

DANUBIA RAMOS MOREIRA DE LIMA

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E NUTRIÇÃO NITROGENADA
EM CANA PLANTA INOCULADAS COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS**

**RECIFE/PE
FEVEREIRO DE 2016**

DANUBIA RAMOS MOREIRA DE LIMA

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E NUTRIÇÃO NITROGENADA
EM CANA PLANTA INOCULADAS COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Doutora em Ciência do Solo.

Orientador: DR. FERNANDO JOSÉ FREIRE

Conselheira: DR^a. JÚLIA KUKLINSKY SOBRAL

**RECIFE/PE
FEVEREIRO DE 2016**

Ficha catalográfica

L732f Lima, Danubia Ramos Moreira de
Fixação biológica de nitrogênio e nutrição nitrogenada em
cana planta inoculadas com bactérias diazotróficas / Danubia
Ramos Moreira de Lima. – Recife, 2016.
90 f. : il.

Orientador: Fernando José Freire.

Tese (Doutorado em Ciências do Solo) – Universidade Federal
Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2016.
Referências.

1. Saccharum spp. 2. Inoculação bacteriana 3. Bactérias
fixadoras de nitrogênio 4. Atividade da nitrogenase 5. Abundancia
natural do 15N I. Freire, Fernando José, orientador II. Título

CDD 631.4

DANUBIA RAMOS MOREIRA DE LIMA

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E NUTRIÇÃO NITROGENADA
EM CANA PLANTA INOCULADAS COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Doutora em Ciência do Solo.

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em 29 de fevereiro de 2016

Orientador:

Dr. Fernando José Freire -----

Examinadores:

Dr. Paulo Cesar Ocheuze Trivelin-----

Dr. Michelangelo de Oliveira Silva-----

Dr. Renato Lemos dos Santos-----

Dr.^a. Giselle Gomes Monteiro Fracetto-----

“Pedi, e vos será concedido; buscai, e encontrareis; batei, e a porta será aberta para vós. Pois todo o que pede recebe; o que busca encontra; e a quem bate, se lhe abrirá ”.

Mateus 7: 7-8

DEDICO

*A minha filha, meu marido, aos meus pais, minha sogra, minhas sobrinhas,
aos meus irmãos, cunhadas, amigos, companheiros de laboratório, ao meu
orientador, aos colaboradores, ou seja, a todos que contribuíram para a
concretização deste trabalho!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre atuar na minha vida, me dando força e concedendo vitórias.

A meu companheiro Antônio Ristanley, por estar sempre presente nos momentos mais difíceis; a minha filha Yasmin, por fazer parte da minha vida e me deixar cada dia mais feliz.

Aos meus pais, Severino Ramos e Maria de Fátima, pelo amor e dedicação a mim dedicados.

A minha sogra Edileusa, pelo carinho e por me ajudar em todos os momentos que precisei.

Aos meus irmãos, Douglas, Davis, Cesar e Shirley; as minhas sobrinhas, Estefane, Maria Clara, Douglas Junior por me fazerem sorrir até mesmo nos momentos mais difíceis; A minha cunhada, Edvânia por toda ajuda e carinho.

Ao professor Dr. Fernando José Freire pela orientação, dedicação e paciência a mim prestada.

A Prof^a Dra Júlia Kuklinsky Sobral pela co-orientação, pelos conselhos e orientações, que mesmo de longe se fez presente sempre que necessário.

Ao Prof^o Dr. Emídio, professor colaborador, que sempre esteve presente dando suporte e ajuda necessária.

Ao Prof^o Dr. Djalma e a todos da EECAC por todo apoio prestado e solidariedade.

A Prof^a Dra Maria Betânia Freire por todo apoio prestado, por me tratar como se eu fosse sua orientada, pela ótima acolhida no grupo do Laboratório de Química do Solo.

Agradeço a todos os componentes e egressos do Laboratório de Química do Solo, João, Valéria, Maercio, Monaliza, Flamário, Patricia, Clarissa e em especial aos meninos que foram meus estagiários (Jhonathan, João, Juliana e Bruno).

Aos componentes, egressos e amigos do LGBM, João Tiago, Raquel, Geraldo, Jacycle, Yasmin e Luciana que me ajudaram sempre que precisei, com boa vontade, empenho e carinho, na multiplicação bacteriana, inoculação do experimento, além de sempre me ajudarem com ensinamentos e no que for preciso. Agradeço não só a esses que citei os nomes, mas a todos os egressos do grupo do LGBM, que quando preciso me

ajudam por telefone, e-mails, pelo whatsApp, tirando dúvidas, dando conselhos e estímulo para seguir.

A todos que fazem parte, ou fizeram parte do grupo GEPAE, Suzana, Priscila, Vitor, Luan, Rodolfo, Jailson, Rogério e João pela solidariedade e apoio prestado desde a montagem do experimento, coletas e análises.

A todos os amigos conquistados na PGCS em especial para Emmanulla, Monaliza, Patricia, Ariane, Wagner, Renato e Adelazil por favores prestados, conselhos, compartilhamento do conhecimento científico e pela amizade e carinho.

A todos os componentes (professores, alunos e funcionários) do departamento do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pelo suporte profissional, científico.

À Socorro, por todos os favores prestados e pela atenção e carinho com que nos trata.

Inicialmente a FACEPE e, em seguida, a Capes pela concessão da Bolsa de estudos.

Agradeço, também, a todos que contribuíram de forma direta e indireta para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Obrigada...

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	Xi
Lista de Tabelas.....	Xi
Lista de Abreviaturas.....	Xiv
RESUMO.....	Xv
ABSTRACT.....	Xvi
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. OBJETIVOS.....	19
1.1.1. Objetivo principal.....	19
1.1.2. Objetivos específicos.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. A cana-de-açúcar.....	21
2.2. Morfologia e fisiologia da cana-de-açúcar.....	22
2.3. Fixação biológica de nitrogênio.....	23
2.4. Inoculação de bactérias em plantas de cana-de-açúcar.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Descrição e caracterização da área experimental.....	26
3.2. Descrição do ensaio experimental.....	30
3.3. Tratamentos.....	30
3.4. Implantação do experimento.....	30
3.5. Variáveis e metodologias usadas na avaliação do ensaio em solo e planta.....	33
3.5.1. Solo.....	33
3.5.2. Planta.....	33
3.5.2.1. Produtividade e tecnológicas.....	34
3.5.2.2. Monitoramento do crescimento vegetativo e produção de matéria seca.....	34
3.5.2.3. Teor de N.....	35
3.5.2.4. Pigmentos fotossintéticos.....	35
3.5.2.5. Proteína e aminoácido.....	37
3.5.2.6. Atividade da enzima nitrogenase.....	36
3.5.2.7. Determinação da abundância natural do isótopo ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$).....	37
3.5.2.8. Balanço de N no sistema solo/ planta.....	38
3.5.2.9. Análise estatística.....	38
4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	39
4.1. Teor de N na parte aérea e raiz.....	39
4.2. Conteúdo de N na parte aérea.....	46
4.3. Conteúdo de N nos diferentes compartimentos (folha, colmo e ponteiro).....	46
4.4. Análise de crescimento.....	48
4.5. Pigmentos fotossintéticos.....	51
4.6. Proteína e aminoácido.....	57

