OLIVEIRA, R. P.; CHAVES, V. A.; PEREIRA, W.; SILVA, M. F.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 38, n. 2, p. 407-414, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832014000200005>.

URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F.; BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; SÁ, J. M.; BARBOSA, K. P.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. *Plant and Soil*, v. 356, p. 5-21, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1016-3>.

VERISSIMO, M. A. A.; SILVA, S. D. A.; AIRES, R. F.; DAROS, E.; PANZIERA, W. Adaptabilidade e estabilidade de genótipos precoces de cana-de-açúcar no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 47, p. 561-568, 2012. <http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/12106>. 13 Jan. 2020.

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

6. Artigo 3

**Mitigação dos impactos do déficit hídrico na cana-de-açúcar pelo uso de
bactérias diazotróficas**

(Segundo norma do Journal of Plant Physiology)

1 **Mitigação dos impactos do déficit hídrico na cana-de-açúcar pelo uso de bactérias**

2 **diazotróficas**

3

4 **Resumo**

5 Os elementos climáticos têm influencia direta nos cultivos agrícolas, sendo o déficit
6 hídrico considerado o principal estresse ambiental enfrentado pela agricultura mundial.
7 A falta de água causa uma série de alterações morfo-fisiológicas tais como: diminuição
8 da área foliar e do turgor celular, menor conteúdo relativo de água e potencial hídrico
9 foliar. Entretanto, a presença de bactérias diazotróficas pode levar a produção de
10 substâncias osmorreguladoras pelas plantas, o que pode colaborar com a tolerância ao
11 déficit hídrico. Dentro deste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influencia do
12 uso de uma mistura de cinco bactérias diazotróficas aplicadas como inoculante e medir
13 sua influência em aspectos fisiológicos e no crescimento de cinco variedades de cana-
14 de-açúcar submetidas ao déficit hídrico. As variedades testadas foram: RB867515,
15 RB966928, RB106814, RB106818 e RB106819; com e sem o uso de uma mistura de
16 cinco estirpes de bactérias diazotróficas; em condições adequadas de irrigação e sob
17 restrição hídrica total. O experimento contou com quatro repetições, sendo cada parcela
18 representada por uma planta de cana-de-açúcar e o delineamento experimental utilizado
19 foi o de blocos casualizados em esquema de parcelas subdivididas. A inoculação
20 proporcionou o aumento da assimilação líquida de carbono em 15%, do conteúdo de
21 clorofila em 30%, e do potencial osmótico em 28% nas plantas comparando ao controle
22 não inoculado, além do rendimento de massa seca. Além disto foi capaz de manter a
23 condutância estomática e o conteúdo relativo de água nas folhas e diminuir a
24 transpiração líquida das plantas em situação de déficit hídrico em 6%. A inoculação
25 também influenciou positivamente os parâmetros da fluorescência da clorofila,

26 aumentando a eficiência quântica máxima do FSII, o rendimento quântico fotoquímico
27 efetivo do FSII, a dissipação fotoquímica e a taxa de transporte de elétrons A presença
28 destas bactérias melhora as características morfo-fisiológicas, colaborando com a
29 mitigação dos efeitos do déficit hídrico em plantas de cana-de-açúcar, sendo dependente
30 do cultivar a magnitude de resposta à aplicação.

31

32 **Palavras-chave:** estresse hídrico, fotossíntese, fluorescência da clorofila.

33

34 **Abstract**

35 Climatic elements influence on agricultural crops, with the water deficit being
36 considered the main environmental stress faced by world agriculture. The lack of water
37 causes a series of morpho-physiological changes such as: decrease in leaf area and cell
38 turgor, lower relative water content and leaf water potential. However, the presence of
39 diazotrophic bacteria can lead to the production of osmoregulatory substances by plants,
40 which can contribute to tolerance to water deficit. Within this context, the goal of this
41 study was to evaluate the influence of the use of a mixture of five diazotrophic bacteria
42 applied as an inoculant and to measure its influence on physiological aspects and on the
43 growth of five varieties of sugarcane subjected to water deficit. The tested varieties
44 were: RB867515, RB966928, RB106814, RB106818 and RB106819; with and without
45 the use of a mixture of five strains of diazotrophic bacteria; under adequate irrigation
46 conditions and under total water restriction. The experiment had four replicates, each
47 plot represented by a sugarcane plant and the experimental design used was randomized
48 blocks in a split plot scheme. Inoculation provided an increase in liquid carbon
49 assimilation by 15%, chlorophyll content by 30%, and osmotic potential by 28% in
50 plants compared to uninoculated control, in addition to dry mass yield. In addition, it

51 was able to maintain stomatal conductance and relative water content in the leaves and
52 decrease the liquid transpiration of plants in water deficit by 6%. Inoculation also
53 positively influenced the chlorophyll fluorescence parameters, increasing the maximum
54 quantum efficiency of the FSII, the effective photochemical quantum yield of the FSII,
55 the photochemical dissipation and the electron transport rate. The presence of these
56 bacteria improves the morphophysiological characteristics, helping to mitigate the
57 effects of water deficit in sugarcane plants, being dependent on the cultivation of the
58 magnitude of response to the application.

59

60 **Keywords:** hydric stress, photosynthesis, chlorophyll fluorescence.

61

62 **Introdução**

63

64 A área mundial ocupada com cana-de-açúcar chega a 26,7 milhões de hectares, em 130
65 países, o que alcança uma produção de 1,8 bilhões de toneladas (FAOSTAT, 2016). No
66 Brasil mais de 9 milhões de ha são cultivados, o que evidencia a grande importância
67 econômica desta cultura para o país, com grande contribuição na matriz energética
68 nacional e em exportações de produtos desta cadeia produtiva (Conab, 2019).

69 Os elementos climáticos têm influência direta nos cultivos agrícolas, sendo o déficit
70 hídrico considerado o principal estresse ambiental enfrentado pela agricultura mundial,
71 pois dificulta a produção de alimentos em diversos países (Rampino et al., 2006). Na
72 região sudeste do Brasil, principal produtora de cana-de-açúcar, as estações do ano são
73 bem definidas, tendo ocorrência de estiagem no verão. Neste sentido, o período de
74 máximo crescimento vegetativo e maior demanda hídrica da cultura coincide com a
75 falta de água, afetando o crescimento vegetativo e reduzindo a produtividade final
76 (Gross; Cassol, 2015).

77 A falta de água causa uma série de alterações morfo-fisiológicas tais como: diminuição
78 da área foliar, do turgor celular, do conteúdo relativo de água (CRA) e do potencial
79 hídrico foliar (Jaleel et al., 2009). Além disso, influencia na disponibilidade de
80 nutrientes do solo e no transporte deles para as raízes e causa grandes alterações no
81 metabolismo do nitrogênio e do carbono (Farooq et al., 2009).

82 A cana-de-açúcar é uma planta de metabolismo C₄, que possui alta eficiência no uso da
83 radiação (Robertson et al., 1996), alcança altas taxas fotossintéticas e grande produção
84 de biomassa e acúmulo de carboidratos (Welbaum; Meinzer, 1990). O que destaca este
85 grupo de plantas é o sistema de concentração de CO₂ nas folhas, que consiste em
86 modificações bioquímicas e estruturais que garantem um melhor desempenho
87 fotossintético (Ghannoum, 2009). No entanto, um fator que pode limitar a fotossíntese
88 na cana-de-açúcar é o déficit hídrico, que pode reduzir significativamente a condutância
89 estomática, transpiração, fotossíntese líquida e a eficiência no uso da água (Gonçalves et
90 al., 2010).

91 Bactérias diazotróficas são conhecidas por habitar o interior das plantas de cana-de-
92 açúcar e promover o crescimento radicular, melhorando a absorção de nutrientes (Girio
93 et al., 2015; Chaves et al., 2015) e produção de substâncias osmorreguladoras pela
94 planta (Dimkpa et al. 2009), o que acaba por promover o seu crescimento especialmente
95 em situação de déficit hídrico (Moutia et al. 2010). Além disso, estirpes de
96 *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum*
97 *rubrisubalbicans*, *Paraburkholderia tropica* e *Nitrospirillum amazonense* quando
98 inoculadas em conjunto, tem promovido o crescimento e aumento do conteúdo de
99 clorofila de plantas de cana-de-açúcar (Matoso et al., 2020).

100 Diante do exposto, acredita-se que a presença de bactérias diazotróficas possa melhorar
101 características ligadas à fisiologia das plantas, promovendo a mitigação dos efeitos do

102 déficit hídrico. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influencia do uso de uma
103 mistura de cinco espécies de bactérias diazotróficas em aspectos fisiológicos e no
104 crescimento de plantas de cana-de-açúcar sob condições de restrição hídrica.

105

106 **Material e métodos**

107

108 *Delineamento experimental*

109 O estudo foi desenvolvido em casa de vegetação localizada no município, Pelotas, RS-
110 Brasil. O experimento foi plantado em julho e colhido aos 120 dias, onde foi testada a
111 aplicação de cinco estirpes / espécies de bactérias diazotróficas na tolerância ao estresse
112 hídrico de cinco variedades de cana-de-açúcar: RB867515, RB966928, RB106814,
113 RB106818 e RB106819. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos
114 casualizados arranjados em esquema de parcelas subdivididas com quatro
115 repetições; nas parcelas principais alocaram-se as condições de irrigação; nas
116 subparcelas as variedades de cana-de-açúcar e nas subsubparcelas o uso das bactérias
117 diazotróficas nas plantas.

118 As variedades de cana-de-açúcar foram selecionadas com base no censo varietal
119 descrito para a safra 2017/18 (Braga Junior, 2018), onde a RB867515 e RB966928
120 foram apresentadas como as mais cultivadas no Brasil e também foram escolhidos três
121 genótipos que se mostraram bastante produtivos na região sul do país em um estudo
122 desenvolvido por Lemões (2018), mas que no entanto, ainda não são cultivares
123 comercializados. Após a escolha das variedades, produziu-se mudas de cana-de-açúcar
124 segundo a metodologia adaptada de Landell et al., (2012).

125

126 *Inoculação*

127 A inoculação dos propágulos foi realizada com um inoculante produzido com as
128 espécies / estirpes selecionadas por Oliveira et al (2003; 2006) descritas como:
129 BR11281^T = PAL-5^T, BR11335 = HRC54, BR11504 = HCC103, BR11366^T = PPe8^T,
130 BR11145 = CBAMc, pertencentes às espécies *Gluconacetobacter diazotrophicus*
131 (Cavalcante e Döbereiner, 1988); *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani et al. 1986),
132 *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Baldani et al. 1996), *Paraburkholderia tropica* (Reis
133 et al; 2004; sinonímia Oren e Garrity, 2015) e *Nitrospirillum amazonense* (Magalhães et
134 al., 1983; sinonímia Lin et al. 2014), respectivamente.

135 As estirpes foram fornecidas pela Coleção de Bactérias Diazotróficas da Embrapa
136 Agrobiologia - CBR Johanna Döbereiner, onde foram crescidas separadamente em meio
137 DYGS (Baldani et al., 2014) a 175 rpm por 24-48 hs dependendo da estirpe e veiculada
138 em turfa moída, neutralizada (pH 6,0) e esterilizada por autoclavagem (121 °C, 20 min,
139 2 vezes) na proporção de 70 mL de suspensão celular para cada 250 g de turfa e cada
140 inoculante turfoso de 250 g foram diluídos 50 L de água. A inoculação da cana-de-
141 açúcar foi realizada na produção de mudas pré-brotadas, sendo os minitoletes imersos
142 na solução por 30 min (Reis et al., 2009), antes de realizar o plantio em tubetes de 290
143 cm³ contendo substrato da marca Turfa Fértil[®].

144

145 ***Estresse hídrico e avaliações de plantas***

146 Aos 30 dias após o plantio, as mudas de cana-de-açúcar foram transplantadas para sacos
147 plásticos pretos de cinco litros contendo substrato e alocadas em casa de vegetação com
148 circulação de ar forçada e aquecimento, com temperatura média de 25°C onde
149 permaneceram por 90 dias.

150 Durante este período manteve-se a irrigação por um sistema de gotejamento com tubos
151 gotejadores (tipo fita) de 16 mm de diâmetro, os emissores espaçados 0,5 m e

152 funcionando com pressão de $1,0 \text{ kgf cm}^{-2}$ e vazão de $1,5 \text{ L h}^{-1}$. Para dar início ao
153 experimento, foi realizado o encharcamento dos recipientes, por 10 min ou até que os
154 poros do substrato estivessem totalmente completados pela água. Em seguida foi feita a
155 drenagem do excesso de água nos sacos e a partir deste momento, nos tratamentos de
156 déficit hídrico, a irrigação foi totalmente suspensa. O monitoramento da umidade dos
157 substratos foi realizado através de um módulo sensor de umidade de solo higrômetro
158 com Arduino (modelo nano v3.0, marca ChipSCE), que mede o conteúdo relativo de
159 água no substrato ou solo (%), diariamente, sempre no mesmo horário, 8:30 da manhã
160 (Figura 1).

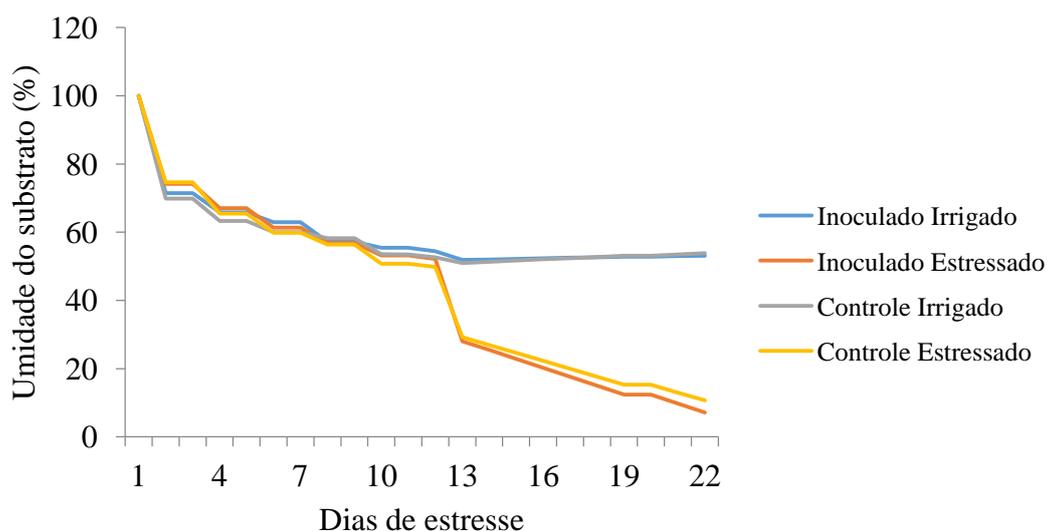
161 Com o auxílio de um analisador portátil de gases a infravermelho, IRGA (modelo
162 LI6400XT LI-COR, Inc., Lincoln, NE, EUA), na primeira folha totalmente expandida e
163 com lígula aparente, no terço médio do limbo foliar avaliou-se a assimilação de CO_2
164 (A), a condutância estomática (gs) e a transpiração líquida (E), aos 13, 17 e 22 dias após
165 a suspensão da irrigação (DASI).

166 A primeira avaliação foi realizada quando sintomas de estresse, como enrolamento das
167 folhas, começaram a aparecer e a última, quando todos os tratamentos mantidos em
168 déficit hídrico apresentavam elevada queda na atividade fotossintética. As medições
169 foram realizadas entre às 09:00 e 11:00 horas da manhã, com concentração de CO_2 na
170 câmara de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$, 25°C de temperatura e uma densidade de fluxo de fótons de
171 $500 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, usando a fonte de luz da LI-COR anexada na câmara de
172 medição. O conteúdo foliar de clorofila total (CL) foi observado nos mesmos dias que
173 as trocas gasosas, através do medidor eletrônico do conteúdo de clorofila ClorofiLOG,
174 da marca FALKER, modelo CFL 1030. Esse equipamento avalia, quantitativamente, a
175 intensidade do verde da folha, medindo as transmissões de luz a 650 nm, onde ocorre
176 absorção de luz pela molécula de clorofila e a 940 nm, onde não ocorre absorção. Com

177 estes dois valores, o equipamento calcula um número ou índice SPAD (Soil Plant
 178 Analysis Development) que, normalmente, é altamente correlacionado com o teor de
 179 clorofila da folha (Markwell et al., 1995; Guimarães et al., 1999).

180 Os parâmetros da fluorescência da clorofila de plantas adaptadas ao escuro foram
 181 medidos usando um fluorômetro de bancada (modelo PAM-2500 da Walz Heinz
 182 GmbH, Effeltrich, Alemanha), seguindo a metodologia descrita por Baker (2008). No
 183 vigésimo primeiro dia de déficit hídrico, folhas foram mantidas no escuro por pelo
 184 menos 30 min, em seguida foram extraídos discos de 1 cm da porção intermediária de
 185 folhas + 3 que foram expostos à fluorescência, induzida por um pulso de flash de
 186 saturação com $7000 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

187 A eficiência quântica máxima do FSII (F_v/F_m) foi definida como $(F_m - F_o)/F_m$, onde
 188 F_m corresponde a fluorescência máxima e F_o a fluorescência inicial. O rendimento
 189 quântico fotoquímico efetivo do FSII ($Y(II)$) foi definido como $(F_m' - F_s)/F_m'$. A
 190 dissipação fotoquímica (qP) foi definida como $1 - (F_s F_o')/(F_m' - F')$ e taxa de transporte
 191 de elétrons (ETR) definida como $PAR \cdot ETR_{fator} \cdot PPS2/PPPS \cdot Y(II)$.



192

193 Figura 1. Conteúdo relativo de água no substrato (%) nos tratamentos com e sem irrigação, monitorado

194 com o auxílio de um sensor com Arduino, ao longo de 22 dias.

195

196 Para a determinação do conteúdo relativo de água (CRA), foram extraídos discos
197 foliares de 1 cm na porção intermediária da folha +3 (SILVEIRA et al., 2003), que
198 foram pesados imediatamente após a coleta, em balança de precisão, obtendo-se sua
199 massa fresca (MF). Em seguida, foram dispostos em placas de Petri e imersos em água
200 destilada, por sete horas, em temperatura ambiente sob radiação fotossinteticamente
201 ativa de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os discos foram secos em papel filtro e pesados novamente,
202 obtendo-se a massa túrgida (MT). O material foi seco em estufa a 80°C por 48 h e
203 pesados novamente, para a obtenção da massa seca (MS). Por fim, o CRA foi calculado
204 pela equação: $\text{CRA} = ((\text{MF} - \text{MS}) / (\text{MT} - \text{MS})) \times 100$.

205 O Potencial osmótico (Ψ_s) foi conhecido com o auxílio de um osmômetro de pressão de
206 vapor (Vapro® 5600, Wescor, Inc., Logan, UT, USA). Amostras de folhas de cana-de-
207 açúcar foram previamente pesadas em balança de precisão, padronizando-se o peso de
208 150 mg. Essas foram alocadas em tubos cônicos Eppendorf® de 0,5 mL, onde foram
209 maceradas com o auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, adicionou-se 50 μL de
210 água ultrapura em cada um dos tubos, que foram submetidos a um spin de 1 min em
211 micro centrífuga a 12.000 g.

212 A seguir, todo o sobrenadante foi transferido para novos tubos, repetiu-se a
213 centrifugação e então, retirou-se 10 μL do sobrenadante para realizar a leitura da
214 osmolaridade do tecido. Os valores obtidos em milimoles por quilograma foram
215 convertidos em potencial osmótico, por meio da equação de Van't Hoff (Souza et al.,
216 2012) sendo, em seguida, convertidos em MPa. Além disso, ao final do experimento, a
217 parte aérea das plantas foi cortada e pesada para a determinação da massa fresca, e em
218 seguida foram levadas à estufa, onde permaneceram por sete dias a 60°C para
219 determinar a massa seca.