4.7.	Atividade da nitrogenase nas folhas e raízes.....	62
4.8.	Abundância natural de nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$).....	68
4.9.	Contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) estimada pelo balanço total de nitrogênio no sistema solo/planta.....	71
4.10	Produtividade agrícola (TCH), produtividade industrial (TPH) e açúcares totais recuperáveis (ATR).....	74
5.	CONCLUSÃO.....	78
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
7.	REFERÊNCIAS	79

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Quantidade de água (precipitação pluvial e lâmina de água) durante o ensaio de campo na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar do Carpina (EECAC), em Carpina – PE. 27

LISTA DE TABELAS

	Título	Página
Tabela 1	Características gerais das variedades, RB92579 e RB867515, de cana-de-açúcar (RIDESA, 2010)	21
Tabela 2	Atributos químicos e físicos do ARGISSOLO VERMELHO AMARELO distrocoeso em diferentes profundidades na área do ensaio de campo na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar do Carpina, em Carpina –PE	29
Tabela 3	Origem e identificação de bactérias pertencentes à coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGBM) da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), isoladas de plantas de cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar do Carpina (EECAC) em Pernambuco	31
Tabela 4	Teor de nitrogênio na folha +1 de cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo em função da inoculação de bactérias em diferentes variedades e em diferentes tempos de crescimento, análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade	40
Tabela 5	Teor de nitrogênio na raiz de cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo em função da inoculação de bactérias em diferentes variedades e em diferentes tempos de crescimento, análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade	41

Tabela 6	Conteúdo de nitrogênio na parte aérea da cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo em função da inoculação de bactérias em diferentes variedades aos 360 dias após o plantio (DAP), análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade	44
Tabela 7	Conteúdo de nitrogênio no colmo, folha e ponteiro de cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo em função da inoculação de bactérias em diferentes variedades, análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade	47
Tabela 8	Diâmetro, altura, número de folhas e colmos da cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo em função da inoculação de bactérias em diferentes variedades e em diferentes tempos de crescimento, análise da variância e coeficiente de variação dos dados	50
Tabela 9	Teor de clorofila a em folha de cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo em função da inoculação de bactérias em diferentes variedades e em diferentes tempos de crescimento, análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade	52
Tabela 10	Teor de clorofila b em folha de cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo em função da inoculação de bactérias em diferentes variedades e em diferentes tempos de crescimento, análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade	53
Tabela 11	Teor de clorofila total em folha de cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo em função da inoculação de bactérias em diferentes variedades e em diferentes tempos de crescimento, análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade	54
Tabela 12	Teor de proteínas na matéria fresca de folha +1 de cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo em função da inoculação de bactérias em diferentes variedades e em diferentes tempos de crescimento, análise da variância, coeficiente de variação dos dados e	58

	contrastes ortogonais por variedade	
Tabela 13	Teor de aminoácidos na matéria fresca de folha +1 de cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo em função da inoculação de bactérias em diferentes variedades e em diferentes tempos de crescimento, análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade	62
Tabela 14	Atividade da nitrogenase na folha +1 de cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo em função da inoculação de bactérias em diferentes variedades e em diferentes tempos de crescimento, análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade	64
Tabela 15	Atividade da nitrogenase na raiz de cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo em função da inoculação de bactérias em diferentes variedades e em diferentes tempos de crescimento, análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade	65
Tabela 16	Abundância natural de nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) em cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo em função da inoculação de bactérias em diferentes variedades e em diferentes tempos de crescimento, análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade	67
Tabela 17	Contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em função da inoculação de bactérias em duas variedades de cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo estimada pelo balanço total de nitrogênio no sistema solo/planta até a profundidade de 0,40 m	72
Tabela 18	Produtividade agrícola e industrial de cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo em função da inoculação de bactérias em diferentes variedades, análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade	75

LISTA DE ABREVIATURAS

FBN	Fixação biológica de nitrogênio
MB	Mistura bacteriana
BK	<i>Burkholderia</i> sp.
ST	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
PT	<i>Pantoea</i> sp.
TA	Testemunha nitrogenada
TN	Testemunha absoluta
COT	Carbono orgânico total
AN	Atividade da nitrogenase
TCH	Produtividade agrícola
TPH	Produtividade industrial
CTC efetiva	Capacidade de troca de cátions efetiva
CTC potencial	Capacidade de troca de cátions potencial
Θ_{CC}	Capacidade de campo
Θ_{PMP}	Ponto de murcha permanente
AIA	Ácido indol acético
BPCP's	Bactérias promotoras de crescimento vegetal
EECAC	Estação experimental de cana-de-açúcar do Carpina
LGBM	Laboratório de Genética e Biologia Molecular
UAG	Unidade Acadêmica de Garanhuns
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
PRNT	Poder relativo de neutralização total
TSA	Tryptone Soya Agar

RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma cultura amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais, tendo o Brasil como principal produtor mundial. Diante da ampliação e contínuo crescimento agrícola da cultura da cana-de-açúcar no país, o desenvolvimento produtivo deve ocorrer em paralelo com técnicas agrícolas que visem à viabilidade econômica e que minimizem a degradabilidade do meio ambiente. Neste contexto, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) desponta como uma opção de uso nos sistemas produtivos, suprindo total ou parcialmente a nutrição nitrogenada da cana-de-açúcar. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de cana-de-açúcar. O experimento foi conduzido na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar do Carpina, PE, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Para tal, foi conduzido um experimento em campo, cultivado em um ARGISSOLO VERMELHO AMARELO distrocoeso. O ensaio consistiu no cultivo da cana-de-açúcar, variedades RB 92579 e RB 867515, inoculada com três gêneros bacterianos (*Pantoea* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Burkholderia* sp.) que foram inoculados separadamente compondo um tratamento cada e outro com a mistura dos três gêneros bacterianos, além de duas testemunhas, uma com N outra sem o N. Para avaliação do experimento foi realizada coleta de solo no dia da implantação do experimento, antes da adubação, e aos 120, 240 e 360 dias após o plantio (DAP) para determinação do teor de N, com posterior uso no balanço de N. Bem como, foi realizada análise de crescimento (diâmetro, altura da planta, número de folhas), determinação da matéria seca, estimativa da atividade da nitrogenase. A avaliação da abundância natural do isótopo ^{15}N , assim com na análise de clorofila, bioquímica e teor de N aos 120, 240 e 360 DAP. Produtividade agrícola, a produtividade industrial, açúcares totais recuperáveis e a massa seca da parte aérea foram mensurados no final do período experimental. As variáveis, teor e conteúdo de N, crescimento, pigmentos fotossintéticos e compostos bioquímicos, bem como o teor de N e de C, relação C/N do solo, ao serem analisadas de forma generalizada, observa-se comportamento que se assemelham, pois havendo ou não diferença significativa, na maioria das vezes os tratamentos inoculados não diferiram das testemunhas, não deixando claro o caráter responsivo para a inoculação bacteriana. Diferentemente ocorreu com a atividade da atividade da que o tratamento BK, MB e PT apresentaram maior AN que a TN. A FBN não foi detectada na técnica de abundância natural do isótopo ^{15}N . Diferentemente ocorreu com os resultados referentes à contribuição da FBN determinada através da estimada pelo balanço total de nitrogênio no sistema solo/planta, no qual, apesar da não diferença significativa, no balanço do N foi observado que os diferentes tratamentos inoculados foram responsivos para as variedades, RB92579 e RB867515. Também foi observado que a inoculação de bactérias promoveu aumento da TCH e no ATR em relação ao Tratamento Nitrogenado nas variedades RB92579 e RB867515. De acordo com as considerações acerca do resultado, pode-se afirmar que a inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio em plantas de cana-de-açúcar das variedades, RB867515 e RB92579, promoveu o desenvolvimento da cultura.

Palavras-chave: *Saccharum* spp., inoculação bacteriana, bactérias fixadoras de nitrogênio, atividade da nitrogenase, abundância natural do ^{15}N .

ABSTRACT

The sugarcane (*Saccharum* spp.) Is a widespread culture in tropical and subtropical regions, with Brazil as the world's leading producer. Given the expansion and continuous agricultural growth of the culture of sugarcane in the country, productive development should occur in parallel with agricultural techniques aimed at economic viability and to minimize the degradability of the environment. In this context, the biological nitrogen fixation (BNF) emerges as a usage option in production systems, supplying all or part of nitrogen nutrition of sugarcane. Thus the aim of this study was to evaluate the inoculation of bacterias diazotrophic in sugarcane plants. The experiment was conducted at the Experimental Station of Cane Sugar Carpina, PE, the Federal Rural University of Pernambuco. Para tal, foi conduzido um experimento em campo, cultivado em um ARGISSOLO VERMELHO AMARELO distrocoeso. For this, an experiment was conducted in the field, cultivated in a Alfissol distrocoeso. The test consists in the cultivation of sugarcane, varieties RB 92579 and RB 867515, inoculated with three bacterial genera (*Pantoea* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Burkholderia* sp.) Were inoculated separately composing a treatment each and one with the mixture the three bacterial genera, and two witnesses, one with N another without the N. To evaluate the experiment was performed soil collection on the implementation of the experiment, before fertilization, and 120, 240 and 360 days after planting (DAP) to determine the N content, with subsequent use in the balance of N. As well as, growth analysis was performed (diameter, plant height, number of leaves), dry matter determination, estimation of nitrogenase activity. The evaluation of the natural abundance of the isotope ^{15}N , so with the chlorophyll, biochemical and N content to 120, 240 and 360 DAP. Agricultural productivity, industrial productivity, total recoverable sugars and shoot dry weight were measured at the end of the trial period. The variable, content and N content, growth, photosynthetic pigments, proteins and amino acids, as well as the N content and C, ratio C / N of the soil to be analyzed generally, it is observed behavior that resemble, because there were significant differences, most of the time the inoculated treatments did not differ from witnesses, not making clear the character responsive to bacterial inoculation. Unlike occurred with the activity of the activity that treatment BK, MB and PT had higher AN that TN. The BNF was not detected in the technique of natural abundance of ^{15}N isotope. Unlike happened with the results for the BNF contribution determined by estimated the total balance of nitrogen in the soil system / plant, in which, despite no significant difference in the balance of N it was observed that different inoculated treatments were responsive to the varieties , RB92579 and RB867515. It was also observed that the inoculation of bacteria caused increased TCH and ATR compared to treatment in nitrogen varieties RB92579 and RB867515. According to the results, it can be said that the inoculation of nitrogen fixing bacteria in sugarcane plants of varieties, RB867515 and RB92579, promoted the development of culture.

Keywords: *Saccharum* spp., bacterial inoculation, nitrogen fixing bacteria, the nitrogenase activity, natural abundance of ^{15}N .

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma gramínea, pertencente à família *Poaceae*. É uma cultura perene (NATURLAND, 2000) que, se adaptada a diferentes ambientes, é capaz de crescer em ampla faixa de habitats e altitudes. É uma espécie exótica, oriunda da Ásia Meridional (SANTOS et al., 2008; CORADIN et al., 2011), tendo como principais produtores mundiais: o Brasil (MAPA, 2015), sucessivamente a Índia, depois China, Tailândia, Paquistão e México (MARQUES, 2009; AHMED et al. 2014).

O Brasil possui ampla distribuição do cultivo dessa gramínea em seu território, com uma área total de 8.995,5 mil hectares cultivada com cana-de-açúcar, com produção da safra 2015/2016 estimada em 658,7 milhões de toneladas de cana-de-açúcar e produtividade de 73.228 kg/ha (CONAB, 2015). Os principais produtos derivados da cana-de-açúcar são a sacarose e o etanol, com previsão para a safra de 2015/2016 de uma produção nacional de açúcar de 34,61 milhões de toneladas e para o álcool um equivalente de 29,21 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2015).

A sacarose é um importante derivado da cana-de-açúcar, de importância histórica, cultural, presente na culinária mundial (CARVALHO et al., 2013), no entanto o etanol vem tendo destaque no mercado interno e externo desde 2006, como um biocombustível de importância mundial, devido ao seu potencial energético menos poluente, bastante utilizado em mistura com combustíveis fósseis e uso em carros bicombustíveis. Este desponta como uma alternativa viável com crescimento promissor de possível aumento na produção nacional e internacional, devido à demanda de exportação para diversos países (NIGAM & SINGH, 2010; WITT et al., 2012).

Devido ao potencial promissor dos derivados da cana-de-açúcar, desencadeando demanda para aumento da produção agroindustrial, que remete a ampliação do setor sucroalcooleiro e contínuo crescimento da produção da cultura da cana-de-açúcar no Brasil (MAPA, 2015), é recomendável que isso ocorra com elevada rentabilidade econômica e uso de técnicas alternativas ecologicamente menos degradantes.

Assim, a busca por sistemas de manejo de cultivo que propiciem a sustentabilidade da cultura, com aumento de produtividade e diminuição do uso de fertilizantes minerais deve nortear os estudos de produção de cana-de-açúcar. Deste modo, tem-se como fonte alternativa a utilização de microrganismos que atuem no sistema solo-planta beneficiando o desenvolvimento vegetal.

É sabido que a adubação nitrogenada é de alto custo para o cultivo de cana-de-açúcar, por exemplo, se o Brasil adubasse toda a sua área cultivada com 40 kg de N/ha, que segundo a CONAB (2015) a área cultivada chega a aproximadamente 8.995,5 mil hectare, chegaria a um custo total de R\$ 438.980,4 com adubação nitrogenada, utilizando como fonte de N a uréia, a qual uma tonelada foi cotada em outubro de 2015 por R\$ 1.221,00 sendo o kg no valor de R\$ 1,22. No entanto, o custo com inoculação, como opção de substituição a adubação nitrogenada, foi de R\$ 71.964,00 no qual o custo máximo com inoculante foi de R\$ 8,00 por hectare. Como pode ser observado, é grande a diferença de custo entre a adubação com adubo nitrogenado e quando feita com inoculação bacteriana. Os valores são discrepantes, ficando evidente a viabilidade econômica da utilização da inoculação bacteriana como fonte de N.

Então, diante do relatado, o uso de microorganismos, como por exemplo, a utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP's) compondo inoculantes é uma opção que vai trazer muitos benefícios para as plantas não leguminosas, como as gramíneas. As BPCP's promovem o crescimento das plantas por vários mecanismos, como a fixação biológica de nitrogênio, biocontrole de doenças, produção de fitohormônios, como o ácido indol acético (AIA) e solubilização de nutrientes, como o fosfato inorgânico, entre outras (KINKEL et al., 2000; STURZ et al., 2000; PEDRAZA, 2008; TAULÉ et al., 2011; FERRARA et al., 2011).