220

221 *Análise estatística*

222 Os resultados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-
223 Wilk, à homocedasticidade pelo teste de Hartley e a independência dos resíduos foi
224 verificada graficamente. Posteriormente, foram submetidos à análise de variância
225 ($p \leq 0,05$) e em caso de significância estatística, compararam-se os efeitos das variedades
226 pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e do uso de bactérias diazotróficas pelo teste t ($p \leq 0,05$),
227 em função das condições de irrigação. Além disso, após as análises estatísticas foi
228 realizada a classificação das variedades de cana-de-açúcar conforme a sua resposta à
229 aplicação de bactérias diazotróficas e condições de irrigação.

230

231 **Resultados**

232

233 Com a aplicação do teste F na análise da variância, identificou-se a significância da
234 interação trifatorial (variedades x uso de bactérias diazotróficas x condições de
235 irrigação) para todas as variáveis avaliadas. Assim, os efeitos isolados dos fatores sobre
236 estas características foram desconsiderados e analisaram-se detalhadamente as
237 interações (Figuras 2 - 7).

238 A assimilação de CO_2 nas plantas de cana-de-açúcar (Figura 2) foi influenciada
239 positivamente pelo uso de bactérias diazotróficas aos 13 DAS, nas variedades
240 RB867515, RB106814, RB106818 e RB106819 nos tratamentos em que a irrigação foi
241 suspensa durante esse período. As mesmas variedades apresentaram maior valor “A”
242 nos tratamentos irrigados, com exceção da RB106819. Em contrapartida, a RB966928
243 teve um comportamento contrário, apresentando maior atividade nos tratamentos sem
244 bactérias diazotróficas.

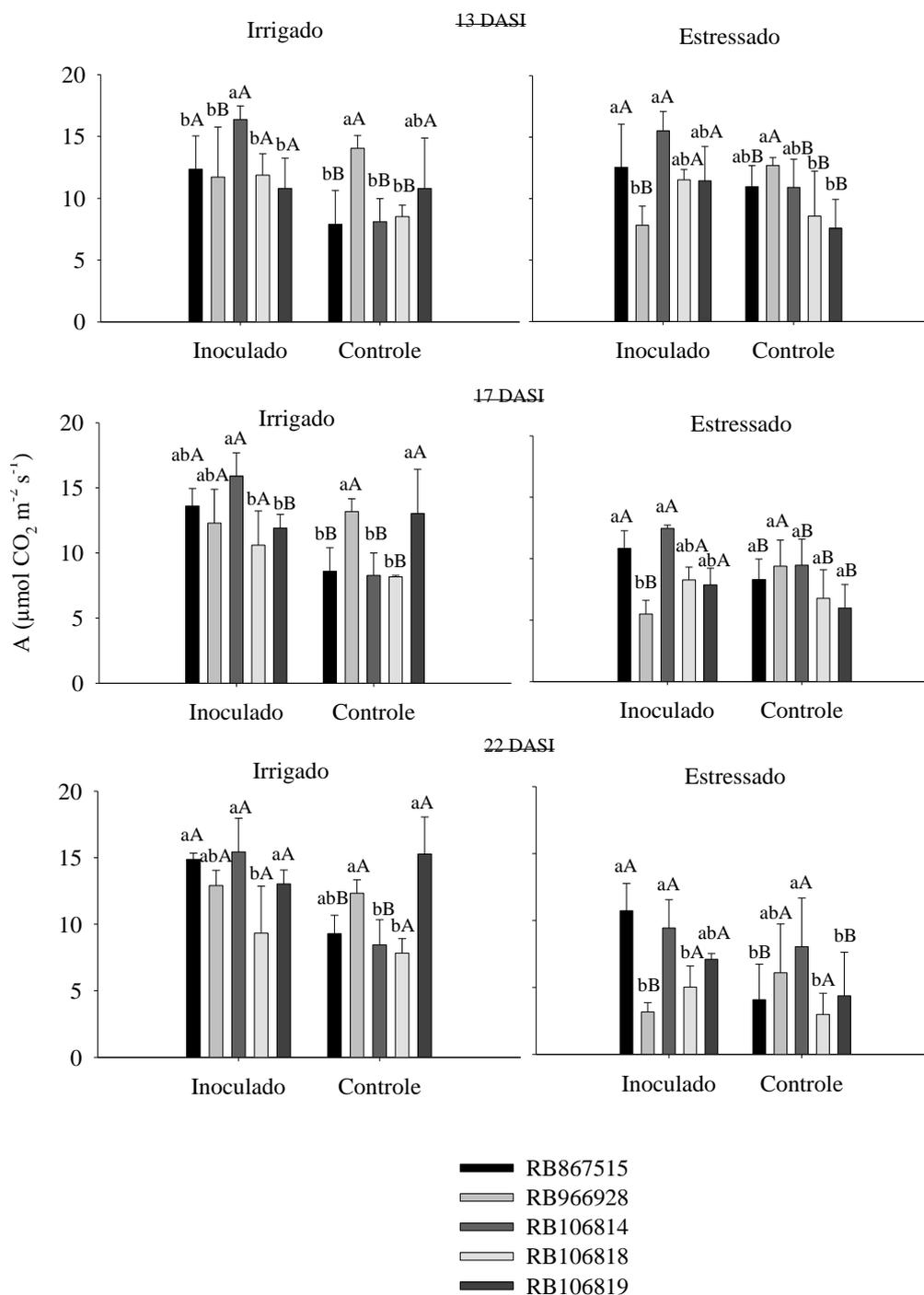
245 Aos 17 dias após a suspensão da irrigação o comportamento das variedades se manteve
246 semelhante à avaliação anterior, no entanto, aos 22 dias, os tratamentos sem irrigação
247 apresentaram elevada queda na assimilação de carbono e apenas as variedades
248 RB967515 e RB106819 apresentaram maior valor “A” com o uso de bactérias
249 diazotróficas. Já quando comparadas as variedades entre si, os maiores valores de A
250 foram apresentados pela RB106814 seguida da RB867515, com e sem o uso de
251 bactérias diazotróficas, tanto nos tratamentos irrigados quanto em situação de estresse.
252 Assim como a RB966928, porém essa, apenas nos tratamentos controle.

253 Além disto, o uso de bactérias diazotróficas manteve a condutância estomática das
254 plantas de cana-de-açúcar estressadas até os 22 dias de restrição hídrica, em todas as
255 variedades, com exceção da RB966928, como pode se observar na Figura 3. De forma
256 geral, a gs foi superior nos tratamentos com o uso de bactérias, tanto irrigados, quanto
257 sob restrição hídrica total, e, principalmente, na variedade RB106814 aos 22 dias após o
258 a suspensão da irrigação.

259 A transpiração líquida (Figura 4) aos 13 DASI foi inferior nas variedades inoculadas
260 RB867515 e RB966928 nos tratamentos estressados, e nesta segunda, também quando
261 irrigado. Dentre as variedades, a RB16814 apresentou a maior E, nos tratamentos
262 inoculados, tanto irrigado quanto sob restrição hídrica. Aos 17 DASI, os resultados se
263 mantiveram semelhantes. Já aos 22 DASI, a transpiração foi inferior também na
264 variedade RB106819 com o uso de bactérias diazotróficas e sem irrigação, respondendo
265 positivamente às bactérias sob situação de estresse hídrico.

266 A clorofila total diminuiu nos tratamentos estressados, ao longo dos dias de restrição
267 hídrica, principalmente nos controles sem o uso de bactérias diazotróficas (Figura 5).
268 Aos 13 dias as variedades RB106814, RB106818 e RB106819 apresentaram valores

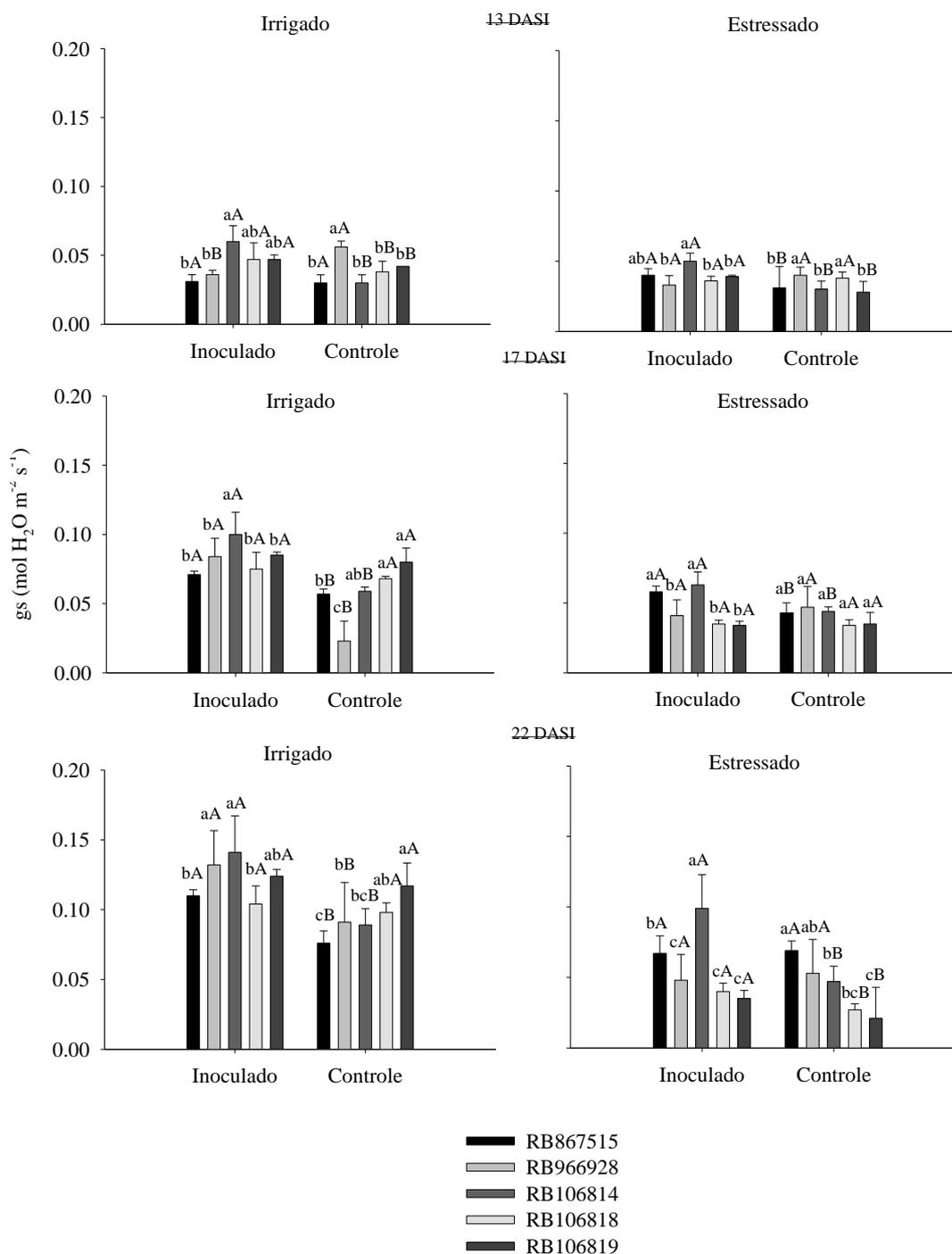
269 mais elevados de clorofila com o uso de bactérias. Enquanto que aos 17 e 22 DASI,
 270 apenas a RB106814 manteve a resposta positiva em relação à presença de bactérias.
 271



272

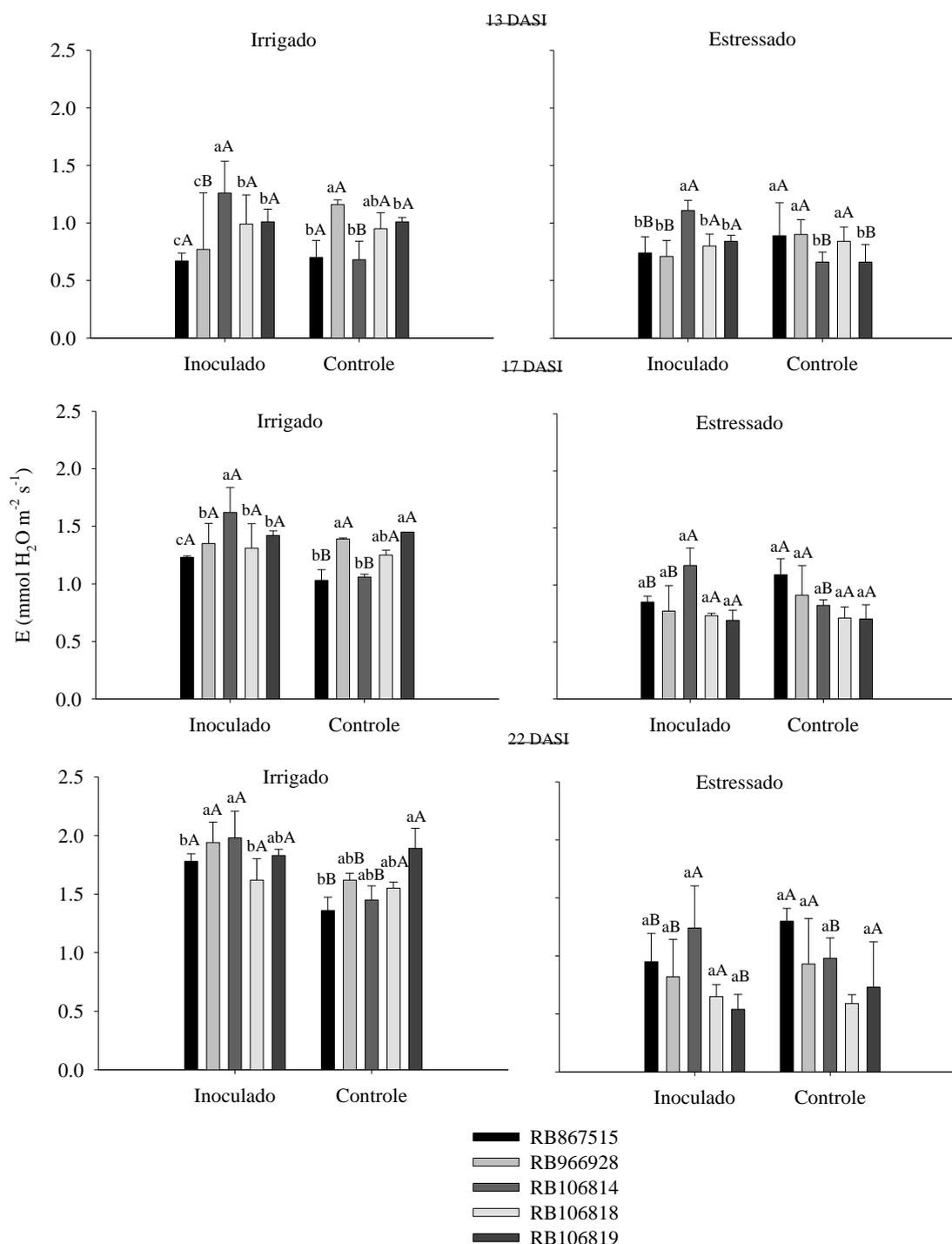
273 Figura 2. Assimilação líquida de CO₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de plantas de cana-de-açúcar aos 13, 17 e 22
 274 dias após a suspensão da irrigação (DASI), em função das variedades, aplicação de bactérias diazotróficas
 275 e condições de irrigação. Embrapa Clima Temperado, 2019. Barras seguidas pela mesma letra minúscula
 276 não diferem entre si, quando comparadas as variedades em função do uso de bactérias diazotróficas e
 277 condições de irrigação pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e quando seguidas pela mesma letra maiúscula,

278 quando comparado o uso de bactérias diazotróficas em função das variedades de cana-de-açúcar e
 279 condições de irrigação pelo teste de t ($p < 0,05$).
 280



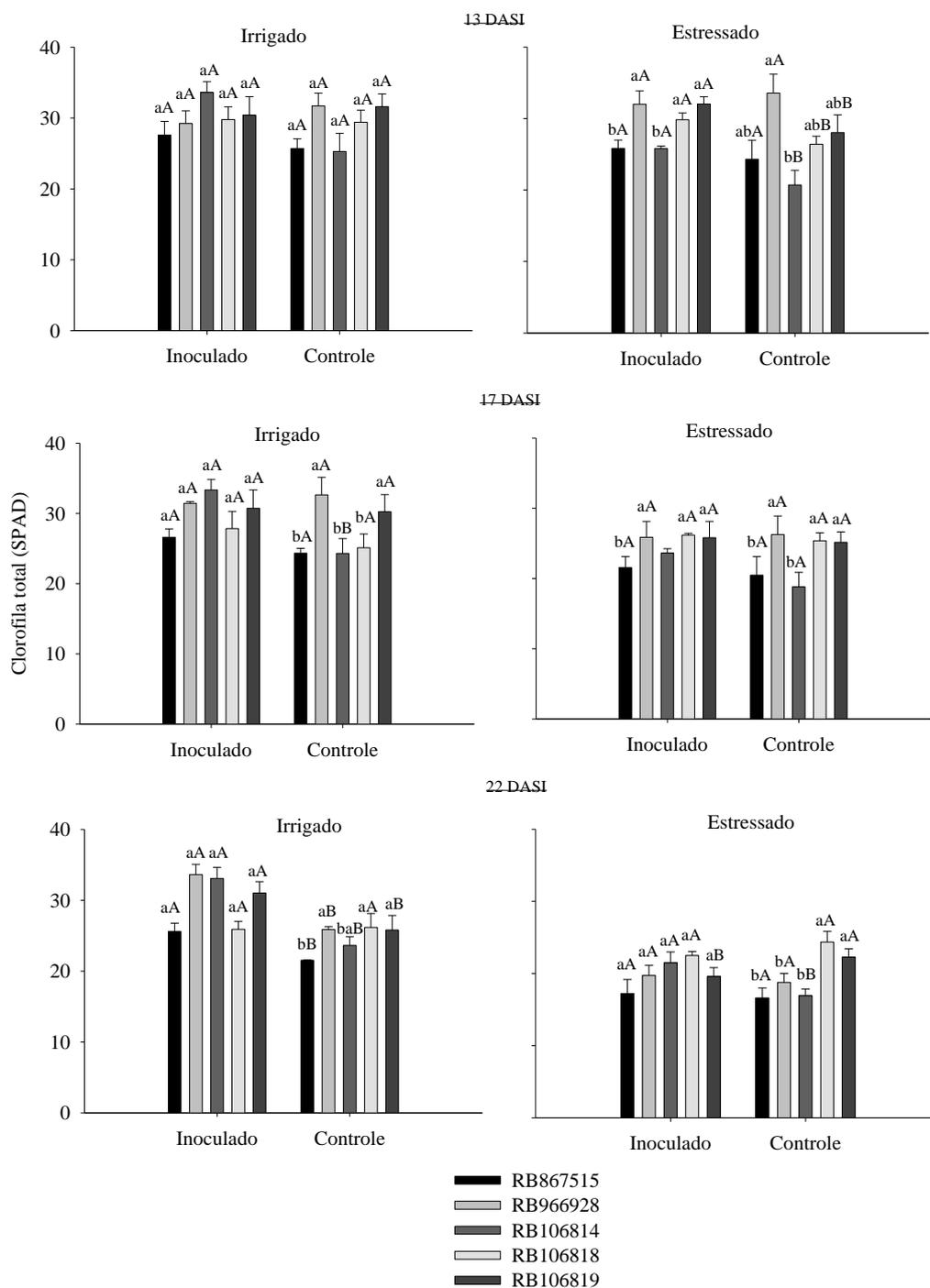
281

282 Figura 3. Condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de plantas de cana-de-açúcar aos 13, 17 e 22 dias
 283 após a suspensão da irrigação (DASI), em função das variedades, aplicação de bactérias diazotróficas e
 284 condições de irrigação. Embrapa Clima Temperado, 2019. Barras seguidas pela mesma letra minúscula
 285 não diferem entre si, quando comparadas as variedades em função do uso de bactérias diazotróficas e
 286 condições de irrigação pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e quando seguidas pela mesma letra maiúscula,
 287 quando comparado o uso de bactérias diazotróficas em função das variedades de cana-de-açúcar e
 288 condições de irrigação pelo teste de t ($p < 0,05$).



289

290 Figura 4. Transpiração líquida ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de plantas de cana-de-açúcar aos 13, 17 e 22 dias após
 291 a suspensão da irrigação (DASI), em função das variedades, aplicação de bactérias diazotróficas e
 292 condições de irrigação. Embrapa Clima Temperado, 2019. Barras seguidas pela mesma letra minúscula
 293 não diferem entre si, quando comparadas as variedades em função do uso de bactérias diazotróficas e
 294 condições de irrigação pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e quando seguidas pela mesma letra maiúscula,
 295 quando comparado o uso de bactérias diazotróficas em função das variedades de cana-de-açúcar e
 296 condições de irrigação pelo teste de t ($p < 0,05$).



299 Figura 5. Clorofila total (SPAD) de plantas de cana-de-açúcar aos 13, 17 e 22 dias após a suspensão da
 300 irrigação (DASI), em função das variedades, aplicação de bactérias diazotróficas e condições de irrigação.
 301 Embrapa Clima Temperado, 2019. Barras seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si,
 302 quando comparadas as variedades em função do uso de bactérias diazotróficas e condições de irrigação
 303 pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e quando seguidas pela mesma letra maiúscula, quando comparado o uso de
 304 bactérias diazotróficas em função das variedades de cana-de-açúcar e condições de irrigação pelo teste de
 305 t ($p < 0,05$).
 306

307 Após 22 dias de restrição hídrica, as plantas foram expostas a um pulso de flash de
308 saturação com $7000 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e então, foram medidos os parâmetros da
309 fluorescência ao longo de 220 segundos e as médias dos valores estão apresentadas na
310 Figura 6. A eficiência quântica (Fv/Fm) foi superior na variedade RB867515 no
311 tratamento irrigado e com o uso de bactérias. E quanto aos tratamentos estressados, os
312 maiores valores de Fv/Fm foram apresentados pelas variedades RB106814 e RB106818
313 inoculadas com bactérias diazotróficas.

314 O rendimento quântico fotoquímico efetivo do FSII (Y(II)) foi superior nas variedades
315 RB867515 e RB966928 irrigadas e com bactérias. Sendo que a RB966928 foi a única
316 variedade que respondeu positivamente ao uso de bactérias diazotróficas também em
317 situação de estresse hídrico, apresentando maiores valores de Y(II) e também de
318 dissipação fotoquímica (qP) e taxa de transporte de elétrons (ETR). Nos tratamentos
319 irrigados, outras variedades se destacaram em relação ao uso de bactérias diazotróficas.
320 A RB106814 apresentou maior qP em relação ao controle, enquanto a RB867515 e a
321 RB106818 apresentaram maiores taxas de transporte de elétrons.

322 Por outro lado, quando observado o conteúdo relativo de água nas folhas das plantas
323 (Figura 7), pode-se observar que todos os tratamentos foram responsivos ao uso de
324 bactérias diazotróficas, com exceção da variedade RB867515 no tratamento estressado.
325 Não houve diferença entre as variedades quando inoculadas, tanto com quanto sem
326 irrigação, sendo as médias dos tratamentos inoculados, bastante superiores aos
327 controles, nas duas condições de irrigação.

328 Plantas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas das variedades
329 RB966928 e RB106819 apresentaram maior potencial osmótico nos tratamentos de
330 restrição hídrica. E embora não tenham apresentado diferenças estatísticas, as demais

331 variedades também apresentaram maiores valores de potencial osmótico nos
332 tratamentos inoculados.

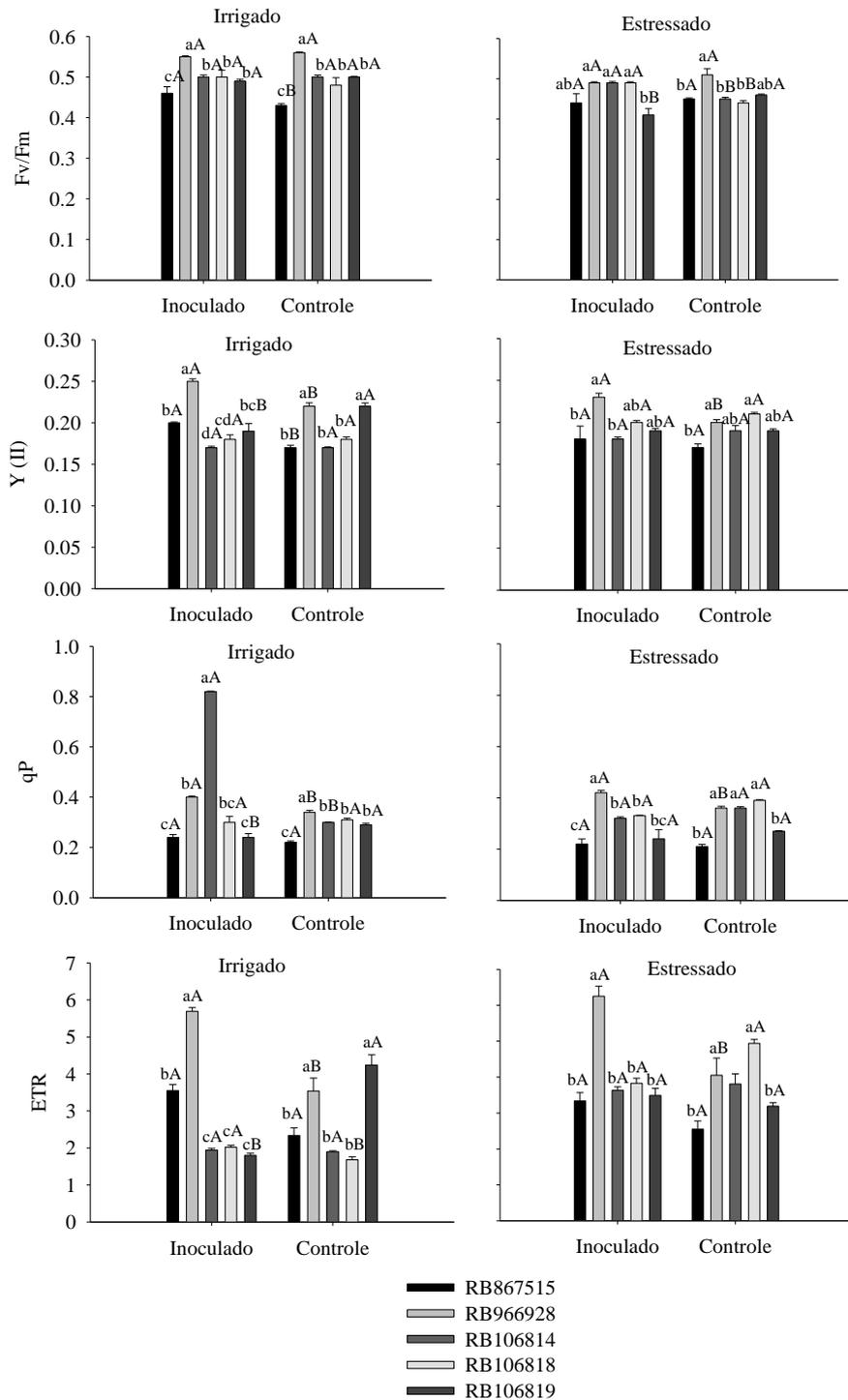
333 Essas respostas positivas na fisiologia das variedades de cana-de-açúcar com o uso de
334 bactérias diazotróficas refletem também no incremento da massa seca das plantas.

335 Ainda na mesma Figura, observa-se que os tratamentos irrigados, os maiores valores de

336 MS foram apresentados pelas variedades RB867515, RB966928 e RB106818

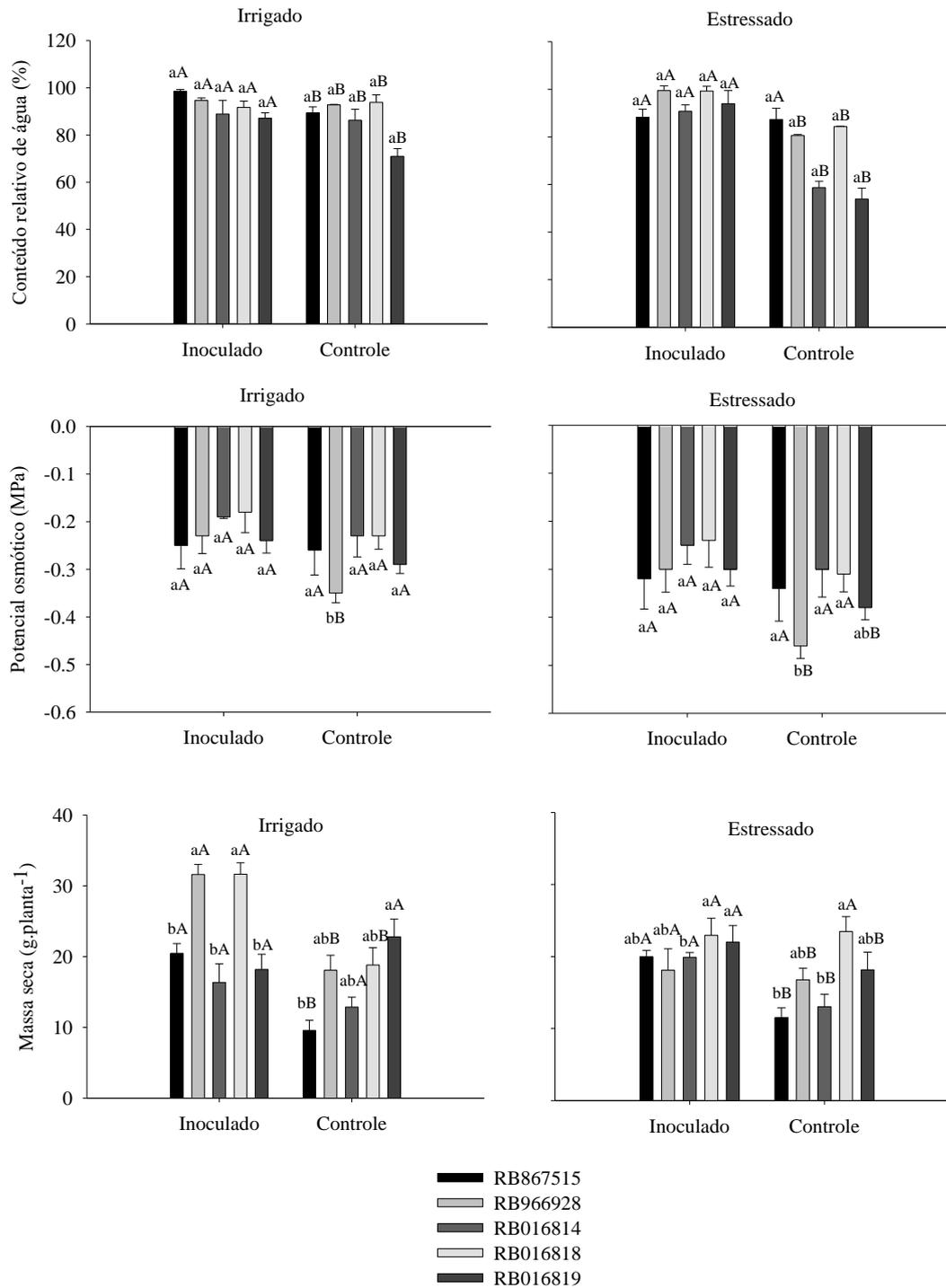
337 inoculadas e quando estressadas, todas as variedades, menos a RB106818 apresentaram

338 incremento de MS maior que o controle sem inoculação de bactérias.



339

340 Figura 6. Eficiência quântica máxima do FSII (Fv/Fm), rendimento quântico fotoquímico efetivo do FSII
 341 (Y(II)), dissipação fotoquímica (qP) e taxa de transporte de elétrons (ETR) de plantas de cana-de-açúcar
 342 aos 22 dias após suspensão da irrigação, em função das variedades, aplicação de bactérias diazotróficas e
 343 condições de irrigação. Embrapa Clima Temperado, 2019. Barras seguidas pela mesma letra minúscula
 344 não diferem entre si, quando comparadas as variedades em função do uso de bactérias diazotróficas e
 345 condições de irrigação pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e quando seguidas pela mesma letra maiúscula,
 346 quando comparado o uso de bactérias diazotróficas em função das variedades de cana-de-açúcar e
 347 condições de irrigação pelo teste de t ($p < 0,05$).



348

349 Figura 7. Conteúdo relativo de água (%), potencial osmótico (MPa) e massa seca da parte aérea de plantas
 350 (g) de cana-de-açúcar, aos 22 dias após a suspensão da irrigação, em função das variedades de cana, uso
 351 de bactérias diazotróficas e condições de irrigação. Embrapa Clima Temperado, 2019. Barras seguidas
 352 pela mesma letra minúscula não diferem entre si, quando comparadas as variedades em função do uso de
 353 bactérias diazotróficas e condições de irrigação pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e quando seguidas pela
 354 mesma letra maiúscula, quando comparado o uso de bactérias diazotróficas em função das variedades de
 355 cana-de-açúcar e condições de irrigação pelo teste de t ($p < 0,05$).

Variável	Irigado					Estressado				
	RB867515	RB966928	RB106814	RB106818	RB106819	RB867515	RB966928	RB106814	RB106818	RB106819
A	Red	Green	Red	Green	Green	Red	Blue	Green	Green	Red
gs	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red
E	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Red	Blue	Green	Red
CL	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Blue
Fv/Fm	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Blue
Y(II)	Red	Red	Green	Green	Blue	Green	Red	Green	Green	Green
qP	Green	Red	Red	Red	Blue	Green	Red	Red	Red	Green
ETR	Green	Red	Green	Red	Blue	Green	Red	Green	Green	Green
CRA	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red
Ψs	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Red
MS	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red

356
357

358 Figura 8. Classificação das variedades de cana-de-açúcar em relação a sua resposta à aplicação de
359 bactérias diazotróficas nas condições de irrigação. Sendo as vermelhas responsivas, verdes neutras e azuis
360 negativas, conforme a variável analisada.

361

362

363 **Discussão**

364

365 Cada planta responde ao estresse de uma forma, sendo essas respostas dependentes da
366 espécie, da variedade, da idade e estágio de desenvolvimento da cultura e também da
367 duração e severidade do déficit hídrico (Chaves et al., 2003; Cambraia, 2005).

368 O estresse hídrico inicia-se com a percepção do déficit hídrico, o qual desencadeia uma
369 sequência de eventos de ordem molecular, finalizando com várias respostas fisiológicas,
370 metabólicas e de desenvolvimento das plantas, sendo a fotossíntese relatada como
371 altamente sensível ao estresse por falta d'água (Bray, 1997). E embora a cana-de-açúcar
372 seja uma cultura considerada moderadamente sensível, as respostas à restrição hídrica
373 foram bastante claras no presente estudo.

374 A assimilação de CO₂ nas plantas de cana-de-açúcar (Figura 2) diminuiu em média 50%
375 ao longo de 22 dias de déficit hídrico, enquanto que nas plantas inoculadas com
376 bactérias diazotróficas, essa média foi em torno de 36%. A manutenção da fotossíntese
377 nos tratamentos inoculados pode estar ligada ao aumento da abertura estomática. Como

378 se pode observar na Figura 3, o uso de bactérias diazotróficas proporcionou um
379 aumento da condutância estomática em praticamente todas as variedades.

380 Estes resultados corroboram com o encontrado pelos autores Han e Lee (2005), onde a
381 inoculação de bactérias garantiu maior fotossíntese e abertura estomática em plantas, e
382 dessa forma aliviaram os efeitos negativos causados por estresse hídrico. A transpiração
383 líquida pelas plantas aumentou nos tratamentos irrigados e também no tratamento
384 controle sob restrição hídrica. Em contrapartida, os tratamentos inoculados e sem
385 irrigação, mantiveram a transpiração em uma taxa média de $0,84 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ nas
386 três avaliações (Figura 4).

387 Com a percepção da falta de água pelas raízes, substâncias osmoativas, como prolina,
388 açúcares solúveis e ácidos orgânicos, podem ter sido produzidas pelas bactérias
389 diazotróficas (Dimkpa et al., 2009). Essas moléculas ao serem translocadas para as
390 folhas estimulam a redução da transpiração (Taiz; Zeiger, 2009), além de proteger as
391 plantas de cana-de-açúcar contra espécies reativas de oxigênio, o que leva à
392 estabilização de membranas, enzimas e proteínas (Molinari et al., 2007).

393 Quanto ao conteúdo de clorofila expresso em índice SPAD (Figura 5), observou-se da
394 primeira (aos 13 dias) para a terceira avaliação (aos 22 dias), a diminuição de 30% nos
395 tratamentos estressados, 10% no controle irrigado e os tratamentos inoculados e
396 irrigados mantiveram o conteúdo de clorofila em torno de 30.

397 Vieira et al. (2014) constaram menores valores nos conteúdos de clorofila na cana-de-
398 açúcar em situação de déficit hídrico, corroborando com a diminuição do conteúdo de
399 clorofila nas plantas estressadas. Entretanto, era esperada a manutenção da clorofila nas
400 folhas das plantas inoculadas, pois o conteúdo de clorofila nas plantas é proporcional ao
401 quanto de nitrogênio foi absorvido (Blackmer; Schepers, 1994), porém, apenas a

402 variedade RB106814 respondeu positivamente ao uso de bactérias diazotróficas quando
403 estressada.

404 A degradação das clorofilas em situação de estresse hídrico se dá a partir da produção
405 de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical superóxido (O_2^-), o peróxido
406 de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete (1O_2) e a clorofila tripleto ($^3Chl^*$) (Noctor,
407 1998; Mittler, 2002). Essas EROs são extremamente reativas às proteínas, DNA, RNA
408 e, principalmente, aos lipídios de membrana, ocasionando a perda de seletividade e a
409 capacidade de compartimentalização celular. Além disso, é responsável pela ocorrência
410 de danos fotoinibitórios e fotooxidativo, e se manifestam nos tecidos das plantas em
411 forma de necrose e/ou clorose (Karpinski et al., 2002).

412 Em um estudo realizado por Hasani et al. (2014), os autores afirmam que a
413 fluorescência da clorofila pode ser introduzida como um método adequado para
414 identificar tolerância de plantas ao estresse. Em adição a isso, Mutava et al. (2011),
415 afirmam que plantas tolerantes ao déficit hídrico mantêm o resfriamento foliar, via
416 abertura dos estômatos, o que evita os danos fotoquímicos. E isto é confirmado pelos
417 tratamentos inoculados que tiveram a eficiência quântica do FSII (F_v/F_m) superior aos
418 controles (Figura 6).

419 Em relação aos demais parâmetros da fluorescência da clorofila, $Y(II)$, qP e ETR , a
420 variedade RB966928 foi a única que respondeu ao uso de bactérias diazotróficas e
421 manteve os valores superiores ao controle. A manutenção do mecanismo fotossintético
422 nesta variedade é um resultado extremamente positivo, visto que essa se mantém desde
423 o ano de 2015 como a mais plantada no Brasil (Braga Junior, et al., 2019) inclusive em
424 regiões que enfrentam períodos extensos de déficit hídrico.