A inoculação de bactérias diazotróficas em plantas pode proporcionar respostas benéficas para espécies vegetais, como a cana-de-açúcar. A fisiologia da cultura pode ser alterada, com o aumento de diferentes variáveis de crescimento e fisiológicas em todo o ciclo da planta, tais como: germinação, velocidade de brotação, crescimento (número de perfilhos, número de folhas, altura da planta, diâmetro do colmo), matéria seca, conteúdo de N, concentração de polissacarídeos, fotossíntese, condutância estomática, concentração de sacarose (REIS et al., 2009; BENEDUZI et al., 2013; SCHULTZ et al., 2014; GÍRIO et al., 2015; LIU et al., 2015; MARCOS et al., 2016), pigmentos fotossintéticos, compostos orgânicos, TCH, entre outras (SACRAMENTO et al., 2014; TEXEIRA et al., 2015).

Para avaliar a contribuição da FBN em cana-de-açúcar inoculada com bactérias promotoras do crescimento vegetal pode-se realizar a determinação do N total, a atividade da nitrogenase, técnicas baseadas no uso de isótopos, como a abundância natural do isótopo $\delta^{15}\text{N}$ e diluição isotópica de $\delta^{15}\text{N}$, espectrofométrica com azul-de-indofenol, espectrofometria com azul-de-salicílico, análise em fluxo contínuo, entre

outras. Dentre estas, as técnicas que tem como base uso e mensuração do $\delta^{15}\text{N}$ em plantas testes, possibilitam um bom entendimento da dinâmica do N no sistema solo-planta-atmosfera (ALVES et al., 2005).

1.1. HIPÓTESE

1 – A inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio em plantas de cana-de-açúcar de diferentes variedades (RB867515 e RB92579) favorecem o desenvolvimento da cultura.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo principal

Avaliar o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas no primeiro ciclo do cultivo da cana-de-açúcar em diferentes variedades (RB 92579 e RB 867515) em Pernambuco.

1.2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da inoculação de bactérias fixadoras de N sobre o desenvolvimento da cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo em diferentes períodos de crescimento das plantas, estudando aspectos de crescimento, fisiológicos e de produtividade;
- Avaliar a nutrição nitrogenada da cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo em diferentes períodos de crescimento das plantas, como função da inoculação de bactérias promotoras do desenvolvimento vegetal;
- Quantificar os teores de N dos rebolos usados no plantio, bem como no solo, na água de irrigação, na precipitação pluvial ao longo do período experimental;
- Avaliar a atividade da enzima nitrogenase na cana-de-açúcar durante o primeiro ciclo de cultivo e em diferentes períodos de crescimento das plantas;
- Estimar a contribuição da FBN com o uso da técnica de abundância natural do isótopo $\delta^{15}\text{N}$ na cana-de-açúcar durante o primeiro ciclo de cultivo e em diferentes períodos de crescimento das plantas;

- Calcular a contribuição da FBN pelo balanço de N durante o primeiro ciclo de cultivo da cana-de-açúcar inoculada com bactérias promotoras do desenvolvimento vegetal

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1. A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), pertencente à família *Poaceae* (*Gramineae*). É uma cultura perene (NATURLAND, 2000), exótica e oriunda da Ásia Meridional (SANTOS et al., 2008; CORADIN et al., 2011). Os primeiros exemplares foram introduzidos no Brasil em torno de 1515, trazidos da Ilha da Madeira, em Portugal (MARQUES, 2009; CORADIN et al., 2011). Essa introdução se estendeu desde a faixa do litoral de São Paulo até a região Nordeste.

As plantas de cana-de-açúcar eram cultivadas em locais altimontanos, nas margens de rios e em área planas, priorizando-se para o cultivo as áreas de fácil acesso, para que facilitassem a exploração e exportação do açúcar (ADÃO, 2007; THEODORO, 2011).

Decorrente da exploração desta monocultura, extensas áreas de florestas foram devastadas para o cultivo da cana-de-açúcar, que era inicialmente realizado utilizando mão-de-obra indígena e, posteriormente, de forma gradativa, foi sendo substituída por escravos trazidos da África (BRANDÃO, 1985; THEODORO, 2011). Desde então, a cana-de-açúcar faz parte do contexto histórico brasileiro e atualmente é um dos principais produtos agrícolas do país (MARQUES, 2009).

A cana-de-açúcar é uma espécie que se adaptada a diferentes ambientes, capaz de crescer em ampla faixa de habitats e altitudes. É bastante dispersa nas regiões tropicais e subtropicais, tendo como principais produtores mundiais: o Brasil (MAPA, 2015), sucessivamente a Índia, China, Tailândia, Paquistão e México (MARQUES, 2009; AHMED et al. 2014;).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2015), o Brasil é líder mundial na produção de cana-de-açúcar e de seus derivados e possui uma área cultivada de 8.995,5 mil hectares, com produção estimada para a safra 2015/2016 de 658,7 milhões de toneladas de cana-de-açúcar e produtividade de 73.228

kg/ha. (CONAB, 2015). Os principais produtos derivados da cana-de-açúcar são o açúcar e o etanol, que têm produção estimada em 34,61 milhões de toneladas de açúcar e um equivalente de 29,21 bilhões de litros de etanol para a safra de 2015/2016 (CONAB, 2015).

O aumento da produção dos derivados da cana-de-açúcar é decorrente do aumento da produtividade da cultura, que é fortemente influenciado pela elevada diversificação no cultivo (MACEDO, 2005), chegando atualmente a cultivar mais de 500 variedades, das quais 51 foram liberadas nos últimos 10 anos (GOES & MARRA, 2013).

Dentre as diversas variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil, a RB 867515 é a mais cultivada (CTC, 2011). É um cultivo recorrente desde 1988, porém só foi lançada oficialmente como variedade comercial em 1997 pela Universidade Federal de Viçosa, por meio da Rede Interuniversitária de Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA), facilitando o avanço do cultivo para solos com restrições hídricas, com baixa fertilidade e arenosos. É uma variedade de boa produtividade, com resultados experimentais de 117,25 toneladas de cana por hectare (TCH) (RIDESA, 2010).

Por outro lado, uma outra variedade que vem ganhando destaque nacional e muito plantada no Nordeste é a RB 92579 que foi liberada para cultivo em 2003 pela Universidade Federal de Alagoas, também filiada a RIDESA, e desde então tem demonstrado expressivo aumento da área cultivada no Brasil, devido as suas características agroindustriais, apresentando elevada produtividade agrícola (Tabela 1) com média acima de 80 TCH (RIDESA, 2010).

Tabela 1: Características gerais das variedades de cana-de-açúcar RB 92579 e RB 867515

Características								
Variedade	Produtividade	Perfilhamento	Brotação	Velocidade de crescimento	Porte	Maturação	Teor de sacarose	Teor de fibra
RB867515	Alta	Médio	Boa	Rápido	Alto	Média Tardia	Alto	Médio
RB92579	Alta	Alto	Boa	Lento	Alto	Média Tardia	Alto	Médio

Fonte: RIDESA (2010).

2.2. Morfologia e fisiologia da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar começa a brotação 20 a 30 dias após o plantio (DAP). Possui raízes fasciculadas com maior concentração até os 40 cm de solo e no subsolo apresenta rizomas que são constituídos por nós, entrenós e gemas, os quais darão origem aos perfilhos. A parte aérea se desenvolve em forma de touceiras de plantas, compostas por colmos, folhas e inflorescências (MOZAMBANI et al., 2006).

O crescimento da cana-de-açúcar pode ser dividido em 4 fases: na 1ª Fase ocorre o enraizamento e a germinação; a 2ª fase se caracteriza pelo perfilhamento e estabelecimento da espécie; na 3ª fase ocorre a finalização do perfilhamento, aproximadamente entre 90 a 120 DAP, com o início do acúmulo de sacarose; a 4ª fase corresponde ao período de grande acúmulo de sacarose (maturação) (GASCHO & SHIH, 1983; SEGATO et al., 2006).

Para estudo da performance de desenvolvimento e fisiologia dos vegetais, em particular da cana-de-açúcar, diferentes variáveis podem ser analisadas, como crescimento, solutos orgânicos, pigmentos fotossintéticos, entre outros. Dentre estas variáveis destaca-se a análise de crescimento devido a sua praticidade e baixo custo, por exemplo, pode-se mensurar a altura, diâmetro, número de folhas, número de plantas por metro linear, área foliar, número de entrenós por colmo, matéria seca e fresca e produtividade (BENINCASA, 2003; ALMEIDA et al., 2008; MARAFON, 2012).

A avaliação do crescimento é considerada um método-padrão (DUARTE, 2009) que descreve as condições morfofisiológicas da espécie avaliada em diferentes intervalos de tempo (BENINCASA, 2003; DUARTE, 2009; BERTON, 2014), permitindo identificar variações no desenvolvimento da cultura (TERUEL et al., 1997; MARAFON, 2012; CIVIERO, 2014).

As análises de compostos bioquímicos, tais como pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b, total e carotenóides), solutos orgânicos (proteínas, aminoácidos, prolina e carboidratos) (SACRAMENTO et al., 2014) auxiliam o estudo das respostas fisiológicas nas avaliações experimentais. Esses compostos bioquímicos, de acordo com as mudanças climáticas, manejo da cultura, perturbação do meio, podem ser encontrados em concentrações diferentes nos diversos compartimentos das plantas (TEIXEIRA et al., 2015).

A clorofila, proteína e os aminoácidos são compostos bioquímicos nitrogenados, que possuem amina na sua constituição e essas podem ser oriundas da estrutura da

amônia, podendo ser afetados de acordo com a nutrição vegetal e variando de acordo com a influência dos fatores exógenos do meio ambiente, como por exemplo, luz, temperatura e quantidade de nutrientes (SILVEIRA, 2014).

2.3. Fixação biológica de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo natural que se caracteriza pela transformação do N_2 atmosférico, que corresponde a uma forma não assimilável pelas plantas, altamente estável devido à presença de uma tripla ligação covalente existente na molécula do N_2 , a qual pode ser rompida por meio de microrganismos que possuem a enzima nitrogenase, produzindo a amônia (NH_3^+) (HUNGRIA, 1997; FRANCHE et al., 2009).

O processo da FBN pode ser realizado por bactérias de vida livre ou associativas (endofíticas facultativas ou obrigatórias) e realizado por várias espécies bacterianas, que habitam diversas plantas em diferentes graus de especificidade. Sabe-se que a grande limitação para a FBN é a disponibilidade de fontes de energia para as bactérias em sistemas não simbióticos, pois para que o processo biológico ocorra é necessário energia na forma de ATP (BALDANI et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2008; SENTHILKUMAR et al., 2011).

Essa limitação pode ser suprida por microrganismos, como as bactérias, que são capazes de colonizar internamente os tecidos das plantas, como no caso dos endófitos. Geralmente, estes são atraídos pelos exsudados das plantas na rizosfera ou rizoplano, fazendo com que as bactérias sejam atraídas para próximo da planta hospedeira e a colonizem internamente (TILAK et al., 2006).

Diversas espécies bacterianas fixadoras de N podem ocorrer endofiticamente e serem encontradas em dicotiledôneas e em monocotiledônias, tais como as gramíneas, palmeiras e *Orchidaceae* (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; FAGAN et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008).

A elevada diversidade genética das bactérias fixadoras de N garante a ocorrência da FBN em um determinado ecossistema como, também, nos mais diferentes tipos de sistemas terrestres (FRANCHE et al., 2009) e adicionalmente no solo e nas plantas. Para o estudo da variabilidade genética da comunidade microbiana que habita os diferentes nichos ecológicos, geralmente, utiliza-se técnicas moleculares, como os marcadores BOX, ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), RAPD

(Random Amplified Polymorphic DNA) e pirosequenciamento entre outras, que possibilitam a realização de correlações entre ambiente estudado e microbiota (CHENEY et al., 2000; ANDREOTE et al., 2008).

A associação entre plantas e bactérias, denominada de associação simbiótica, pode ocorrer em plantas leguminosas e plantas não leguminosas. Nas plantas leguminosas a associação simbiótica com bactérias fixadoras de N é geralmente caracterizada pela formação de nódulo (TAIZ & ZIEGER, 2004; FRANCHE et al., 2009). Nas plantas não leguminosas, as bactérias fixadoras de N não formam nódulos e podem ser divididas em três grupos: organismos rizosféricos, são aquelas bactérias que colonizam o solo próximo às raízes (até 3 mm de distância da raiz); as endofíticas, são capazes de colonizar internamente os tecidos vegetais; e as epifíticas, colonizam a superfície dos tecidos vegetais (BALDANI et al., 1997).

Particularmente em cana-de-açúcar, a literatura relata diversos gêneros, como por exemplo, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* (LIMA, 2012; TAULÉ et al., 2011), *Burkholderia*, *Bacillus*, *Erwinia* (LIMA, 2012), *Xanthomonas*, *Acinetobacter*, *Rhizobium*, *Shinella*, *Agrobacterium* and *Achromobacter* (TAULÉ et al., 2011) e diferentes espécies, tais como: *Microbacterium testaceum*, *Pantoea Stewartii*, *Pantoea ananatis*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia cepacia* (MENDES et al., 2007) entre outras.

Na década de 50, o gênero *Beijerinckia* foi isolado da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em solos tropicais (DÖBEREINER & RUSCHEL, 1958; DÖBEREINER, 1959).

Estes gêneros, citados acima, possuem potencial promissor na associação com gramíneas, sendo utilizados em ensaios experimentais de inoculação em laboratório (testes *in vitro*), em casa de vegetação e em campo com diferentes espécies de plantas para avaliação da performance desses microrganismos na interação bactéria planta (FARIAS et al., 2012; LIMA, 2012).

Existem muitos estudos voltados para a inoculação bacteriana em plantas não leguminosas, buscando estirpes que quando inoculadas sejam eficientes na FBN e como consequência, a espécie de planta hospedeira seja beneficiada com o N fixado, incorporado-o nos diferentes compostos bioquímicos presentes na célula vegetal (TAIZ & ZIEGER, 2004; HUNGRIA et al., 2007; VITOUSEK et al., 2016), e desta forma desencadeiem benefícios nos sistemas produtivos, suprimindo as necessidades das plantas em N.

O N fixado pela FBN pode representar uma alternativa de substituição para os fertilizantes nitrogenados, tendo como vantagens a viabilidade econômica e a característica de não poluir o meio ambiente, tornando-se uma possibilidade de prevenir a degradação do meio e aumentar a segurança alimentar e adicionalmente oferecer subsídios à agricultura de subsistência devido ao baixo custo dos inoculantes (SANTOS et al., 2008).