425 A fotossíntese de plantas inoculadas com bactérias pode ser estimulada pela melhor
426 nutrição da planta (Schultz et al., 2016), maior conteúdo de clorofila (Matoso et al.,

427 2020) ou maior transporte de elétrons (Kaschuk et al., 2009), além da manutenção do
428 conteúdo de água na folha, regulação do potencial osmótico e condutância estomática
429 (Hungria et al., 2010). Além disso, bactérias diazotróficas proporcionam o
430 desenvolvimento do sistema radicular (Girio et al., 2015) e a produção de massa seca
431 (Mambach et al 2017), o que também pode resultar na manutenção da fotossíntese
432 (Taiz; Zeiger, 2009).

433 Na Figura 7, observa-se que de forma geral, as variedades de cana-de-açúcar
434 responderam ao uso de bactérias diazotróficas, mantendo o conteúdo relativo de água na
435 folha, o potencial osmótico e a massa seca superiores aos controles sem bactérias. Em
436 cana-de-açúcar, alterações metabólicas na fotossíntese geralmente acontecem a partir de
437 um potencial osmótico foliar de -0,37 MPa (Du et al., 1996) e os tratamentos inoculados
438 atingiram o potencial médio de -0,28, enquanto os controles em torno de -0,36 MPa.

439 O conteúdo relativo de água nas variedades inoculadas mantidas em déficit hídrico foi
440 semelhante aos tratamentos inoculados e irrigado e em média, 23% superior aos
441 controles sem inoculação de bactérias. E tendo em vista que a diminuição da umidade
442 do substrato nos tratamentos inoculados foi semelhante aos controles (Figura 1), isto
443 provavelmente ocorreu devido ao fechamento mais eficiente dos estômatos, que
444 manteve a taxa de transpiração líquida menor e o potencial osmótico maior nas plantas
445 inoculadas (Lawlor, 2013). Além disso, como esperado, a presença de bactérias
446 diazotróficas estimulou o incremento de massa seca nas plantas.

447 Estas respostas das variedades de cana-de-açúcar em relação ao uso de bactérias
448 diazotróficas em situação de déficit hídrico são extremamente positivas, embora cada
449 variedade tenha apresentado um comportamento diferente da outra. Afinal, todas elas
450 tiveram alguma característica melhorada pelo uso de bactérias, seja pela manutenção da
451 fase física ou bioquímica da fotossíntese, ou ainda, no conteúdo de água na folha e no

452 incremento de massa seca das plantas (figura 8). O que propiciou às plantas de cana-de-
453 açúcar uma redução aos efeitos do estresse hídrico durante 22 dias sem irrigação.

454

455 **Conclusão**

456

457 A aplicação da mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas em cinco variedades
458 de cana-de-açúcar proporciona aumento da assimilação líquida de carbono em 15%, do
459 conteúdo de clorofila em 30%, e do potencial osmótico em 28% nas plantas
460 comparando ao controle não inoculado, além do rendimento de massa seca. Também é
461 capaz de manter a condutância estomática e o conteúdo relativo de água nas folhas e
462 diminuir a transpiração líquida das plantas em situação de déficit hídrico em 6%.

463 A inoculação também influencia positivamente os parâmetros da fluorescência da
464 clorofila, aumentando a eficiência quântica máxima do FSII, o rendimento quântico
465 fotoquímico efetivo do FSII a dissipação fotoquímica e a taxa de transporte de elétrons.
466 Logo, pode-se concluir que a presença de bactérias diazotróficas melhora as
467 características morfo-fisiológicas, colaborando com a mitigação dos efeitos do déficit
468 hídrico em plantas de cana-de-açúcar, sendo dependente da variedade a magnitude de
469 resposta à aplicação, as quais podem ser classificadas como responsivas (RB867515,
470 RB966928, RB106814 e RB106819) e neutra (RB106818).

471

472

473 **Referências**

474

475

476 Baker, N. R., 2008. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo.
477 Annual Review of Plant Biology. 59 (1), 89-113.
478 <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>.

479

480 Baldani, J.I., Baldani, V.L.D., Seldin, L., Döbereiner, J., 1986. Characterization of
481 *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing

- 482 bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology. 36, 86–
483 93. <https://doi.org/10.1099/00207713-36-1-86>.
- 484
- 485 Baldani, J.I., Pot, B., Kirchhof, G., Falsen, E., Baldani, V.L.D., Olivares, F.L., Hoste,
486 B., Kersters, K., Hartmann, A., Gillis, M., Döbereiner, J., 1996. Emended description of
487 *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen,
488 as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical
489 isolates EF group 1 as *Herbaspirillum* species 3. International Journal of Systematic and
490 Evolutionary Bacteriology. 46, 802–810. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-3-802>
- 491
- 492 Baldani, I., Videira, S., Reis, V. M., Boddey, L. H., 2014. The art of isolating nitrogen-
493 fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical
494 guide for microbiologists. Plant and Soil 384, 413-431. [https://doi.org/10.1007/s11104-](https://doi.org/10.1007/s11104-014-2186-6)
495 014-2186-6.
- 496
- 497
- 498 Blackmer, T.M.; Schepers, J.S., 1994. Techniques for monitoring crop nitrogen status in
499 corn. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 25, 1791-1800.
500 <https://doi.org/10.1080/00103629409369153>.
- 501
- 502 Braga Junior, R. L. de C.; Landell, M. G. A.; Silva, D. N.; Bidoia, M. P.; Silva, T. N.;
503 Tomzinho Junior, J. R.; Silva, V. H. P., 2018. Censo varietal IAC no brasil - safra
504 2016/17 e na região centro-sul – safra 2017/18. Revista Canavieiros, nº 140 ano XI, 40-
505 57.
- 506
- 507 Braga Junior, R. L. C.; Landell, M. G. A.; Silva, D. N.; Bidóia, M. A. P.; Silva, T. N.;
508 Thomazinho Júnior, J. R.; Silva, V. H. P.; Anjos, I. A., 2019. Censo varietal IAC de
509 cana-de-açúcar no Brasil - Safra 2017/18 e na região centro-sul - safra 2018/19. Série
510 Tecnologia APTA. Boletim Técnico IAC. 221.
- 511
- 512 Bray, E. A., 1997. Plant responses to water deficit. Trends in Plant Science. 2, 48-54.
513 [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)82562-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)82562-9).
- 514
- 515 Cambraia, J., 2005. Aspectos bioquímicos, celulares e fisiológicos dos estresses
516 nutricionais em plantas. In: NOGUEIRA, R.J.M.C.; ARAÚJO, E. DE L.;
517 WILLADINO, L.G.; CAVALCANTE, U.M.T. (eds.). Estresses ambientais: danos e
518 benefícios em plantas. Recife: UFRPE. 2, 95-104.
- 519
- 520 Cavalcante, V., Döbereiner, J., 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium
521 isolated from sugarcane. Plant and soil 108, 23–31.
522 <https://doi.org/10.1007/BF02370096>.
- 523
- 524 CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento, 2019. Acompanhamento da safra
525 brasileira de cana-de-açúcar, v.6 - Safra 2019/20, n.1 - Primeiro levantamento, maio de
526 2019. <https://www.conab.gov.br>. Acesso em: 20 out. 2019.
- 527
- 528 Chaves, M.M.; Maroco, J.P.; Pereira, J.S., 2003. Understanding plant responses to
529 drought - from genes to the whole plant. Functional Plant Biology. 30, 239-264.
530 <https://doi.org/10.1071/FP02076>.
- 531

- 532 Chaves, V.A.; Santos, S.G.; Schultz, N.; Pereira, W.; Sousa, S.J. Monteiro, R.C.; Reis,
533 V.M., 2015. Initial development of two sugarcane varieties inoculated with diazotrophic
534 bacteria. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 39, 1595–1602.
535 DOI: 10.1590/01000683rbc20151144
536
537
- 538 Dimkpa, C.; Weinand, T.; Asch, F., 2009. Plant–rhizobacteria interactions alleviate
539 abiotic stress conditions. *Plant, Cell and Environment*. 32, 1682–1694.
540 <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x>.
541
- 542 Du, Y.C.; Kawamitsu, Y.; Nose, A. ; Hiyane, S.; Murayama, S. ; Wasano, K.
543 Uchida, Y., 1996. Effects of Water Stress on Carbon Exchange Rate and Activities of
544 Photosynthetic Enzymes in Leaves of Sugarcane (*Saccharum* sp.). *Australian Journal of*
545 *Plant Physiology*. 23, 719-726. <https://doi.org/10.1071/PP9960719>.
546
- 547 FAOSTAT, 2016. Food and agricultural commodities production. Disponível em
548 <<http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=en>> Acesso em:
549 dezembro de 2019.
550
- 551 Farooq, M.; Wahid, A.; Kobayashi, D.; Fujita, D.; Basra, S. M. A., 2009. Plant drought
552 stress effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*.
553 29, 185-212. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_12.
554
- 555 Ghannoum, O., 2009. C4 photosynthesis and water stress. *Annals of Botany*. 103, 635 –
556 644. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn093>.
557
- 558 Gírio, L.A. da S.; Dias, F.L.F.; Reis, V.M.; Urquiaga, S.; Schultz, N.; Bolonhezi, D.;
559 Mutton, M.A., 2015. Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no
560 crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas. *Pesquisa*
561 *Agropecuária Brasileira*. 50, 33-43. [http://dx.doi.org/10.1590/S0100-](http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2015000100004)
562 [204X2015000100004](http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2015000100004).
563
- 564 Gonçalves, E. R.; Ferreira, V. M.; Silva, J. V.; Endres, L.; Barbosa, T. P.; Duarte, W. de
565 G., 2010. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em variedades de cana-de-açúcar
566 submetidas à deficiência hídrica. *Rev. bras. eng. agríc. ambient*. 14 (4); Campina
567 Grande. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662010000400006>.
568
- 569 Gross, J. A.; Cassol, R., 2015. Índice de anomalia de chuva do estado o Rio Grande do
570 Sul. *Ambiência*. 11 (3), 529-543.
571 <https://revistas.unicentro.br/index.php/ambiencia/article/view/3300>.
572
- 573 Guimarães. T.G.; Fontes, P.C.R.; Pereira, P.R.G.; Alvarez V., V.H.; Monnerat, P.H.
574 Teores de clorofila determinados por medidor portátil e sua relação com formas de
575 nitrogênio em folhas de tomateiro cultivado em dois tipos de solo. *Bragantia*,
576 Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 209-216, 1999. [https://doi.org/10.1590/S0006-](https://doi.org/10.1590/S0006-87051999000100020)
577 [87051999000100020](https://doi.org/10.1590/S0006-87051999000100020)
578
- 579 Han, H. S.; Lee, K. D., 2005. Plant growth promoting rhizobacteria effect on
580 antioxidant status, photosynthesis mineral uptake and growth of lettuce under soil
581 salinity. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 1 (3), 210-215.

- 582 <http://www.aensiweb.net/AENSIWEB/rjabs/rjabs/210-215.pdf>.
583
- 584 Hungria, M.; Campo, R. J.; Souza, E. M.; Pedrosa, F. O., 2010. Inoculation with
585 selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize
586 and wheat in Brazil. *Plant Soil*. 331, 413-425.
587 <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>.
588
- 589 Jaleel, C.A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H.J.,
590 Somasundaram, R., Vam, R.P., 2009. Drought stress in plants: a review on
591 morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol.* 11, 100–
592 105. DOI: 08–305/IGC-DYT/2009/11–1–100–105.
593
- 594 Kaschuk, G.; Kuyper, T.W.; Leffelaar, P.A.; Hungria, M.; Giller, K. E. Are the rates of
595 photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular
596 mycorrhizal symbioses? *Soil Biology & Biochemistry*. 41, 1233-1244.
597 <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.03.005>.
598
- 599 Karpinski, S. et al., 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism
600 in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment*. 25, 275- 294.
601 <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00814.x>.
602
- 603 Landell, M.G; Campana, M.P.; Figueiredo, P. Xavier, M.A.; Anjos, I.A.; Dinardo-
604 Miranda, L.L.; Scarpari, M.S.; Garcia, J.C.; Bidóia, M.A.P.; Silva, D.N.; Mendonça,
605 J.R.; Kanthack, R.A.D.; Campos, M.F.; Brancalião, S.R.; Petri, R.H.; Miguel P.E.M.,
606 2012. Sistema de multiplicação de de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas
607 (MPB), oriundas de gemas individualizadas. Ribeirão Preto: Instituto Agrônômico de
608 Campinas. IAC, 109.
609 [https://www.udop.com.br/ebiblio/pagina/arquivos/2013_sistema_multiplicacao_cana_c
610 om_mudas_pre_brotadas.pdf](https://www.udop.com.br/ebiblio/pagina/arquivos/2013_sistema_multiplicacao_cana_com_mudas_pre_brotadas.pdf).
611
- 612 Lawlor D.W., 2013. Genetic engineering to improve plant performance under drought:
613 physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. *Journal of*
614 *Experimental Botany*, 63, 695–709. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers326>.
615
- 616 Lin, S.Y., Hameed, A., Shen, F.T., Liu, Y.C., Hsu, Y.H., Shahina, M., Lai, W.A.,
617 Young, C.C., 2014. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated
618 from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* 1989 as *Niveispirillum*
619 *irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* 1983 as
620 *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*. 105, 1149-1162.
621 <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0176-6>.
622
- 623 Magalhães, F.M.; Baldani, J. I.; Souto, S.M.; Kuykendall, J.R.; Döbereiner, J., 1983. A
624 new acid-tolerant *Azospirillum species*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 55,
625 417–430.
626
- 627 Mambach, G. L.; Kotowski, I. E.; Schneider, F. J. A.; Mallmann, M. S.; Bonfada, E. B.;
628 Portela, V. O.; Bonfada, E. B.; Kaiser, D. R., 2017. Resposta da inoculação com
629 *azospirillum brasilense* nas culturas de trigo e de milho safrinha. *Revista Scientia*
630 *Agraria*, SA. 18 (2), 97-103. <http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v18i2.51475>.
631

- 632 Markwell, J.; Osterman, J.C.; Mitchell, J.L. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf
633 chlorophyll meter. *Photosynthesis Research*, v. 46, p. 467-472, 1995.
634 <https://doi.org/10.1007/BF00032301>
635
- 636 Matoso, E.S.; Avancini, A. R. ; Maciel, K. F. K. ; Alves, M. C. ; Simon, E. D. T. ; Silva,
637 M. T. ; Dias, N. L. ; Silva, S. D. A. E., 2020. Influência do uso de um mix de bactérias
638 diazotróficas na biometria e no conteúdo de clorofila de plantas de cana-de-açúcar.
639 *Brazilian Journal of Development*. 6, 7261-7274. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n2-141>.
640
- 641 Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant*
642 *Science*. 7 (9), 405-410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9).
643
- 644 Molinari, H. B. C.; Marur, C. J.; Daros, E.; Campos, M.K.F.de; Carvalho, J. F. R. P.;
645 Bessalho Filho, J. C.; Pereira, L. F. R.; Vieira, L. G. E., 2007. Evaluation of the stress-
646 inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic
647 adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiologia Plantarum*. 130,
648 218-229. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00909.x>.
649
- 650 Moutia, J. Y.; Saumtally, S.; Spaepen, S.; Vanderleyden, J., 2010. Plant growth
651 promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane. *Plant Soil*. 337, 233–242. DOI
652 10.1007/s11104-010-0519-7
653
- 654 Mutava, R. N. et al., 2011. Characterization of sorghum genotypes for traits related to
655 drought tolerance. *Field Crops Research*, Amsterdam. 123 (1), 10-18.
656 <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.04.006>.
657
- 658 Noctor, G.; Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under
659 control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* .49, 249-279.
660 <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.249>.
661
- 662 Rampino, P.; Pataleo, S.; Gerardi, C.; Mita, G.; Perrotta, C., 2006. Drought stress
663 response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive
664 genotypes. *Plant Cell Environ*. 29, 2143–2152.
665 <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01588.x>.
666
- 667 Reis, V.M.; Estrada-de Los Santos, P.; Tenorio-Salgado, S.; Vogel, J.; Stoffels, M.;
668 Guyon, S.; Mavingui, P.; Baldani, V.L.D.; Schmid, M.; Baldani, J.I.; Balandreau, J.;
669 Hartmann, A.; Caballero-Mellado, J., 2004. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel
670 nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *International Journal of Systematic and*
671 *Evolutionary Bacteriology*. 54, 2155–2162. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02879-0>.
672
- 673 Reis, V.M., Baldani, I.J., Urquiaga, A.S., 2009. Recomendação de uma mistura de
674 estirpes de cinco bactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação de cana-de-açúcar:
675 *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR
676 11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Azospirillum amazonense* (BR
677 11145) e *Burkholderia tropica* (BR 11366). Circular Técnica, Embrapa Agrobiologia,
678 Seropédica, RJ.
679

- 680 Robertson, M. J.; Wood, A. W.; Muchow, R. C., 1996. Growth of sugarcane under high
681 input conditions in tropical Australia. I. Radiation use, biomass accumulation and
682 partitioning. *Field Crops Research*. 48, 11-25.
683 [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(96\)00041-X](https://doi.org/10.1016/0378-4290(96)00041-X).
684
- 685 Schultz, N.; Pereira, W.; Reis, V. M.; Urquiaga, S. S., 2016. Produtividade e diluição
686 isotópica de ¹⁵N em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. *Pesq.*
687 *agropec. bras.* 51 (9).
688 <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2016000900059>.
689
- 690 Schultz, N., Silva, J.A. da, Sousa, J.S., Monteiro, R.C., Oliveira, R.P., Chaves, V.A.,
691 Pereira, W., Silva, M.F.da, Baldani, J.I., Boddey, R.M., Reis, V.M., Urquiaga, S., 2014.
692 Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. *Ver. Bras. Ciênc. Solo*. 38, 407–
693 414. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832014000200005>.
694
- 695 Silveira, J.A.G.; Viégas, R.A.; Rocha, I.M.A.; Moreira, R.A.; Oliveira, J.T.A., 2003.
696 Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced
697 proteolysis in cashew leaves. *Journal of Plant Physiology*. 160, 115-123.
698 <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00890>.
699
- 700 Souza, E. R. de; Freire, M. B. G. dos S.; Cunha, K. P. V. da; Nascimento, C. W. A. do;
701 Ruiz, H. A.; Lins, C. M. T., 2012. Biomass, anatomical change and osmotic potential
702 in *Atriplex numulária* L. indl. cultivated in sodic saline soil under water stress.
703 *Environmental and Experimental Botany*. 82, 20-27.
704 <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.03.007>.
705
- 706 Taiz, L.; Zeiger, E., 2009. *Fisiologia vegetal*, 4 ed. Porto Alegre, Artmed. 848.
707
- 708 Vieira, G. H. S.; Mantovani, E. C.; Sediyaama, G. C.; Delazari, F. T. , 2014.
709 Morphophysiological indicators of water stress on sugarcane as a function of irrigation
710 depths. *Bioscience Journal*. 30 (3).
711 <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/15026/14482>.
712
713
- 714 Welbaum, G.E., Meinzer, F.C., 1990. Compartmentation of solutes and water in
715 developing sugarcane stalk tissue. *Plant Physiology*. 93, 1147–1153.
716 <https://doi.org/10.1104/pp.93.3.1147>.