2.4. Inoculação de bactérias em plantas de cana-de-açúcar

A interação entre as bactérias e as plantas pode ocorrer no solo, na rizosfera ou endofiticamente nos diferentes órgãos vegetais (HARTMANN et al., 2008; LIMA, 2012), contribuindo beneficentemente para o desenvolvimento das culturas agrícolas (ANDREOTE, 2009, FARIAS et al., 2012).

As bactérias benéficas ao desenvolvimento vegetal, ou seja, promotoras de crescimento vegetal, são bastante utilizadas em experimentos de inoculação em campo para avaliação de diferentes funcionalidades, dentre elas a FBN. Em gramíneas, como cana-de-açúcar, milho e sorgo, entre outras, os estudos ainda são incipientes. No entanto, grandes avanços têm sido observados na literatura em relação à manipulação das associações bactérias diazotróficas com as gramíneas e, em termos de identificação da contribuição da FBN, objetivam encontrar linhagens bacterianas eficientes na fixação do N atmosférico, capazes de suprir a exigência nutricional da planta em relação a esse macronutriente e, conseqüentemente, reduzir a demanda de fertilizante nitrogenado nas gramíneas (MARIM, 2010).

Espécies bacterianas, tais como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Burkholderia tropica* estão sendo utilizadas nos últimos anos em estudos de inoculação em cana-de-açúcar para avaliar a contribuição das bactérias promotoras de crescimento vegetal (REIS et al., 2009; SCHULTZ et al., 2012; BENEDUZI et al. 2013; GÍRIO et al., 2015). No entanto, ainda não há uma composição bacteriana utilizada para compor um inoculante aceito e registrado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que se possa utilizar nos cultivos de cana-de-açúcar.

Há relatos na literatura que inoculantes com bactérias diazotróficas (*Glucanocetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Bulkolderia tropica*) promovem

incremento de desenvolvimento vegetal, inclusive na produtividade, apresentando similaridade à adição de 120 kg ha⁻¹ de N, como nas variedades de cana-de-açúcar RB 867515 e RB 72454 (SCHULTZ et al., 2012). Estes estudos são incipientes, não sendo suficientes para estabelecer um inoculante, por isso existe a necessidade eminente de prosseguir com as pesquisas, testando esses e outros gêneros bacterianos em diferentes solos, variedades e veículos utilizados para inoculação, em cultivos consecutivos de cana-de-açúcar.

Na literatura há relatos de diferentes autores sobre a resposta benéfica da inoculação de bactérias sobre o desenvolvimento vegetal, tais como: Reis et al. (2009), Lima (2012), Beneduzi et al. (2013), Schultz et al. (2014), Liu et al. (2015), Gírio et al. (2015) e Marcos et al. (2016), que avaliaram a inoculação em plantas de cana-de-açúcar e observaram que a fisiologia pode ser alterada de modo a causar aumento de diferentes variáveis de crescimento, fisiológicas e de produção, como por exemplo: produtividade (REIS et al., 2009; SCHULTZ et al. 2012; BENEDUZI et al. 2013; SCHULTZ et al. 2014); matéria seca da parte aérea e da raiz (LIMA, 2012; GÍRIO et al., 2015); conteúdo de N na parte aérea das plantas (SCHULTZ et al., 2012); número de perfilhos, número de folhas, altura da planta (LIMA, 2012, GÍRIO et al., 2015); velocidade de brotação (GÍRIO et al., 2015); germinação (BENEDUZI et al., 2013); concentração de polissacarídeos (LIU et al., 2015); fotossíntese, condutância estomática, concentração de sacarose e na atividade da nitrogenase (MARCOS et al., 2016).

A presente pesquisa propôs realizar inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal, de gêneros bacterianos já utilizados em outras pesquisas, como o gênero *Burkholderia*, bem como gêneros não testados em inoculação, tais como, o gênero *Pantoea* e o *Stenotrophomonas*. Além de avaliar diferentes variáveis fisiológicas, assim como a nutrição nitrogenada, produtividade e fixação biológica de nitrogênio ao longo do período experimental, em fases importantes do ciclo da cana-de-açúcar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Descrição e caracterização da área experimental

O experimento com cultivo de cana-de-açúcar foi conduzido de novembro de 2013 a janeiro de 2015, na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar do Carpina

(EECAC), de propriedade da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), no município de Carpina/Pernambuco.

O município está localizado na Zona da Mata Norte do Estado, com altitude média de 180 m e coordenadas geográficas de 7°51'04'' S e 35°14'27'' W. O clima predominante na região é do tipo As', tropical chuvoso com verão seco e temperatura média anual de 24,2 °C (BELTÃO et al., 2005; IBGE 2014). A precipitação pluvial durante o experimento foi de 1.011 mm. Adicionalmente, nos 5 primeiros meses após o plantio foram adicionadas 5 lâminas de 35 mm de água (Figura 1).

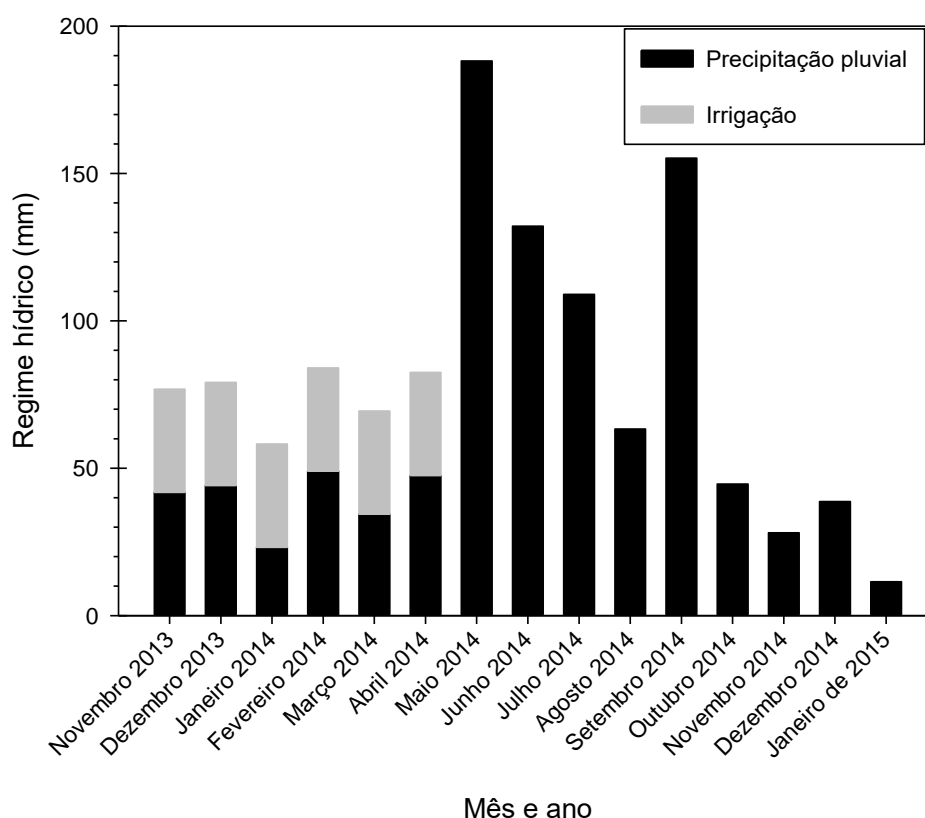


Figura 1. Quantidade de água (precipitação pluvial e irrigação) durante o experimento de campo na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar do Carpina (EECAC), em Carpina – PE. No período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015.