7. Artigo 4

Produção, maturação e composição químico-bromatológica de variedades de cana-de-açúcar em função da aplicação de bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada

(Segundo norma do Journal of Animal Science)

1 **Produção, maturação e composição químico-bromatológica de variedades de cana-de-**
2 **açúcar em função da aplicação de bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada**

3 **Resumo**

4 Há muitas recomendações para que a cana-de-açúcar não seja indicada como alimento para
5 animais de bom potencial genético, pois apresenta baixo teor proteico e de minerais e fibra de
6 baixa qualidade. Contudo, acredita-se que a aplicação de bactérias diazotróficas endofíticas
7 podem proporcionar mudanças na histologia dos tecidos vegetais, que afetam o teor de
8 proteína bruta, os carboidratos estruturais e solúveis, energia e outros nutrientes que são
9 essenciais para a nutrição animal. Diante disto, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da
10 aplicação de uma mistura de cinco bactérias diazotróficas e da adubação nitrogenada sobre a
11 produção, maturação e composição químico-bromatológica de variedades de cana-de-açúcar.
12 Os tratamentos foram formados conforme a combinação dos cinco genótipos de cana-de-
13 açúcar (RB867515, RB966928, RB106814, RB106818 e RB106819) com quatro condições
14 de inoculação e adubação nitrogenada em cobertura, sendo elas: CBSN - com bactérias;
15 SBCN - com adubação nitrogenada (dose recomendada); CBCN - com bactérias + adubação
16 nitrogenada e SBSN - controle sem nenhum tipo de tratamento. Foram realizadas medidas de
17 sólidos solúveis totais dos 180 dias após o transplante até a colheita do experimento, onde foi
18 avaliada a produtividade e feita a amostragem de material para as avaliações químico-
19 bromatológicas: matéria seca, nitrogênio acumulado, proteína bruta, fibra em detergente
20 neutro, fibra em detergente ácido, holocelulose, celulose, hemicelulose, lignina, extrativos
21 totais e cinzas. De acordo com os resultados do presente estudo, conclui-se que a aplicação de
22 bactérias diazotróficas de forma isolada ou em conjunto com a adubação nitrogenada,
23 aumenta a produtividade e os sólidos solúveis totais, antecipando a maturação, além de
24 melhorar a composição químico-bromatológica das plantas de cana-de-açúcar. No entanto, a
25 magnitude de resposta aos tratamentos aplicados, depende da variedade estudada.

26 **Palavras-chave:** alimentação animal, digestibilidade, fibras, sólidos solúveis totais.

27 **Production, maturity and chemistry-bromatological composition of sugarcane varieties**
28 **according to the application of diazotrophic bacteria and nitrogen fertilization**

29 **Abstract**

30 There are many recommendations against the use of sugarcane as food for animals with good
31 genetic potential, because it has low protein and mineral content and low quality fiber.
32 However, it is believed that the application of endophytic diazotrophic bacteria may provide
33 changes in the histology of plant tissues, which affect the crude protein content, structural and
34 soluble carbohydrates, energy and other nutrients that are essential for animal nutrition. In
35 view of this, the objective of the work was to evaluate the effects of applying a mixture of
36 five diazotrophic bacteria and nitrogen fertilization on the production, maturation and
37 chemical-chemical composition of sugarcane varieties. The treatments were formed
38 according to the combination of the five sugarcane genotypes (RB867515, RB966928,
39 RB106814, RB106818 and RB106819) with four conditions of inoculation and nitrogen
40 fertilization in coverage, being: CBSN - with bacteria; SBCN - with nitrogen fertilization
41 (recommended dose); CBCN - with bacteria + nitrogen fertilization and SBSN - control
42 without any type of treatment. Total soluble solids measurements were taken from 180 days
43 after transplantation until the harvest of the experiment, where productivity was evaluated
44 and material sampled for chemical-bromatological evaluations: dry matter, accumulated
45 nitrogen, crude protein, neutral detergent fiber , acid detergent fiber, holocellulose, cellulose,
46 hemicellulose, lignin, total extracts and ashes. According to the results of the present study, it
47 is concluded that the application of diazotrophic bacteria alone or in conjunction with
48 nitrogen fertilization, increases productivity and total soluble solids, anticipating maturation,

49 in addition to improving the chemical-bromatological composition of sugarcane plants.
50 However, the magnitude of response to the treatments applied depends on the variety studied.

51 **Keywords:** animal feed, digestibility, fiber, total soluble solids.

52

53 **Lista de abreviações:**

54 MS – matéria seca

55 PB – proteína bruta

56 FDN – fibra detergente neutro

57 FDA – fibra detergente ácido

58 HOL – holocelulose

59 CEL – celulose

60 HEM – hemicelulose

61 LIG – lignina

62 ET – extrativos totais

63 CZ – cinzas

64 SST - sólidos solúveis totais

65

66

67

68

INTRODUÇÃO

69

70 A cana-de-açúcar pode ser empregada na alimentação animal, de forma in natura ou
71 ensilada, devido ao seu alto rendimento de matéria seca e valor nutritivo adequado na
72 maturação. No entanto, a cana apresenta desafios na produção de silagem devido ao alto teor
73 de carboidratos solúveis e leveduras (ÁVILA et al., 2010), que convertem parte dos açúcares
74 em altos níveis de compostos orgânicos voláteis, principalmente etanol, o que resulta em
75 grandes perdas de matéria seca (DANIEL et al., 2013) e há muitas recomendações para que a
76 cultura não seja indicada como alimento para animais de bom potencial genético, pois
77 apresenta baixo teor proteico e de minerais e fibra de baixa qualidade (SIQUEIRA et al.,
78 2012).

79 A qualidade de uma forragem geralmente é confundida com seu valor nutricional, mas
80 na verdade abrange outras características como composição química, digestibilidade e
81 consumo de forragem e de nutrientes, dentre outras características, que resultam em variações
82 sobre a alimentação o desempenho dos animais. Assim, a espécie da planta, as condições
83 climáticas e o manejo da cultura também são fatores importantes serem levados em conta na
84 hora de produzir uma forragem de qualidade (REIS et al. 2016). O elevado potencial de
85 produção de cana-de-açúcar tende a proporcionar alta massa de forragem por área
86 (produtividade), contudo, para que essas exigências sejam atendidas, algumas características
87 precisam ser melhoradas.

88 Contudo, acredita-se que a aplicação de bactérias diazotróficas endofíticas podem
89 proporcionar mudanças na histologia dos tecidos vegetais, como a deposição das células do
90 mesofilo, parênquima e esclerênquima, que têm diferentes paredes celulares e concentrações
91 do conteúdo celular. Alterações anatômicas morfológicas e histológicas afetam o teor de

92 proteína bruta, os carboidratos estruturais e solúveis, energia e outros nutrientes que são
93 essenciais para a nutrição animal (SKONIESKI et al., 2017).

94 Além disso, elas podem auxiliar no desenvolvimento vegetal, promover o crescimento
95 radicular (SCHULTZ et al., 2014; CHAVES et al., 2015), melhorar a absorção de nutrientes
96 (BARRETTI et al., 2008) e promover a fixação biológica de nitrogênio, resultando na
97 promoção de crescimento, aumento da produtividade e diminuição da dependência da cana-
98 de-açúcar pela adubação nitrogenada (MALAVOLTA, 2006).

99 No entanto, poucos estudos envolvendo a cana-de-açúcar para fins de alimentação
100 animal são desenvolvidos, principalmente no que tange ao uso de bactérias diazotróficas
101 endofíticas para melhoria das qualidades da cultura como forrageira. Diante disto, o objetivo
102 deste trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação de uma mistura de cinco bactérias
103 diazotróficas e da adubação nitrogenada sobre a produção, maturação e composição químico-
104 bromatológica de variedades de cana-de-açúcar.

105 MATERIAL E MÉTODOS

106 O experimento foi realizado na área experimental da Embrapa Clima Temperado
107 (Sede), em Pelotas/RS, cujas coordenadas são 31° 40' 16" S e 52° 26' 28". O delineamento
108 experimental adotado foi o de blocos casualizados, com quatro repetições, onde os fatores
109 foram arrançados em um esquema fatorial 5x4, totalizando 20 tratamentos e 80 parcelas,
110 compostas por três linhas de três metros. Os tratamentos foram formados conforme a
111 combinação dos cinco genótipos de cana-de-açúcar (RB867515, RB966928, RB106814,
112 RB106818 e RB106819) com quatro condições de inoculação e adubação nitrogenada em
113 cobertura, aqui denominadas de tratamentos aplicados, e sendo elas: CBSN - com bactérias;
114 SBCN - com adubação nitrogenada (dose recomendada); CBCN - com bactérias + adubação
115 nitrogenada e SBSN - controle sem nenhum tipo de tratamento.

116 Antecipando o transplante das mudas para o campo, foi realizada uma adubação de
117 correção com dose recomendada de nitrogênio, fósforo e potássio (20 kg ha⁻¹, 140 kg ha⁻¹ de
118 P₂O₅ e 130 kg ha⁻¹ de K₂O) e foi efetuado o preparo do solo da área experimental para o
119 transplante das mudas, que foi realizado de forma manual, utilizando-se uma ferramenta do
120 tipo saraquá. No decorrer do experimento, foi realizada a adubação nitrogenada em cobertura
121 com a dose de 80 kg ha⁻¹, apenas nos tratamentos em que deveria conter a mesma. Além
122 disso, foram efetuados os devidos controles de plantas daninhas para que o cultivo da cana-
123 de-açúcar se dê em ambiente limpo, livre de competições.

124 Quanto às avaliações, foram realizadas medidas de sólidos solúveis totais (°Brix) dos
125 180 dias após o transplante até a colheita do experimento, onde foi avaliada a produtividade e
126 feita a amostragem de material para as avaliações químico-bromatológicas. Para este fim
127 foram analisadas as seguintes variáveis: nitrogênio acumulado, matéria seca (MS), proteína
128 bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), holocelulose
129 (HOL), celulose (CEL), hemicelulose (HEM), lignina (LIG), extrativos totais (ET) e cinzas
130 (CZ).

131 Os sólidos solúveis totais (SST) foram medidos com o auxílio de um refratômetro
132 digital e para avaliar a produtividade foram cortadas duas touceiras em sequência, na linha
133 central da parcela e na parte central da linha, as quais foram pesadas com auxílio de balança
134 digital. A biomassa total foi conhecida através da pesagem das touceiras inteiras e aplicação
135 da fórmula $BT = (PT \times ((100/E) \times 100)/1000)$, onde PT se refere a massa de duas touceiras
136 inteiras com colmos e folhas (kg) e E se refere ao espaçamento (1,4 m).

137 A massa seca foi determinada pelo método de secagem convencional, em estufa de
138 circulação forçada de ar por volta de 72 horas, à temperatura média de 60°C, quando as

139 amostras atingiram massa constante. E para a determinação do conteúdo de cinzas foi
140 utilizado o procedimento de laboratório do Instituto Agrônômico (ABREU, 2007).

141 A holocelulose foi determinada a partir da oxidação da lignina em um meio ácido,
142 proveniente da reação entre clorito de sódio e ácido acético a quente. Já a celulose segundo a
143 norma TAPPI T 203 cm-99 (2009), foi determinada a partir da fração de holocelulose que
144 não se dissolveu em solução aquosa a 17,5% (m/v) de hidróxido de sódio. E depois de
145 conhecidos os valores de holocelulose e de celulose dos tratamentos, pode-se, por meio do
146 cálculo da diferença, determinar o teor de hemicelulose. A Fibra Detergente Neutro (FDN)
147 corresponde à celulose, hemicelulose e lignina e a Fibra Detergente Ácido (FDA) representa
148 apenas as frações celulose e lignina.

149 O nitrogênio acumulado foi determinado através da análise do tecido vegetal, com
150 amostra sólida em Analisador Elementar (Flash EA1112, Thermo Electron Corporation,
151 Milan, Italy). Esta técnica se baseia no método de Pregal e Dumas, onde as amostras são
152 queimadas em um ambiente de oxigênio puro, e os gases resultantes desta combustão são
153 carregados por hélio de alta pureza (um gás inerte) até a zona de detecção (Carmo et al. 2000).
154 E a proteína bruta foi determinada através da multiplicação do total de nitrogênio por 6,25,
155 pois as proteínas têm em média 16% de N no aminoácido.

156 Os dados gerados no experimento foram submetidos à análise de pressupostos e em
157 seguida, esses foram submetidos à análise de variância. Em caso de significância, as médias
158 dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O tempo
159 (meses) foi incluído como um fator aleatório no modelo para sólidos solúveis totais, com o
160 intuito de se observar as curvas de maturação de cada tratamento, portanto, os resultados
161 foram apresentados de forma gráfica e de acordo com as equações de regressão linear de
162 ajuste para cada tratamento, elaborados no programa SigmaPlot (versão 10.0).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

163

164 Como se pode observar na Tabela 1, com a aplicação do teste F da análise de
165 variância, identificou-se o efeito isolado das variedades de cana-de-açúcar e dos tratamentos
166 aplicados para conteúdo de cinzas, holocelulose, celulose e relação FDN/SST. Já em relação
167 ao nitrogênio acumulado e proteína bruta, as plantas responderam somente para a variedade
168 utilizada, e nas demais características analisadas, houve interação entre os fatores (variedade
169 x tratamento aplicado).

170 O conteúdo de cinzas foi superior nas variedades RB106814 e RB966928, assim
171 como nos tratamentos CBCN, SBCN e SBSN, enquanto o tratamento onde se efetuou apenas
172 a aplicação de bactérias diazotróficas apresentou a menor quantidade de cinzas.

173 O nitrogênio acumulado e a proteína bruta não apresentaram diferença entre os
174 tratamentos aplicados e foram superiores na RB016919 e demais variedades, diferenciando-
175 se apenas da RB966928. O mesmo ocorreu para as frações de holocelulose e celulose em
176 relação às variedades, no entanto, a holocelulose foi superior no tratamento CBSN e a
177 celulose foi semelhante em quase todos os tratamentos, com exceção do CBCN que
178 apresentou a menor quantidade.

179 A relação fibra/açúcar (FDN/SST) é um bom parâmetro para avaliar a qualidade da
180 planta para uso na alimentação animal, sendo que quanto menor for esta relação, melhor a
181 qualidade (RODRIGUES et al., 2001). Entre as variedades observou-se que a RB966928
182 apresentou a menor FDN/SST, seguida da RB867515 e RB106819 e quanto aos tratamentos
183 aplicados, os melhores resultados foram apresentados pela CBCN seguido do CBSN.

184 Interações entre as variedades e os tratamentos aplicados foram observadas para
185 sólidos solúveis totais, produção de BT e MS e também, para hemicelulose, lignina, FDA e
186 FDN (Tabela 2).

187 Em relação aos sólidos solúveis totais (SST), a variedade RB867515 foi
188 positivamente influenciada pela aplicação de bactérias e pela adubação nitrogenada, tanto em
189 conjunto quanto utilizada separadamente. Enquanto a RB106818 respondeu apenas a
190 aplicação de bactérias, de forma isolada e quando utilizada junto da adubação nitrogenada. Já
191 quando comparadas as variedades entre elas, observou-se que nos tratamentos contendo
192 bactérias não houve diferenças, mas nos tratamentos SBCN e SBSN os maiores teores de
193 SST foram apresentados pela variedade RB966928, que se diferenciou apenas da RB106818
194 nestes dois tratamentos e também, da RB867515 no controle SBSN.

195 A biomassa total, de forma geral, foi superior nos tratamentos CBCN, com excessão
196 da variedade RB867515. No tratamento CBSN a maior produção foi apresentada pela
197 RB106819, seguida da RB106814. No SBCN novamente a RB106819 apresentou a maior
198 BT e no controle SBSN ela também aparece como uma das mais produtivas, sendo, portanto,
199 uma variedade que apresenta um bom crescimento vegetativo e que responde tanto à
200 aplicação de bactérias, quanto à adubação nitrogenada.

201 E embora não tenham ocorrido diferenças entre os tratamentos aplicados, observa-se
202 que a utilização de bactérias diazotróficas proporcionou um aumento de 10% na produção de
203 biomassa em relação ao controle SBSN e quando em conjunto com a adubação nitrogenada, o
204 aumento foi ainda maior (em torno de 13%). Em termos de incremento de massa seca, os
205 valores foram superiores nos tratamentos CBCN, com excessão da variedade RB966928 que
206 não diferenciou do CBSN e da RB106814 que não apresentou diferenças entre os tratamentos
207 e o controle. Quanto às variedades, a RB966928 foi a que mais respondeu a aplicação de
208 bactérias, sendo a massa seca no CBCN e no CBSN bem superiores aos tratamentos sem
209 bactéria.

210 A média da fração de hemicelulose nas plantas de cana-de-açúcar foi superior no
211 tratamento com aplicação de bactérias, seguido da aplicação conjunta com adubação
212 nitrogenada (CBCN). E analisando detalhadamente as interações, observa-se que a resposta
213 aos tratamentos foi bastante variável, sendo a RB106819 a mais responsiva, com maior
214 conteúdo de hemicelulose no CBSN do que os demais tratamentos. Em contrapartida, o
215 conteúdo de lignina foi superior no tratamento SBCN, seguido do controle SBSN, porém,
216 também dependeu da variedade de cana-de-açúcar, a magnitude de resposta aos tratamentos
217 aplicados na diminuição de lignina nas plantas. O tratamento mais eficiente na diminuição
218 foi o CBCN, seguido do CBSN, apresentando os menores valores de lignina para as
219 variedades RB966928 e RB106814. E embora não tenha se observado diferença significativa
220 entre os tratamentos na RB867515, essa variedade apresentou maior conteúdo de lignina no
221 controle SBSN do que nos tratamentos aplicados.

222 A fibra em detergente ácido de forma geral foi superior nas variedades RB106814,
223 RB106818 e RB106819, sendo a RB106814 a mais responsiva à aplicação de bactérias, com
224 valores superiores nos tratamentos SBCN e SBSN. Para fibra em detergente neutro, o
225 comportamento das variedades foi semelhante aos de FDA, mas a resposta aos tratamentos
226 foi bastante variável. Os maiores valores de FDN da variedade RB966928 foram no
227 tratamento CBSN seguido do controle SBSN, na RB106814 foi superior no SBSN seguido do
228 SBCN e na RB106819 superior nos tratamentos CBSN, SBCN e SBSN, respectivamente.

229 Na figura 1 estão apresentadas as curvas de maturação das cinco variedades de cana-
230 de-açúcar em função de 180 dias de cultivo, representadas pelas equações de regressão de
231 ajuste para cada tratamento aplicado. Todos os tratamentos seguiram o modelo de regressão
232 linear: $y = y_0 + ax$, onde y = variável resposta; y_0 = variável resposta correspondente ao ponto
233 mínimo ou máximo da curva e a = valor máximo estimado para a variável resposta.

234 Quando comparados os valores de sólidos solúveis totais da primeira avaliação, que se
235 deu aos 180 dias de cultivo, para a última, aos 300 dias, observou-se comportamentos
236 diferentes entre as variedades em relação a cada um dos tratamentos aplicados. Os acréscimos
237 em °Brix na variedade RB867515 foram de 13, 16, 39 e 22%, nos tratamentos CBCN, CBSN,
238 SBCN e SBSN, respectivamente. Na mesma ordem de tratamentos, observou-se o acréscimo
239 de 32, 21, 24 e 29% na variedade RB966928; de 23, 24, 27 e 55% na RB106814; 39, 10, 16 e
240 52% na RB106818 e 23, 43, 30 e 60% na RB106819.

241 De forma geral, observou-se um acréscimo maior no teor de SST nos tratamentos sem
242 aplicação de bactérias diazotróficas, principalmente, no controle SBSN, como se pode
243 observar nas variedades RB106814, RB106818 e RB106819. Com exceção da RB966928
244 em que apresentou o maior acréscimo quando aplicado o tratamento CBCN. Em
245 contrapartida, os valores de SST já eram superiores na avaliação inicial dos tratamentos em
246 que efetuou-se a aplicação de bactérias diazotróficas. Além disso, já na terceira avaliação,
247 que ocorreu aos 260 dias, tiveram acréscimos consideráveis de 9, 22, 16, 27 e 15%, para as
248 variedades RB867515, RB966928, RB106814, RB106818 e RB106819, respectivamente. E
249 na colheita, aos 300 dias após o plantio, estes tratamentos já apresentavam °Brix próximos da
250 maturação, com valores entre 19 e 21 em todas as variedades de cana-de-açúcar. Enquanto
251 que os tratamentos SBCN e SBSN apresentaram valores entre 16 e 19 °Brix.

252 A cana-de-açúcar é uma cultura extremamente eficiente na transformação da energia
253 solar em energia química na forma de fotoassimilados, resultando em produção de biomassa
254 (GHANNOUM, 2009), por isso pode ser indicada para uso na alimentação animal. E
255 variedades como a RB106814, RB106818 e RB106819 que apresentam potencial para
256 alimentação animal (Lemões 2018), se mostraram bastante responsivas a aplicação de
257 bactérias diazotróficas no que tange a produção de biomassa, incremento de massa seca e
258 também, melhoria da composição químico-bromatológica.

259 Em adição a isso, o aumento de biomassa e massa seca nas plantas em função da
260 aplicação de bactérias diazotróficas é bastante promissor, tendo em vista que atualmente,
261 devido a uma maior consciência ambiental, tem se procurado aumentar a produção agrícola
262 por área cultivada ao máximo, e que isso seja feito de forma o mais sustentável possível
263 (Costa et al., 2012). Além disto, a quantidade de massa seca produzida nas plantas está
264 diretamente ligada à oferta de forragem (Mezzalira et al. 2012) e quanto maior a oferta de
265 forragem, melhor o desempenho animal, refletido no ganho de peso corporal (Santos &
266 Corrêa, 2009).

267 A massa seca é dividida em duas frações: conteúdos celulares e componentes
268 estruturais da parede celular, onde se encontram a celulose, hemicelulose, e lignina. A
269 proporção de cada uma destas frações, assim como o arranjo de componentes, influencia o
270 consumo e a digestibilidade das forragens (Reis; Barbero; Hoffman, 2016). A Fibra em
271 detergente ácido (FDA) é a porção menos digestível, constituída quase na sua totalidade por
272 lignocelulose, ou seja, lignina e celulose (Salman et. al., 2010). Portanto, a diminuição da
273 quantidade de lignina e conseqüentemente da FDA, proporcionada pela aplicação de bactérias
274 diazotróficas e adubação nitrogenada, é um resultado extremamente positivo para o emprego
275 da cultura na alimentação animal.

276 A digestibilidade das plantas também é influenciada pela maturação fisiológica, pois à
277 medida que a idade da planta aumenta, também aumentam as porcentagens de celulose,
278 hemicelulose e lignina, reduzindo a proporção de carboidratos solúveis, proteínas, minerais e
279 vitaminas, que são considerados nutrientes potencialmente digestíveis (Reis et al., 2005).
280 Contudo, no presente trabalho, a aplicação da mistura de bactérias diazotróficas de forma
281 isolada e em conjunto com adubação nitrogenada, aumentou o teor de sólidos solúveis totais
282 e diminuiu a quantidade de fibra das plantas de cana-de-açúcar e isso foi confirmado pela
283 diminuição da relação FDN/SST apresentada pelos tratamentos contendo bactérias. Além

284 disso, algumas variedades de cana-de-açúcar 40 dias antes da colheita do experimento já
285 apresentaram °Brix por volta de 20, o que indicava que poderia ter sido efetuado o corte das
286 plantas, podendo evitar mais ainda o aumento na porcentagem de fibra.

287 A relação FDN/SST apresentada pelo tratamento contendo bactérias em conjunto com
288 a adubação nitrogenada foi menor que 2,7, que já é considerado ideal para cana-de-açúcar
289 (Rodrigues et al., 1997). Já onde foram aplicadas apenas as bactérias esta relação foi um
290 pouco superior, no entanto, esse tratamento diminuiu a quantidade de FDN em 18% na
291 variedade RB106818 e com isso pode aumentar o consumo da cana pelo animal.

292 O aumento de biomassa pela aplicação de bactérias diazotróficas pode estar
293 relacionado à produção dos fitohormônios que aumentam a eficiência da adubação e também
294 ao aumento do sistema radicular, que permite que a planta explore um maior volume de solo,
295 capte e absorva mais N, resultando em maior produção (Cassan et al., 2009; Hungria et al.,
296 2010; Moutia et al., 2010). A maior absorção de nitrogênio e outros nutrientes pode modificar
297 a histologia dos tecidos vegetais, como a deposição das células do mesófilo, parênquima,
298 esclerênquima, entre outros tecidos (Wilson, 1993), afetando o teor de proteína bruta, os
299 carboidratos estruturais e também os carboidratos solúveis, melhorando a composição das
300 plantas para utilização na alimentação animal.

301 Contudo, o nitrogênio acumulado e conseqüentemente o teor de proteína bruta, não
302 foram influenciados pelos tratamentos aplicados como era esperado (Schultz et. al., 2012;
303 Matoso et al., 2020). Isso certamente ocorreu devido ao fato de que foi efetuada uma
304 adubação nitrogenada na área experimental antes do transplante das mudas de cana-de-
305 açúcar, pois a fixação biológica de nitrogênio (FBN) costuma ser mais frequente em solos de
306 média e baixa fertilidade (Oliveira et al., 2006; Gosal et al., 2012).

307 Em um estudo sobre a interação entre adubação nitrogenada e *Azospirillum brasilense*
308 na cultura do milho, os autores observaram que é possível que uma alta taxa de N aplicada
309 pode comprometer o sucesso da inoculação do diazotrófico, principalmente em termos de
310 FBN (SKONIESKI et al., 2017). Em contrapartida, outros estudos mostraram resultados
311 positivos da inoculação com a mesma espécie de bactéria diazotrófica em solos que
312 continham grandes quantidades de N disponível (Dobbelaere et al., 2003; Araújo et al.,
313 2014). Portanto, a aplicação de bactérias diazotróficas é capaz de promover mudanças na
314 qualidade da cana-de-açúcar para utilização na alimentação animal, mas o sucesso da
315 aplicação depende da adubação nitrogenada e do manejo aplicado à cultura.

316 **Conclusão**

317 A aplicação de uma mistura de cinco bactérias diazotróficas de forma isolada e em
318 conjunto com a adubação nitrogenada, aumenta a produção de biomassa em 10 e 13%,
319 respectivamente e a massa seca em até 16 toneladas por hectare. Também promove um
320 acréscimo nos sólidos solúveis totais de aproximadamente 16%, antecipando a maturação em
321 até 40 dias e melhora a composição químico-bromatológica das plantas de cana-de-açúcar,
322 diminuindo em até 12% a quantidade de lignina, 7% de celulose, 11% a fibra em detergente
323 ácido e 18% a fibra em detergente neutro, além de reduzir a relação fibra/açúcar. No entanto,
324 a resposta aos tratamentos aplicados, depende da variedade estudada.

325

326

327

328

329

330

Literatura citada

331 Abreu, M. F., C. A. Abreu, I. Sarzi, and A. L. Padua Junior. 2007. Extratores aquosos para a
332 caracterização química de substratos para plantas. *Hortic. bras.* 25:184-187.

333 Araújo, R. M., A. S. F Araújo, L. A. P. L. Nunes, and M. V. B. Figueiredo. 2014. Resposta
334 do milho verde à inoculação com *Azospirillum brasilense* e níveis de nitrogênio. *Ciênc. Rural*
335 44:1556-1560. doi:10.1590/0103-8478cr20130355.

336 Ávila, C. L. S., C. E. C. Bravo Martins, and R. F. Schwan. 2010. Identification and
337 characterization of yeasts in sugarcane silages. *J. Appl. Microbiol.* 109:1677–1686.

338 Barretti, P. B.; R. M. Souza, and E. A. Pozza. 2008. Bactérias endofíticas como agentes
339 promotores de crescimento de plantas de tomateiros e de inibição in vitro de *Ralstonia*
340 *solanacearum*. *Ciênc. agrotec.* 32:731-739.

341 Cassan, F., D. Perrig, V. Sgroy, O. Masciarelli, C. Penna, and V. Luna. 2009. *Azospirillum*
342 *brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination,
343 promote seed germination and early seedling growth in maize (*Zea mays* L.) and soybean
344 (*Glycine max* L.). *Eur. J. Soil Biol.* 45:28-35. doi:10.1016/j.ejsobi.2008.08.005.

345 Chaves, V. A., S. G. Santos, N. Schultz, W. Pereira, S. J. Sousa, R. C. Monteiro, and V. M.
346 Reis. 2015. Initial development of two sugarcane varieties inoculated with diazotrophic
347 bacteria. *R. Bras. Ci. Solo.* 39:1595–1602. doi:10.1590/01000683rbcs20151144.

348 Daniel, J. L. P., R. C. Amaral, A. SÁ Neto, E. H. Cabezas-Garcia, A. W. Bispo, M.
349 Zopollatto, T. L. Cardoso, M. H. F. Spoto, F. A. P. Santos, and L. G. Nussio. 2013.
350 Performance of dairy cows fed high levels of acetic acid or ethanol. *J. Dairy Sci.* 96:398–406.
351 doi:10.3168/jds.2012-5451.

352

- 353 Dobbelaere, S., A. Croonenborghs, A. Thys, D. Ptacek, Y. Okon, and J. Vanderleyden. 2002.
354 Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. Irakense* strains on
355 development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biol. Fertil. Soils*. 36:284-
356 297. doi:10.1007/s00374-002-0534-9.
- 357 Ghannoum, O. 2009 .C4 photosynthesis and water stress. In: *Annals of Botany*, v. 103, p. 635
358 – 644.
- 359 Gosal, S. K., A. Kalia, S. K. Uppal, R. Kumar, S. S. Walia, K. Singh, and H. Singh. 2012.
360 Assessing the benefits of *Azotobacter* bacterization in sugarcane: a field appraisal. *Sugar*
361 *Tech*. 14:61-67. doi: 10.1007/s12355-011-0131-z.
- 362 Hungria, M., R. J. Campo, E. M. Souza, and F. O. Pedrosa. 2010. Inoculation with selected
363 strains of *Azospirillum brasilense* and *A. Lipoferum* improves yields of maize and wheat in
364 Brazil. *Plant and Soil*. 331:413-425. doi:10.1007/s11104-009-0262-0.
- 365 LEMÕES, L. S. Seleção de genótipos de cana-de-açúcar para produção de etanol e silagem.
366 2018. 72f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção
367 Agrícola Familiar, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.
- 368 Malavolta, E. 2006. *Manual de Nutrição Mineral de Plantas*. Ceres, Sao Paulo. p. 638.
- 369 Matoso, E. S., V. M. Reis, A. R. Avancini, E. D. T. Simon, E. Marco, and S. A. A. Silva.
370 2020. Application of a mixture of five diazotrophs on sugarcane cultivated in the south of
371 Brazil. *R. Bras. Ciênc. Agrárias*, 15:PÁGINAS.
- 372 Mezzalira, J. C., P. C. F. Carvalho, J. K. Trindade, C. Bremm, L. Fonseca, M. F Amaral, and
373 M. V. Reffatti. 2012. Produção animal e vegetal em pastagem nativa manejada sob diferentes
374 ofertas de forragem por bovinos. *Ciênc. Rural*. 42:1264-1270. doi: 10183/107332/000940711.

- 375 Moutia, J. F. Y., S. Saumtally, S. Spaepen, and J. Vanderleydejn. 2010. Plant growth
376 promotion by *Azospirillum* sp. In sugar cane is influenced by genotype and drought stress.
377 Plant Soil 337:233-242. doi:10.1007/s11104-010-0519-7.
- 378 Oliveira, A. L. M., E. L. Canuto, S. Urquiaga, V. M. Reis, and J. I. Baldani. 2006. Yield of
379 micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with
380 diazotrophic bacteria. Plant Soil, 284:23-32. doi:10.1007/s11104-006-0025-0.
- 381 Reis R. A., R. P. Barbero, and A. Hoffmann. 2016. Impactos da qualidade da forragem em
382 sistemas de produção de bovinos de corte. In: Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 37 p.
383 36-53.
- 384 Reis, R. A., G. M. P. Melo, and L. M. A. Bertipaglia. 2005. Otimização da utilização da
385 forragem disponível através da suplementação estratégica. In: REIS R.A.; SIQUEIRA, G.R.;
386 BERTIPAGLIA, L.M.A. (Eds.). Volumosos na produção de ruminantes. Funep, Jaboticabal.
387 p. 187-238.
- 388 Rodrigues, A. A.; Primavesi, O.; Esteves, S. N. 1997. Efeito da qualidade de variedades de
389 cana-de-açúcar sobre seu valor como alimento para bovinos. Pesquisa Agropecuária
390 Brasileira, v. 32, n. 12, p. 1333-1338.
- 391 Rodrigues, A. A.; cruz, G. M. da; Batista, L.A.R. Landell, M. G. A. 2001. Qualidade de
392 dezoito variedades de cana-de-açúcar como alimento para bovinos. In: REUNIÃO ANUAL
393 DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba. Anais...
394 Piracicaba: SBZ, p.1111-1113.
- 395 Salman A. K. D., A. C. D. Ferreira, J. P. G. Soares, and J. P. Souza. 2010. Metodologias para
396 avaliação de alimentos para ruminantes domésticos. In: Documentos 136. Embrapa
397 Rondônia, Porto Velho.

- 398 Santos, P. M., L. A. Corrêa. 2009. Manejo de pastagens tropicais. In: Documento 46.
399 Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos.
- 400 Schultz, N., R. F. Moraes, J. A. Silva, R. B. Baptista, R. P. Oliveira, J. M. Leite, W. Pereira,
401 J. R. Carneiro, B. J. R. Alves, J. I. Baldani, R. M. Boddey, S. Urquiaga, and V. M. Reis.
402 2012. Avaliação agrônômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias
403 diazotróficas e adubadas com nitrogênio. *Pesq. agropec. bras.* 47:261-268.
404 doi:10.1590/S0100-204X2012000200015.
- 405 Schultz, N., J. A. Silva, J. S. Sousa, R. C. Monteiro, R. P. Oliveira, V. A. Chaves, W. Pereira,
406 M. F. Silva, J. I. Baldani, R. M. Boddey, V. M. Reis and S. Urquiaga. 2014. Inoculation of
407 sugarcane with diazotrophic bacteria. *Rev. Bras. Ciênc. Solo.* 38:407-414.
408 doi:10.1590/S0100-06832014000200005.
- 409 Siqueira, G. R., M. T. P. Roth, M. H. Moretti, and J. M. B. Benatti, F. D. Resende. 2012.
410 Uso da cana-de-açúcar na alimentação de ruminantes. *Rev. bras. saúde prod. Anim.* 13:991-
411 1008. doi:10.1590/S1519-99402012000400011.
- 412 Skonieski, F. R., J. Viégas, T. N. Martin, J. L. Nörnberg, G. R. Meinerz, T. J. Tonin, P.
413 Priscila, and M. T. Frata. 2017. Effect of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and
414 nitrogen fertilization rates on maize plant yield and silage quality. *R. Bras. Zootec.*, 46:722-
415 730. doi:10.1590/s1806-92902017000900003.
- 416 TAPPI. T 203 cm-99. Alpha-, beta- and gamma-cellulose in pulp. 2009, 7 p.
- 417 Wilson, J. R. 1993. Organization of forage plant tissues. In: Forage cell wall structure and
418 digestibility. Jung, H. G.; Buxton, D. R.; Hatfield, D. and Ralph, J., eds. Madison, Wisconsin,
419 p. 1-32.
- 420
- 421

422

423 Tabela 1 – Produção e composição químico-bromatológica de variedades de cana-de-açúcar em função da aplicação de bactérias diazotróficas e
 424 adubação nitrogenada¹

	Variedades					Tratamentos				CV(%)	p≤0,05
	RB867515	RB966928	RB106814	RB106818	RB106819	CBCN	CBSN	SBCN	SBSN		
SST	18,94	20,70	19,19	18,97	20,35	20,65	20,04	18,86	18,97	7,47	VxT
BT	64,40	66,59	72,77	63,17	75,05	72,57	70,30	66,59	64,14	22,99	VxT
MS	13,08	15,60	14,85	15,73	17,05	19,44	17,68	11,86	12,06	15,03	VxT
CZ	63,47 ^b	75,19 ^a	80,63 ^a	62,76 ^b	51,87 ^c	68,75 ^a	41,72 ^b	72,18 ^a	84,50 ^a	38,92	V;T
N	6,51 ^{ab}	5,83 ^b	6,43 ^{ab}	6,37 ^{ab}	7,03 ^a	6,86	6,09	6,31	6,46	14,06	V
PB	40,70 ^{ab}	36,47 ^b	40,18 ^{ab}	39,82 ^{ab}	43,94 ^a	42,90	38,10	39,45	40,42	14,06	V
ET	152,61	177,00	145,03	136,47	151,90	155,25	152,61	148,33	154,21	30,50	NS
HOL	394,50 ^{ab}	348,25 ^b	386,51 ^{ab}	402,48 ^a	374,81 ^{ab}	368,39 ^b	406,42 ^a	371,47 ^b	378,17 ^b	10,85	V;T
CEL	224,18 ^{ab}	219,34 ^{ab}	233,20 ^{ab}	249,53 ^a	218,31 ^b	213,32 ^b	234,27 ^a	238,70 ^a	229,35 ^a	11,32	V;T
HEM	170,31	128,90	152,31	152,95	156,50	155,07	172,14	132,76	148,82	20,31	VxT
LIG	152,61	172,89	221,64	187,65	219,75	178,67	182,49	202,53	199,49	18,83	VxT
FDA	376,24	392,24	454,84	437,18	438,05	392,00	416,76	441,23	428,84	11,09	VxT
FDN	546,56	521,15	607,15	590,13	594,56	547,07	588,91	573,99	577,66	9,78	VxT
FDN/SST	2,85 ^{ab}	2,51 ^b	3,18 ^a	3,22 ^a	3,02 ^{ab}	2,61 ^b	2,91 ^{ab}	3,12 ^a	3,16 ^a	14,97	V;T

425 ¹ médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si, comparando as variedades ou os tratamentos aplicados, pelo teste de Tukey (p≤0,05); SST - sólidos
 426 solúveis totais (°BRIX); BT - biomassa total (Mg.ha⁻¹); MS - massa seca (Mg.ha⁻¹); CZ - cinzas (g.kg⁻¹ de MS); N - nitrogênio acumulado (g.kg⁻¹ de MS); PB - proteína bruta
 427 (g.kg⁻¹ de MS); ET- extrativos totais (g.kg⁻¹ de MS); HOL - holocelulose (g.kg⁻¹ de MS); CEL - celulose (g.kg⁻¹ de MS); HEM - hemicelulose (g.kg⁻¹ de MS); LIG - lignina
 428 (g.kg⁻¹ de MS); FDA - fibra em detergente ácido (g.kg⁻¹ de MS); FDN - fibra em detergente neutro (g.kg⁻¹ de MS); FDN/SST - relação fibra/açúcar; CBCN - com bactérias +
 429 adubação nitrogenada; CBSN - com bactérias; SBCN - com adubação nitrogenada (dose recomendada); e SBSN - controle sem nenhum tipo de tratamento. NS - não
 430 significativo; CV - coeficiente de variação; V - efeito da variedade de cana-de-açúcar; T - efeito do tratamento aplicado; VxT - interação entre variedade x tratamento
 431 aplicado.