O solo da área experimental foi classificado como ARGISSOLO VERMELHO AMARELO distrocoeso segundo Oliveira 2012 de acordo com o manual do IPA (2008). A caracterização química e física do solo foi realizada em duas profundidades: 0,0-0,2 e 0,2-0,4 m. As amostras para a realização da caracterização foram retiradas

após a demarcação do experimento e coletadas por parcela experimental. Foram retiradas aleatoriamente três amostras simples para composição de uma amostra composta.

A caracterização química do solo foi realizada com a determinação do pH (água), Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Al^{3+} , acidez potencial (H+Al), P, N total e carbono orgânico total (COT) (Tabela 1). O Ca^{2+} , Mg^{2+} e Al^{3+} foram extraídos com KCl 1,0 mol L⁻¹ e dosados por espectrofotometria de absorção atômica. O P, K^+ e Na^+ foram extraídos com Mehlich-1. O P foi dosado por espectrofotometria colorimétrica e o K^+ e Na^+ por fotometria de chama. O (H+Al) foi extraído com acetato de Ca 0,5 mol L⁻¹ e dosado por titulometria. O COT foi determinado por combustão úmida com dicromato de K e dosado por titulometria. O N total foi extraído por digestão sulfúrica, com posterior destilação por arraste de vapores pelo método de Kjeldahl e titulado com HCl 1,0 mol L⁻¹.

Todas as análises químicas foram realizadas conforme metodologias descritas pelo Manual de Métodos de Análise de Solo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA (EMBRAPA, 2009), com exceção do N total do solo e da água pluvial e da irrigação que foi determinado, conforme Tedesco et al. (1995).

Os resultados destas análises químicas permitiram calcular a saturação por bases (V), a saturação por Al (m), a capacidade de troca de cátions efetiva (CTC efetiva) e a capacidade de troca de cátions potencial (CTC potencial) (Tabela 1).

Para a determinação do teor de N contido na água da precipitação pluvial, as amostras foram coletadas ao longo do período experimental, sempre próximos das avaliações, aos 120, 240 e 360 DAP, sendo na ordem de 0,004% aos 120 e 240 dias após o plantio (DAP) e de 0,006% aos 360 DAP. O teor de N contido na água de irrigação foi de 0,005%.

A caracterização física do solo foi realizada com a determinação da granulometria, densidade do solo, densidade das partículas e das umidades na capacidade de campo (Θ_{CC}) e no ponto de murcha permanente (Θ_{PMP}). A determinação da granulometria do solo permitiu definir sua classe textural por profundidade e com as densidades se calculou a porosidade total do solo.

Todas as análises físicas foram realizadas no laboratório de física do solo da EECAC, de acordo com a metodologia proposta pelo Manual de Métodos de Análise de Solo da EMBRAPA (EMBRAPA 1997).

Tabela 2. Atributos químicos e físicos do ARGISSOLO VERMELHO AMARELO distrocoeso em diferentes profundidades na área do experimento de campo na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar do Carpina, em Carpina –PE, antes da adubação de fundação.

Atributo	Profundidade	
	0-20	20-40
pH _{água} (1:2,5)	5,4	5,1
H+Al (cmol _c dm ⁻³)	2,63	2,77
Ca ²⁺ (cmol _c dm ⁻³)	2,73	2,25
Mg ²⁺ (cmol _c dm ⁻³)	0,01	0,01
Al ³⁺ (cmol _c dm ⁻³)	0,19	0,32
Na ⁺ (cmol _c dm ⁻³)	0,03	0,03
K ⁺ (cmol _c dm ⁻³)	0,18	0,11
P (mg dm ⁻³)	2,87	2,42
NT (%)	0,29	0,22
Relação C/N (g k ⁻¹ /g k ⁻¹)	11,77	13,45
COT (g kg ⁻¹) ¹	3,34	2,96
MO (g kg ⁻¹) ²	5,11	5,76
CTC efetiva (cmol _c dm ⁻³) ³	3,12	2,69
CTC potencial (cmol _c dm ⁻³) ⁴	5,59	5,16
V (%) ⁵	52,86	46,38
m (%) ⁶	6,11	11,81
Areia Total (g Kg ⁻¹)	743,00	679,00
Areia Trossa (g Kg ⁻¹)	564,20	531,60
Areia Fina (g Kg ⁻¹)	179,00	147,40
Silte (g Kg ⁻¹)	65,00	109,00
Argila (g Kg ⁻¹)	192,00	212,00
Classe Textural	Franco-arenosa	Franco-arenosa
Ds (kg dm ⁻³) ⁷	1,40	1,36
Dp (kg dm ⁻³) ⁸	2,47	2,53
PT (%) ⁹	43,24	46,29
Θ _{CC} (Mg Mg ⁻¹) ¹⁰	0,08	0,10
Θ _{PMP} (Mg Mg ⁻¹) ¹¹	0,03	0,03

¹Carbono orgânico total; ²Materia orgânica; ³Capacidade de troca de cátions efetiva; ⁴Capacidade de troca de cátions potencial; ⁵Saturação por bases; ⁶Saturação por alumínio; ⁷Densidade do solo; ⁸Densidade de partículas; ⁹Porosidade total; ¹⁰Umidade na capacidade de campo; ¹¹Umidade no ponto de murcha permanente.

3.2. Descrição do ensaio experimental

O experimento consistiu no cultivo de duas variedades de cana-de-açúcar, RB 92579 e a RB 867515, inoculadas com diferentes bactérias. O experimento foi instalado em campo em delineamento experimental de blocos casualizados, onde foram distribuídos quatro tratamentos de inoculação e duas testemunhas em duas variedades de cana-de-açúcar, em arranjo fatorial (6 x 2), com quatro repetições, totalizando 48 unidades experimentais (parcela).

Cada parcela foi composta por seis sulcos de 6 m de comprimento, espaçados por um metro, totalizando 42 m². A área útil foi formada pelos quatro sulcos centrais, descartando-se um metro das extremidades, totalizando 24 m². Os dois sulcos localizados nas extremidades da área útil foram utilizados para realização das amostragens destrutivas e os dois sulcos centrais para as amostragens não destrutivas.

Nas laterais do ensaio foram marcadas 12 parcelas com as mesmas dimensões das parcelas do experimento. Nestas parcelas deliberadamente se permitiu o crescimento de plantas espontâneas que serviram como plantas referência para avaliação da FBN pelo método da abundância natural do isótopo ¹⁵N.

3.3. Tratamentos

O experimento foi composto por 12 tratamentos. Quatro tratamentos corresponderam à inoculação de diferentes estirpes bacterianas pertencentes à coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGBM) da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG) da UFRPE (Tabela 2). Cada estirpe, *Pantoea* sp. (PT), *Burkholderia* sp. (BK), *Stenotrophomonas* sp. (ST), correspondeu separadamente a um tratamento e mais um quarto tratamento que correspondeu à mistura das três estirpes (BM).

Foram utilizados dois tratamentos testemunhas não inoculados: uma testemunha absoluta não adubada com N (TA) e uma testemunha nitrogenada adubada com N (TN).

Os quarto tratamentos de inoculação e os procedimentos utilizados nas testemunhas foram aplicados em duas variedades de cana-de-açúcar (RB 867515 e a RB92579) que foram produzidas e selecionadas pelo Programa de Melhoramento Genético da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA).