432

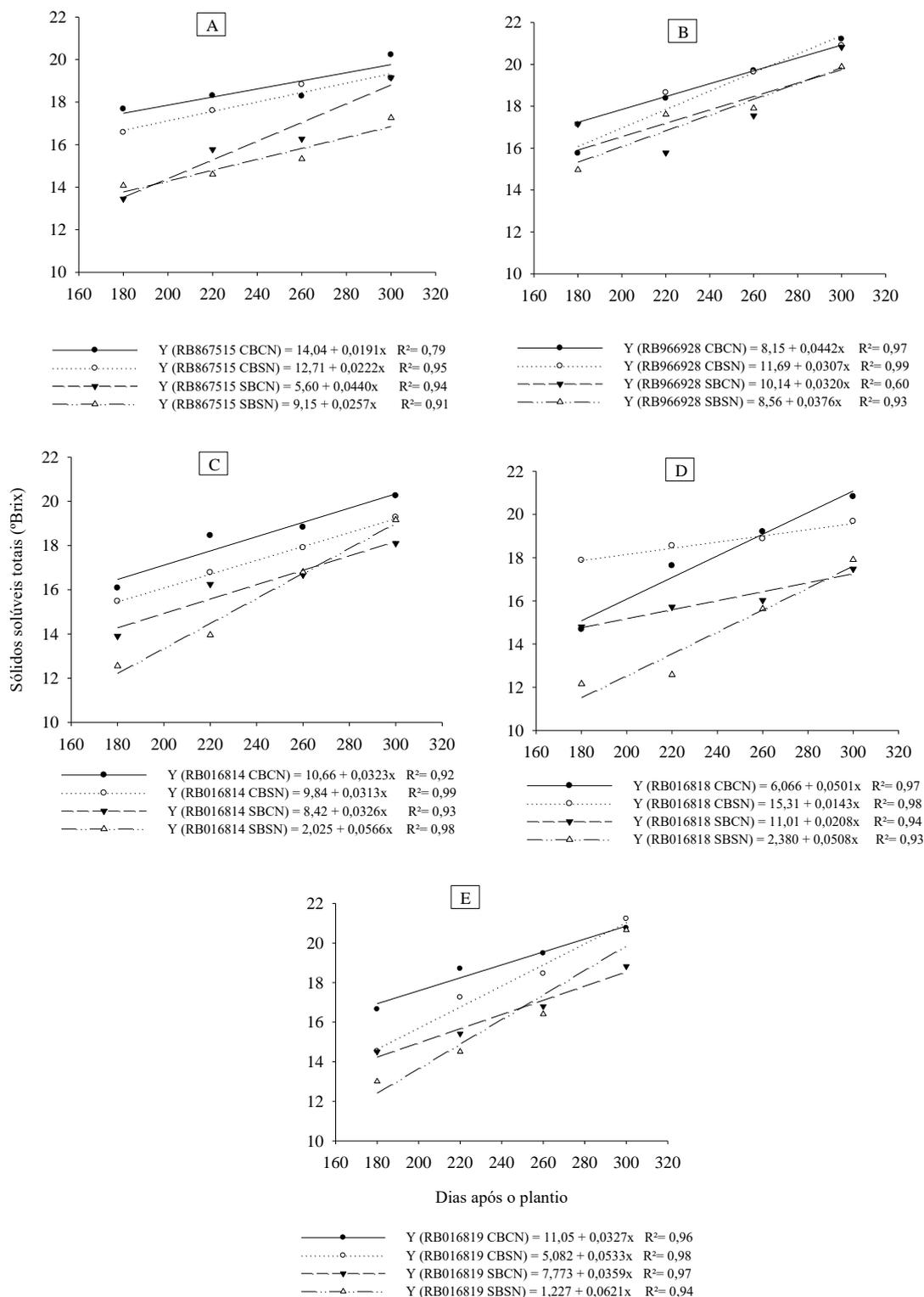
433

Tabela 2 – Interação entre as variedades e os tratamentos aplicados na produção e composição químico-bromatológica de plantas de cana-de-açúcar

Variedades	CBCN		CBSN		SBCN		SBSN	
	Sólidos solúveis totais, °Brix							
RB867515	20,22	aA	19,12	aA	19,15	abA	17,25	bB
RB966928	21,20	aA	20,90	aA	20,83	aA	19,87	aA
RB106814	20,25	aA	19,27	aAB	18,10	abB	19,15	abAB
RB106818	20,82	aA	19,67	aA	17,48	bB	17,90	bB
RB106819	20,75	aA	21,22	aA	18,78	abB	20,65	aA
Biomassa total, ton.ha ⁻¹								
RB867515	53,38	bA	66,68	bA	74,55	aA	63,00	abA
RB966928	78,93	aA	68,51	bA	62,56	bA	56,37	bA
RB106814	78,03	aA	72,36	abA	64,14	bA	76,56	aA
RB106818	78,58	aA	59,50	bA	54,43	cA	60,20	bA
RB106819	73,94	aA	84,44	aA	77,26	aA	64,58	abA
Massa seca, ton.ha ⁻¹								
RB867515	17,62	aA	14,58	bB	10,52	abC	9,70	cC
RB966928	18,84	aA	25,30	aA	9,47	bB	8,79	cB
RB106814	14,08	aA	15,83	bA	12,77	abA	16,70	aA
RB106818	23,20	aA	14,01	bB	12,93	abB	12,77	bB
RB106819	23,48	aA	18,70	bB	13,60	aC	12,43	cC
Hemicelulose, g.kg ⁻¹ de MS								
RB867515	211,97	aA	158,23	aA	139,67	aA	171,40	aA
RB966928	162,49	abA	176,54	aA	79,92	bB	132,40	aA
RB106814	173,14	aA	159,04	aA	143,47	aA	133,60	aA
RB106818	144,38	bA	152,02	aA	148,31	aA	167,07	aA
RB106819	119,08	bB	214,88	aA	152,43	aB	139,63	aB
Lignina, g.kg ⁻¹ de MS								
RB867515	143,87	bA	155,03	aA	141,84	bA	167,48	bA
RB966928	126,77	bB	173,51	aA	176,15	abA	179,43	abA
RB106814	154,12	abB	171,27	aAB	257,62	aAB	303,54	aA
RB106818	242,62	aA	185,41	aAB	177,73	abB	144,82	bB
RB106819	190,27	aA	227,25	aA	259,30	aA	202,17	abA
Fibra em detergente ácido, g.kg ⁻¹ de MS								
RB867515	341,98	bA	376,76	aA	376,28	bA	409,93	aA
RB966928	388,28	abA	375,25	aA	413,85	abA	391,58	aA
RB106814	371,77	abB	416,50	aAB	500,82	aA	530,26	aA
RB106818	472,87	aA	451,69	aA	431,18	abA	392,98	aA
RB106819	385,08	abB	463,64	aAB	484,04	aA	419,47	aAB
Fibra em detergente neutro, g.kg ⁻¹ de MS								
RB867515	553,95	aA	534,99	bA	515,96	bA	581,33	aA
RB966928	515,05	aB	551,79	bA	493,78	bB	523,98	aAB
RB106814	544,91	aB	575,54	abB	644,28	aA	663,85	aA
RB106818	617,25	aA	603,71	abA	579,50	abA	560,05	aA
RB106819	504,16	aB	678,53	aA	636,47	aA	559,10	aAB

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, comparando as variedades, dentro de cada tratamento aplicado (Tukey $p \leq 0.05$). Assim como as médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, não diferem entre si, comparando os tratamentos aplicados dentro de cada variedade (Tukey $p \leq 0.05$). CBCN - com bactérias + adubação nitrogenada; CBSN - com bactérias; SBCN - com adubação nitrogenada (dose recomendada); e SBSN - controle sem nenhum tipo de tratamento.

Figura 1. Curvas de maturação das variedades de cana-de-açúcar em função do tratamento aplicado, ao longo de 120 dias. CBCN - com bactérias + adubação nitrogenada; CBSN - com bactérias; SBCN - com adubação nitrogenada (dose recomendada); e SBSN - controle sem nenhum tipo de tratamento.



8. Considerações finais

Os resultados obtidos no trabalho indicam que a aplicação da mistura de cinco bactérias diazotróficas em plantas de cana-de-açúcar promove aumentos significativos em características importantes, como altura de planta, diâmetro de colmo, conteúdo de nitrogênio, produtividade, massa seca e sólidos solúveis totais, antecipando a maturação.

Além disso, as bactérias minimizam os efeitos do déficit hídrico, pois proporcionam o aumento da assimilação líquida de carbono, do conteúdo de clorofila e do potencial osmótico. Também mantém a condutância estomática e o conteúdo relativo de água nas folhas, diminui a transpiração líquida das plantas e influencia positivamente os parâmetros da fluorescência da clorofila, aumentando a eficiência quântica máxima do FSII, o rendimento quântico fotoquímico efetivo do FSII a dissipação fotoquímica e a taxa de transporte de elétrons.

Por fim, os resultados indicaram que a mistura quando aplicada na cana-de-açúcar pode melhorar a composição químico-bromatológica das plantas para uso na alimentação animal, aumentando a quantidade de carboidratos solúveis e diminuindo a quantidade de lignina e fibras em detergente neutro e ácido.

Segundo o que consta na literatura, a adubação nitrogenada em dose recomendada pode prejudicar a atividade das bactérias diazotróficas, porém, em cana-planta cultivada a partir de mudas pré-brotadas, a aplicação da mistura em conjunto com a adubação nitrogenada em cobertura se destacou, auxiliando na melhoria das qualidades bromatológicas.

Em contrapartida, no estudo em que se avaliou cana-planta e soca, a aplicação de bactérias de forma isolada melhorou o estado nutricional das plantas, aumentando a quantidade de nitrogênio acumulado, podendo diminuir a quantidade de fertilizantes nitrogenados utilizada, que como consequência, pode minimizar os impactos ambientais da cadeia sucroalcooleira.

No entanto, as respostas positivas a aplicação das bactérias são variáveis, pois algumas variedades de cana-de-açúcar são mais responsivas que outras e também dependem do manejo aplicado à cultura. Por isso, há necessidade que se desenvolvam mais pesquisas do mesmo âmbito, mas em diferentes situações.

Referências

- ABREU, M. F.; ABREU, C. A.; SARZI, I.; PADUA JUNIOR, A. L. Extratores aquosos para a caracterização química de substratos para plantas. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 184-187, 2007.
- AKIN, D.E., BURDICK, D Percentage of tissue types in tropical and temperate grass leaf blades and degradation of tissues by rumen microorganisms. **Crop Science**, v.15, n.5, p.661-668, 1975.
- ANDREOTE, F. D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 2007. 184 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade de São Paulo / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2007.
- ANJOS, I. A.; SILVA, D. N.; CAMPANA, M. P. Cana-de-açúcar como forrageira. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Eds). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, cap. 33, p. 731- 733, 2008.
- ANTUNES, William Rodrigues. **Baixas temperaturas nas características agrônômicas, produtividade e qualidade em genótipos de cana-de-açúcar, no estado do Rio Grande do Sul**. 2018. 93 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.
- ANTUNES, W. R.; SCHÖFFEL, E. R.; SILVA, S. D. A.; HÄRTER, A.; CAMPOS, A. D. S.; MONTERO, C. R. S. Productive performance of early sugarcane genotypes in Rio Grande do Sul state, Brazil. **Revista Scientia Agraria**, v. 18, n. 2, p. 136-142, 2017.
- ARAÚJO, R. M.; ARAÚJO, A. S. F.; NUNES, L. A. P. L.; FIGUEIREDO, M. V. B. Resposta do milho verde à inoculação com *Azospirillum brasilense* e níveis de nitrogênio. **Ciência Rural**, v.44, p.1556-1560, 2014.
- ÁVILA, C. L. S., C. E. C. BRAVO MARTINS; R. F. SCHWAN. Identification and characterization of yeasts in sugarcane silages. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 1677–1686, 2010.
- BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, n.1, p.89-113, 2008.
- BALDANI, I., VIDEIRA, S., REIS, V. M., BODDEY, L. H. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v. 384, p. 413-431, 2014.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 36, p. 86–93, 1986.

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

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

BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M.; POZZA, E. A. Bactérias endofíticas como agentes promotores de crescimento de plantas de tomateiros e de inibição in vitro de *Ralstonia solanacearum*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 731-739, 2008.

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

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

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

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

BRAGA JUNIOR, R. L. C.; LANDELL, M. G. A.; SILVA, D. N.; BIDÓIA, M. A. P.; SILVA, T. N.; THOMAZINHO JÚNIOR, J. R.; SILVA, V. H. P.; ANJOS, I. A. **Censo varietal IAC de cana-de-açúcar no Brasil - Safra 2017/18 e na região centro-sul - safra 2018/19**. Série Tecnologia APTA. Boletim Técnico IAC, n 221, 2019.

BRAGA JUNIOR, R. L. de C.; LANDELL, M. G. A.; SILVA, D. N.; BIDOIA, M. P.; SILVA, T. N.; TOMZINHO JUNIOR, J. R.; SILVA, V. H. P. Censo varietal IAC no brasil - safra 2016/17 e na região centro-sul – safra 2017/18. **Revista Canavieiros**, nº 140 ano XI, p. 40-57, 2018.

BRANDÃO, A. **Cana-de-açúcar: álcool e a açúcar na história e no desenvolvimento social do Brasil**. Brasília: Horizonte, 1985.

BRASIL, M. da S. **Ocorrência e diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes variedades de arroz**. 137 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Fitotecnia)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ, 2005.

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

BRAY, E. A. Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 48-54, 1997.

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

CAMBRAIA, J. Aspectos bioquímicos, celulares e fisiológicos dos estresses nutricionais em plantas. In: NOGUEIRA, R.J.M.C.; ARAÚJO, E. DE L.; WILLADINO, L.G.; CAVALCANTE, U.M.T. (eds.). **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: UFRPE, cap. 2 , p. 95-104. 2005.

CARMO, C. A. F. S.; ARAÚJO, W. S. A.; BERNARDI, A. C. C.; SALDANHA, M. F. C. **Métodos de análise de tecidos vegetais**. Circular Técnica 6, Embrapa Solos, 2000.

CASSÁN, F.; J. ANDERLEYDEN; S. SPAEPEN. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-bacterias-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal Plant Growth Regulation**, v.33, n.2, p.440-459, 2014.

CASSAN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 28-35, 2009.

CASTRO, P. R. Aplicações da fisiologia vegetal no sistema de produção de cana-de-açúcar. In: Simpósio Internacional de Fisiologia de Cana-de-açúcar, Piracicaba, **Anais...** Piracicaba: STAB, 9 p. 2000.

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

CEZARINO, L. O.; LIBONI, L. B. Impactos sociais e ambientais da indústria da cana-de-açúcar. **Future Studies Research Journal**, v. 4, n. 1, p. 202-230, 2012.

CHAVES M. M. Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany**, v.42, p.1-16, 1991.

CHAVES, M. M.; PEREIRA, J. S.; MAROCO, J.; RODRIGUES, M. L.; RICARDO, C. P. P.; OSÓRIO, M. L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. How plants cope with water stress in the Field? Photosynthesis and growth. **Annals of Botany**, v.89, p. 907-916, 2002.

CHAVES, M.M.; MAROCO, J.P.; PEREIRA, J.S. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v.30, p.239-264, 2003.

CHAVES, V.A.; SANTOS, S.G.; SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SOUSA, S.J. MONTEIRO, R.C.; REIS, V.M. Initial development of two sugarcane varieties inoculated with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.39, p.1595–1602, 2015.

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

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO RS/SC. (2004). **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10 ed., Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Porto Alegre, 400p.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento, 2019. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, v.6 - Safra 2019/20**, n.1 - Primeiro levantamento, maio de 2019. <https://www.conab.gov.br>. Acesso em: 20 out. 2019.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar**, Segundo levantamento, safra 2017/18, v.4, n.2 p. Brasília, ago. 2017.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, v. 5 - Safra 2017/18**, n. 1 - Primeiro levantamento, maio de 2018.

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

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16 S Ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill.) **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2375-2379, 2001.

DANIEL, J. L. P., R. C. AMARAL, A. SÁ NETO, E. H. CABEZAS-GARCIA, A. W. BISPO, M. ZOPOLLATTO, T. L. CARDOSO, M. H. F. SPOTO, F. A. P. SANTOS; L.

G. NUSSIO. Performance of dairy cows fed high levels of acetic acid or ethanol. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.398–406, 2013.

DENGLER, N. G.; NELSON, T. Leaf structure and development in C₄ plants. In: **C₄ Plant Biology**. Eds. R. F. Sage & R. K. Monson. Academic Press, Colorado: 133-172, 1999.

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

D'HONT, A., GRIVET, L., FELDMANN, P. et al. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular and General Genetics**, 250, 405–413, 1996.

DIMKPA, C.; WEINAND, T.; ASCH, F. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. **Plant, Cell and Environment**, v.32, p.1682–1694, 2009.

DIOLA, V.; F. SANTOS. 2010. Fisiologia. In: Santos, F., Borém, A., Caldas, C. (Eds.), *Cana-de-açúcar: Bioenergia, açúcar e álcool: Tecnologias e perspectivas*. Viçosa, 257p.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and A. Irakense strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36, p.284-297, 2002.

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

DU, Y.C.; KAWAMITSU, Y.; NOSE, A. ; HIYANE, S.; MURAYAMA, S. ; WASANO, K. UCHIDA, Y. Effects of water stress on carbon exchange rate and activities of photosynthetic enzymes in leaves of sugarcane (*Saccharum* sp.). **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 23, p.719-726, 1996.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. ***Nitrospirillum amazonense*: espécie de bactéria diazotrófica selecionada para aplicação em cana-de-açúcar (estirpe CBAMc)**. Embrapa Agrobiologia, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/6268/nitrospirillum-amazonense-especie-de-bacteria-diazotrofica-selecionada-para-aplicacao-em-cana-de-acucar-estirpe-cbamc> Acesso em: 31 ago 2020.

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

FABRIS, L.B. **Variedades de cana forrageira e sucroalcooleira em diferentes espaçamentos e adubação nitrogenada**. 32p. (Dissertação) Mestrado em Agronomia, Universidade do Oeste Paulista. Presidente Prudente, 2009.

FALCONER, D. S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: UFV, 359 p., 1987.

FAOSTAT. **Food and agricultural commodities production**. Disponível em <<http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=en>>. 2016. Acesso em: dezembro de 2019.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, D.; FUJITA, D.; BASRA, S. M. A. Plant drought stress effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 29, p.185-212, 2009.

FERREIRA, A. C.; COZZOLINO, K.; CARVALHO, A. R. V.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in oil palm trees. In: international symposium on sustainable agriculture for the tropics – the role of biological nitrogen fixation, Angra dos Reis, RJ. **Abstracts...** Seropédica: EMBRAPA-CNPAB; UFRRJ, 1995. p. 210, 1995.

FIGUEIREDO, R. T.; GUISTEM, J. M.; CHAVES, A. M. S.; AGUIAR JUNIOR, D. A.; SILVA, A. G. P.; PAIVA, J. B. P., SANTOS, F. N. Relação entre a área foliar, número de folhas e biomassa seca e fresca da planta de rúcula. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 913-918, 2010.

FISCHER, D., B. PFITZNER, M. SCHMID, J.L. SIMÕES-ARAÚJO, V.M. REIS, W. PEREIRA, E. ORMEÑOORRILLO, B. HAI, A. HOFMANN, M. SCHLOTTER, E. MARTINEZ-ROMERO, J.I. BALDANI; A. HARTMANN. Molecular characterization of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). **Plant and Soil**. v.356, n.1-2, p.83-99, 2012.

FREITAS, A. W.; PEREIRA, J. C.; ROCHA, F. C.; DETMANN, E.; BARBOSA, M. H. P.; RIBEIRO, M. D.; COSTA, M. G. Avaliação da divergência nutricional de genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 35, n. 1, p. 229-236, 2006.

GHANNOUM, O. C4 photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, v. 103, p. 635 – 644, 2009.

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

GÍRIO, L.A. da S.; DIAS, F.L.F.; REIS, V.M.; URQUIAGA, S.; SCHULTZ, N.; BOLONHEZI, D.; MUTTON, M.A. Bactérias promotoras de crescimento e adubação

nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, p. 33-43, 2015.

GONÇALVES, E. R.; FERREIRA, V. M.; SILVA, J. V.; ENDRES, L.; BARBOSA, T. P.; DUARTE, W. de G. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em variedades de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.4, 2010.

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

GROSS, J. A.; CASSOL, R. Índice de anomalia de chuva do estado o Rio Grande do Sul. **Ambiência**, v. 11, n. 3, p. 529-543, 2015.

GROVER, M.; ALI, S. Z.; SANDHYA, V.; RASUL, A.; VENKATESWARLU, B. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stress. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 27, p. 1231-1240, 2011.

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

HAN, H. S.; LEE, K. D. Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v.1, p. 210-215, 2005.

HÄRTER, A. **Seleção avançada em cana-de-açúcar para tolerância ao déficit hídrico**. 85f. (Dissertação) Mestrado em Sistemas de Produção Agrícola Familiar, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

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

HUERGO, L.F.; MONTEIRO, R. A.; BONATTO, A. C.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. **Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Asociación Argentina de Microbiología, Argentina, p.17-35, 2008.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola: Julho de 2014**. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default_publica_completa.shtm. Acesso em 28 de setembro de 2018.

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

JALEEL, C.A., MANIVANNAN, P., WAHID, A., FAROOQ, M., AL-JUBURI, H.J., SOMASUNDARAM, R., VAM, R.P. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 11, p. 100–105, 2009.

JHONES, H. G.; **Plants and Microclimate. A quantitative Approach to Environmental plant physiology**, Ed. 2. Cambridge University Press, Cambridge, 1992.

KARPINSKI, S. et al., Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 275- 294, 2002.

KASCHUK, G.; KUYPER, T.W.; LEFFELAAR, P.A.; HUNGRIA, M.; GILLER, K. E. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 41, p. 1233-1244, 2009.

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 em Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

KLUGE, R. A.; TEZOTTO-ULIANA, J. V.; DA SILVA, P. P. M. Aspectos fisiológicos e ambientais da fotossíntese. **Revista Virtual de Química**, v.7, n. 1, p. 56-73, 2015.

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

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

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

LAWLOR D.W. Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 695–709, 2013.

LAWLOR, D. W. Limitation to Photosynthesis in Water-stressed Leaves: Stomata vs Metabolism and the Role of ATP. **Annals of Botany**, v. 89, p. 871-885, 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.

LEITE, R. C.; CORTEZ, L. A. B. E. O Etanol Combustível no Brasil. In: BRASIL. Ministério das relações exteriores - MRE (Org.). In: **Biocombustíveis no Brasil: realidades e perspectivas**. Brasília: Arte Impressora Gráfica LTDA, p. 60-75, 2007.

LEMÕES, L. S. **Seleção de genótipos de cana-de-açúcar para produção de etanol e silagem**. 72f. (Dissertação) Mestrado em Sistemas de Produção Agrícola Familiar, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

LIMA, U. D.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. D. et al (Coord.). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, v. 3. p. 1-43. 2001.

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

LIN, S. Y.; HAMEED, A. SHEN, F. T.; LIU, Y. C.; HSU, Y. H.; SHAHINA, M.; LAI, W. A.; YOUNG, C. C. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 105, p. 1149–62. 2015.

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. 1149–1162, 2014.

LOPES, M. S.; ARAUS, J. L.; VAN HEERDEN, P. D. R.; FOYER, C. H. Enhancing drought tolerance in C4 crops. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 3235-3153, 2011.

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

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 55, p. 417–430, 1983.

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

MAMBACH, G. L.; KOTOWSKI, I. E.; SCHNEIDER, F. J. A.; MALLMANN, M. S.; BONFADA, E. B.; PORTELA, V. O.; BONFADA, E. B.; KAISER, D. R. Resposta da inoculação com *azospirillum* brasilense nas culturas de trigo e de milho safrinha. **Revista Scientia Agraria**, SA vol. 18 n°. 2 Curitiba Abr/Jun. 2017 p. 97-103.

MANZATTO, C. V.; BACA, J. F. M.; PEREIRA, S. E. M. Zoneamento agroecológico da cana-de-açúcar: abordagem metodológica para integração temática de grandes áreas territoriais. In: PRADO, R. B.; TURETTA, A. P. D.; ANDRADE, A. G. de (Org.). **Manejo e conservação do solo e da água no contexto das mudanças ambientais**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 486 p., 193-214, 2010.

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

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

MARTUSCELLO, J. A., JANK, L.; GONTIJO NETO, M.M.; LAURA, V.A.; CUNHA, D.N.F.V. Produção de gramíneas do gênero *Brachiaria* sob níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 38, n. 7, p. 1183-1190, 2009.

MATOSO, E. S. **Uso de bactérias diazotróficas na produção de mudas de cana-de-açúcar em diferentes substratos**. 115 p. (Dissertação) Mestrado em Sistemas de Produção Agrícola Familiar. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. 2017.

MATOSO, E. S.; REIS, V. M.; AVANCINI, A. R.; SIMON, E. D. T. DE MARCO, E.; SILVA, S. D. A. Application of a mixture of five diazotrophs on sugarcane cultivated in the south of Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 15, n. 4, dezembro de 2020.

MATOSO, E.S.; AVANCINI, A. R. ; MACIEL, K. F. K. ; ALVES, M. C. ; SIMON, E. D. T. ; SILVA, M. T. ; DIAS, N. L. ; SILVA, S. D. A. E. . Influência do uso de um mix de bactérias diazotróficas na biometria e no conteúdo de clorofila de plantas de cana-de-açúcar. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, p. 7261-7274, 2020.

MATSUOKA, S.; STOLF, R. Sugarcane tillering and ratooning: key factors for a profitable cropping. In: **Sugarcane: Production, Cultivation and Uses**. Nova Science Publishers, 21 p., 2012.

MENDES, R. F.; GUIMARÃES JUNIOR, J. B.; SANTOS, R. C.; CÉSAR, A. A. S. Efeito da associação de bagaço de cana, tipo e teor de adesivo na produção de

painéis aglomerados com madeira de pinus. **Ciência Florestal**, v. 22, p. 187-196, 2012.

MEZZALIRA, J.C.; CARVALHO, P.C.F.; TRINDADE, J.K. et al. Produção animal e vegetal em pastagem nativa manejada sob diferentes ofertas de forragem por bovinos. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, p. 1264-1270, 2012.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; DAROS, E.; CAMPOS, M.K.F.DE; CARVALHO, J. F. R. P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; PEREIRA, L. F. R.; VIEIRA, L. G. E.. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v. 130, p. 218-229, 2007.

MORAIS, K. P.; MEDEIROS, S. L. P.; SILVA, S. D. A.; BIONDO, J. C.; BOELTER, J. H.; DIAS, F. S. Produtividade e teor de fibra de genótipos de cana-de-açúcar em Jaguari-RS. **Anais...** Simpósio Estadual de Agroenergia e IV Reunião técnica de Agroenergia. Porto Alegre, 2012.

MOUTIA, J. Y.; SAUMTALLY, S.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane. **Plant Soil**, v. 337, p. 233–242, 2010.

MUTAVA, R. N. et al. Characterization of *sorghum* genotypes for traits related todrought tolerance. **Field Crops Research**, v. 123, n. 1, p. 10-18, 2011.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.49, p.249-279, 1998.

NUSSIO, L.G.; ROMANELLI, T.L.; ZOPOLLATTO, M. Tomada de decisão na escolha de volumosos suplementares para bovinos de corte em confinamento. In: Simpósio goiano sobre manejo e nutrição de bovinos de corte e leite, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, p.1-1, 2003.

OECD/FAO. **Agricultural Outlook 2018-2027**. OECD Publishing, Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2018.

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

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

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

OLIVEIRA, H. P.; MELO, R. O.; BALDOTTO, M. A.; ANDRADE, M. A.; BALDOTTO, L. E. B. Performance of pre-sprouted sugarcane seedlings in response to the application of humic acid and plant growth-promoting bacteria. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 39, n. 3, p. 1365-1370, 2018.

OLIVER, R.; SILVA, M. A. Interaction between diazotrophic bacteria and N-fertilizer doses on sugarcane crop. **Journal of Plant Nutrition**, v. 41, p. 722-736, 2018.

OREN, A.; GARRITY, G. M. Notification that new names of prokaryotes, new combinations, and new taxonomic opinions have appeared, of the IJSEM. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 1397–1399, 2015.

PACIULLO, D. S. C. Características anatômicas relacionadas ao valor nutritivo de gramíneas forrageiras. **Ciência Rural**, v. 32, n. 2, 2002.

PASSIOURA, J. B. Drought and drought tolerance. **Plant Growth Regulation**, v. 20, p. 79-83, 1996.

PEDROSO, A. F. **Aditivos na ensilagem de cana-de-açúcar**. Embrapa Pecuária Sudeste, Circular Técnica (INFOTECA-E), 2004.

PEDULA, R. O.; SCHULTZ, N.; MONTEIRO, R. C.; PEREIRA, W.; ARAÚJO, A. P.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Growth analysis of sugarcane inoculated with diazotrophic bacteria and nitrogen fertilization. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 30, p. 2786-2795, 2016.

PEREIRA, M. G. et al. The renewable energy market in Brazil: current status and potential. **Renewable and Sustainable Energy**, v. 16, n. 6, p. 3786–3802, 2012.

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

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

PIMENTEL, C. A relação da planta com a água. EDUR - Editora Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. 191 páginas 1ª edição. 2004.

PODESTA, I. **Fatores climáticos influenciam produção de café e cana-de-açúcar**. Dezembro de 2015. <https://www.grupocultivar.com.br/noticias/fatores-climaticos-influenciam-producao-de-cafe-e-cana-de-acucar>. Acesso em junho de 2020.

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

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

RAMPINO, P.; PATALEO, S.; GERARDI, C.; MITA, G.; PERROTTA, C. Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. **Plant Cell Environ.** v. 29, p. 2143–2152. 2006.

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

REIS, R. A.; BARBERO, R. P.; HOFFMANN, A. **Impactos da qualidade da forragem em sistemas de produção de bovinos de corte**. Bovinocultura de corte. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 37, n. 292, p. 36-53, 2016.

REIS, R. H. P. **Características agronômicas e composição bromatológica de variedades de cana-de-açúcar para alimentação de ruminantes**. 73p. (Dissertação) Mestrado em Agricultura Tropical, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2010.

REIS, R.A.; MELO G.M.P.; BERTIPAGLIA L.M.A. et al. Otimização da utilização da forragem disponível através da suplementação estratégica. In: REIS R.A.; SIQUEIRA, G.R.; BERTIPAGLIA, L.M.A. et al. (Eds.). **Volúmosos na produção de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, p.187-238, 2005.

REIS, V. M., BALDANI, I. J., URQUIAGA, S. Recomendação de uma mistura de estirpes de cinco bactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação de cana-de-açúcar: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Azospirillum amazonense* (BR 11145) e *Burkholderia tropica* (BR 11366). Circular Técnica, Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. 2009.

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

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

RESENDE, F.D.; SIGNORETTI, R.D.; COAN, R.M.; SIQUEIRA, G.R. Terminação de bovinos de corte com ênfase na utilização de alimentos conservados. In: REIS, R.A.; SIQUEIRA, G.R.; BERTIPAGLIA, L.M.A. (Eds.). **Volúmosos na produção de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, p.83-104, 2005.

RIDESA- Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. **Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar / Rede**

Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. 136 p. Curitiba, 2010.

ROBERTSON, M. J.; WOOD, A. W.; MUCHOW, R. C. Growth of sugarcane under high input conditions in tropical Australia. I. Radiation use, biomass accumulation and partitioning. **Field Crops Research**, v.48, p. 11-25, 1996.

RODRIGUES, A. A.; CRUZ, G. M. da; BATISTA, L.A.R. LANDELL, M. G. A. Qualidade de dezoito variedades de cana-de-açúcar como alimento para bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SBZ, p.1111-1113, 2001.

RODRIGUES, A. A.; PRIMAVESI, O.; ESTEVES, S. N. Efeito da qualidade de variedades de cana-de-açúcar sobre seu valor como alimento para bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 12, p. 1333-1338, 1997.

RODRIGUES, L. da S. **Estudo da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a cultivares de arroz inundado.** 94 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ, 2004.

SALAMONE, I. **Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina.** Asociación Argentina de Microbiología, Argentina, p.17-35, 2008.

SALMAN, A. K. D.; FERREIRA, A. C. D.; SOARES, J. P. G.; SOUZA, J. P. **Metodologias para avaliação de alimentos para ruminantes domésticos.** Porto Velho: Embrapa Rondônia (Documentos, 136). 2010.

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

SANTOS, J. M. **Índice de área foliar de cana-de-açúcar submetida a diferentes regimes hídricos no cerrado.** Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, 105 p. (Dissertação) Mestrado, 2018.

SANTOS, P.M.; CORRÊA, L.A. **Manejo de pastagens tropicais.** São Carlos, Embrapa Pecuária Sudeste, (Documentos 46), 28 p, 2009.

SANTOS, S. G. DOS; RIBEIRO, F. S.; ALVES, G. C.; SANTOS, L. A.; REIS, V. M. Inoculation with five diazotrophs alters nitrogen metabolism during the initial growth of sugarcane varieties with contrasting responses to added nitrogen. **Plant and Soil**, p. 1-20, 2019.

SARKAR, N., GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S. AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19-27, 2012.

SAWANA A.; ADEOLU M; GUPTA R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containin pathogenic organisms and a new

genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. **Front Genet.** v.5. 2014.

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

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

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, 2012.

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

SHARP, R. E. Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. **Plant Cell Environment**, v. 25, n. 2, p. 211-222, 2002.

SHREEVE, J. **Redesigning life to make ethanol**. 2006. Disponível em: <http://www.technologyre-view.com/featuredstory/406006/redesigning-life-to-make-ethanol>. Acesso em: outubro de 2018.

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

SILVA, M. A.; JERONIMO, E. M.; LÚCIO, A. D. Perfilhamento e produtividade de cana-de-açúcar com diferentes alturas de corte e épocas de colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 8, p. 979-986, 2008.

SILVA, S. D. A. E. ; GOMES, C. B.; UENO, B.; NAVA, D. E. ; ALMEIDA, I. R.; THEISEN, G.; DUTRA, L. F.; VERISSIMO, M. A. A.; PANZIERA, W. ; DAROS, E.; OLIVEIRA, R. A. de ; BESPALHOK FILHO, J. C. **Recomendações de variedades de cana-de-açúcar para o estado do Rio Grande do Sul**. Comunicado técnico, n 292. Embrapa Clima Temperado. 22 p., 2012.

SILVA, S. D. DOS A. E, MONTERO, C. R. S.; SANTOS, R. C.; NAVA, D. E.; GOMES, C. B.; ALMEIDA, I. R. **Sistema de produção da cana-de-açúcar para o Rio Grande do Sul**. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil. 2016. <https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1076589/sistema-de-producao-de-cana-de-acucar-para-o-rio-grande-do-sul>. 23 out. 2019.

SILVEIRA, J.A.G.; VIÉGAS, R.A.; ROCHA, I.M.A.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.160, p. 115-123, 2003.

SINGELS, A.; DONALDSON, R.A.; SMIT, M.A. Improving biomass production and partitioning in sugarcane: theory and practice. **Field Crops Research**, v. 92, p. 291-303, 2005.

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.

SIQUEIRA, G. R.; ROTH, M. T. P.; MORETTI, M. H.; BENATTI, J. M. B.; RESENDE, F. D. Uso da cana-de-açúcar na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 4, p. 991-1008, 2012.

SIQUEIRA, G.R.; RESENDE, F.D.; REIS, R. A.; ROMAN, J.; BERNARDES, T.F.. Uso estratégico de forragens conservadas em sistemas de produção de carne. In: JOBIM, C.C.; CECATO, U.; CANTO, M.W. (Eds) **Produção e utilização de forragens conservadas**. Maringá: Masson, p. 41-89, 2008.

SKONIESKI, F. R.; VIÉGAS, J.; MARTIN T. N.; NÖRNBERG, J. L.; MEINERZ, G. R.; TONIN, T. J. PRISCILA, P.; FRATA, M. T. Effect of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization rates on maize plant yield and silage quality. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 9, p. 722-730, 2017.

SMANIOTTO, G.; SLOMP, J. J.; AMARAL, A. S.; TEIXEIRA, A. J.; ROCHA, P. S. G.; SILVA, S. D. A. Avaliação de diferentes genótipos de cana-de-açúcar no sul do Brasil quando à incidência de ferrugem das folhas e mancha parda. **Anais...** Simpósio Estadual de Agroenergia e IV Reunião técnica de Agroenergia. Porto Alegre, 2012.

SOARES, F. U. **Estudo do potencial climático para cana-de-açúcar (*Sacharum* spp.) no Rio Grande do Sul por meio de Geoprocessamento: Estudo de caso no município de Jaguari**. 77 p. (Dissertação), Mestrado em Geomática, Universidade Federal de Santa Maria. 2008.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química orgânica**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, p. 645. 2001.

SOUZA, E. R. DE; FREIRE, M. B. G. DOS S.; CUNHA, K. P. V. DA; NASCIMENTO, C. W. A. DO; RUIZ, H. A.; LINS, C. M. T. Biomass, anatomical change sand osmotic potential in *Atriplex numulária* L incl. cultivated in sodic saline soil under water stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 82, p. 20-27, 2012.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresource**, v. 2, n. 3, p. 472-499, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 4 ed. Porto Alegre, Artmed, 848 p., 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 613 p., 2004.

TAPPI. T 203 cm-99. **Alpha-, beta- and gamma-cellulose in pulp**. 7 p., 2009.

TAPPI. T 222 om-02. Acid-insoluble lignin in wood and pulp. 2002, 5 p.

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

THOMÉ, P.; VAZ, T. A.; GROFF, A. M. Fatores e Técnicas do cultivo de cana-de-açúcar e sua correlação com a qualidade e a produtividade. In: **A engenharia de produção na contemporaneidade 2**. 1ed.: Atena Editora, v. 2, p. 1-10, 2018.

TRIVELIN, P.C.O. & VITTI, A.C. **Manejo do Nitrogênio e enxofre na nutrição e adubação da cana-de-açúcar**. CENA/USP, Piracicaba, SP. p. 46, 2009.

UNKOVICH, M.; HERRIDGE, D.; PEOPLES, M.; CADISCH, G.; BODDEY, R.; GILLER, K.; ALVES, B.; CHALK, P. **Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural, 285p., 2008.

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

VERISSIMO, M. A. A. **Desempenho agrônômico de genótipos de cana-de-açúcar no estado do Rio Grande do Sul**. 81p. (Dissertação) Mestrado em Sistemas de Produção Agrícola Familiar. Universidade Federal de Pelotas. 2012.

VERISSIMO, M. A. A.; SILVA, S. D. A.; AIRES, R. F.; DAROS, E.; PANZIERA, W. Adaptabilidade e estabilidade de genótipos precoces de cana-de-açúcar no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 561-568, 2012.

VIEIRA, G. H. S.; MANTOVANI, E. C.; SEDIYAMA, G. C.; DELAZARI, F. T. Morphophysiological indicators of water stress on sugarcane as a function of irrigation depths. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3, 2014.

VITTI, A. C.; CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; ROSSETO, R. Nitrogênio. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M. de; LANDELL, M.G. de A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, p.239-269, 2008.

VITTI, A. C.; FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. O.; FERREIRA, D. A.; OTTO, R.; FORTES, C.; FARONI, C. E. Nitrogênio proveniente da adubação nitrogenada e de resíduos culturais na nutrição da cana-planta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 287-293, 2011.

WELBAUM, G.E., MEINZER, F. C. Compartmentation of solutes and water in developing sugarcane stalk tissue. **Plant Physiology**, v. 93, p. 1147–1153, 1990.

WILSON, J. R. Organization of forage plant tissues. p.1-32. In: **Forage cell wall structure and digestibility**. Jung, H. G.; Buxton, D. R.; Hatfield, D. and Ralph, J., eds. Madison, Wisconsin, USA. 1993.

WILSON, J. R. Structural and anatomical traits of forages influencing their nutritive value for ruminants. In: simpósio internacional sobre produção animal em pastejo, Viçosa. **Anais...** Viçosa: UFV, p. 173-208, 1997.