A escolha destas variedades foi porque elas foram utilizadas para coleta de material vegetal da rizosfera e da raiz de cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo na EECAC para o isolamento e identificação de BPCP's (LIMA, 2012). Adicionalmente, são variedades muito utilizadas nas unidades produtoras de cana-de-açúcar no Nordeste (SILVA et al., 2012).

A escolha das estirpes utilizadas no ensaio foi devido ao desempenho apresentado por elas em ensaio realizado em condições controladas e as diferentes características positivas apresentadas por elas e avaliadas *in vitro*, como: capacidade de crescer em meio livre de fonte nitrogenada; produzir ácido indol acético (AIA); produzir molécula *quorum sensing*; e solubilizar fosfato inorgânico (LIMA, 2012).

Tabela 3. Origem e identificação de bactérias pertencentes à coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGBM) da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), isoladas de plantas de cana soca na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar do Carpina (EECAC) em Pernambuco. Além das respectivas abreviaturas referentes aos tratamentos utilizados nesse trabalho.

Linhagem	Identificação	Abreviatura	Origem		
			Nicho	Variedade	Tempo de cultivo
UAGC 865	<i>Pantoea</i> sp.	PT	endofítico de raiz	RB92579	4 meses
UAGC 869	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	ST	endofítico de raiz	RB867515	4 meses
UAGC 904	<i>Burkholderia</i> sp.	BK	rizosfera	RB867515	4 meses
—————	Mistura de bactérias	MB	—————	—————	—————

3.4. Implantação do experimento

O preparo do solo foi realizado com o uso de grade aradora utilizada na incorporação de 1,48 Mg ha⁻¹ de calcário dolomítico, PRNT de 100%, 40 dias antes do plantio, o pH chegou a 5,4 na profundidade de 0,0 – 0,2 m. Após a gradagem pesada, utilizou-se grade niveladora e sulcador de aivecas de duas linhas.

Para a quantidade de corretivos e a adubação do plantio foi utilizado como base o Manual de Recomendação de Adubação para o Estado de Pernambuco (IPA, 2008), a calagem foi calculada através do método de elevação dos teores trocáveis de (Ca+Mg).

No plantio, a adubação da testemunha nitrogenada (TN) correspondeu à aplicação de 40, 60 e 70 kg ha⁻¹ de N, P₂O₅ e K₂O, respectivamente, no fundo do sulco de plantio. A testemunha absoluta (TA) e os tratamentos com inoculação bacteriana, mistura bacteriana (MB), *Burkholderia* sp. (BK), *Pantoea* sp. (PT) e *Stenotrophomonas* sp. (ST), não foram adubados com N. As fontes utilizadas dos adubos foram, respectivamente, sulfato de amônio, superfosfato triplo e cloreto de potássio.

As parcelas onde cresceram as plantas espontâneas que serviram de plantas referência para aplicação do método da abundância natural receberam a mesma adubação da cana-de-açúcar, com exceção da fertilização nitrogenada. Como o crescimento destas plantas foi espontâneo, se optou por coletar e identificar aquelas que tiveram um crescimento mais abundante, o que permitiu a coleta delas aos 120, 240 e 360 DAP.

As linhagens bacterianas foram repicadas em placas de Petri contendo meio TSA (Trypcase Soy Agar) (LIMA, 2012; FARIAS, 2012) para obtenção de colônias isoladas. Em seguida, as colônias isoladas foram inoculadas em 500 mL de meio TSA líquido e incubadas por 24 h sob agitação constante (150 rpm). Em seguida, esses pré-inóculos foram transferidos para recipientes contendo 16 L de meio TSA líquido que foram oxigenados através do uso de compressores com capacidade de bombear para dentro do meio 7 L de O₂ por minuto, durante, aproximadamente 72 h.

Posteriormente, os recipientes foram levados para a área experimental e realizada a diluição de 1:50 em água (REIS et al., 2009; BENEDUZI et al., 2013) para atingir 10⁸ unidades formadoras de colônias – UFC mL⁻¹ (LIMA, 2012). A diluição foi realizada em caixa d'água com capacidade para 250 L, onde foram colocados rebolos de cana seccionados com aproximadamente três gemas e submersos por 30 minutos a uma temperatura média de 25,8 °C.

Os rebolos tratados dos tratamentos de inoculação e os das testemunhas absoluta e nitrogenada foram plantados em sulcos de aproximadamente 0,2 m de profundidade e foram distribuídos com densidade de aproximadamente 15 gemas por metro.

O teor de N total contido nos rebolos de cana-de-açúcar, com idade de 7 meses aproximadamente, foi de 1,82 g kg⁻¹ para a variedade RB 867515 e de 2,8 g kg⁻¹ para a variedade RB 92579.

3.5. Variáveis e metodologias usadas na avaliação do ensaio em solo e planta

3.5.1. Solo

Para avaliação do experimento foi realizada coleta de solo no dia da implantação do experimento, antes da adubação, e aos 120, 240 e 360 DAP para análise de N total do solo.

A coleta das amostras antes da implantação do experimento foi realizada por parcela, coletando-se 3 amostras simples para formar uma composta. As amostras foram retiradas com uso de um trado nas profundidades de 0,0-0,2 m e 0,2-0,4 m de profundidade na linha das parcelas centrais, a uma distância média de 10 cm do centro do sulco.

Após a instalação do experimento aos 120, 240 e 360 DAP amostras de solo foram retiradas na linha das parcelas centrais, com auxílio de um trado, coletando-se as amostras de 0,0-0,2 m e 0,2-0,4 m de profundidade de forma sistemática, duas amostras simples para formar uma composta.

3.5.2. Planta

Em planta, as avaliações foram realizadas aos 120, 240 e 360 DAP, visto que correspondem a fases do desenvolvimento da espécie, tais como, máximo perfilhamento, crescimento vegetativo e acúmulo da sacarose, maturação dos colmos com o máximo acúmulo de sacarose, respectivamente.

As avaliações realizadas ao longo do período experimental foram:

- Monitoramento do crescimento vegetativo (diâmetro, altura da planta e número de folhas e colmos);
- Determinação da matéria seca na parte aérea e por compartimento da planta (ponteiro, folha e colmo) e determinado o teor de N total para quantificação do N acumulado, como também o teor de N total nas raízes;
- Coletada folhas para determinação de pigmentos fotossintéticos (clorofila) e compostos orgânicos (aminoácidos e proteínas);

- Coletada de folha +1 e raízes para avaliação da atividade da nitrogenase;
- Coletada de folha +1 e de plantas espontâneas para avaliação da fixação biológica de N (FBN) pelo método da abundância natural do isótopo $\delta^{15}N$;

No fim do período experimental foi avaliada a produtividade da cana (TCH) e coletado colmos frescos para determinação das análises tecnológicas, como TPH e ATR; Além de ser realizado um balanço de N no sistema solo/planta para estimar a contribuição da FBN em cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo.

3.5.2.1. *Produtividade e variáveis tecnológicas*

O corte das canas e a avaliação da produtividade de colmos por hectare (TCH) foi realizada aos 420 DAP. A variável TCH foi calculada tomando-se como base a produção de colmos na parcela útil, que foi aferida em campo pela pesagem com dinamômetro.

No final do período experimental, foram coletadas plantas em um metro por parcela para a realização das análises tecnológicas, que foram feitas no laboratório da Usina Petribu S/A, no município de Lagoa de Itaenga – PE.

As variáveis agroindustriais determinadas e a produtividade serviram para calcular a produção de açúcar por hectare (TPH), conforme Lima Neto et al. (2013).

3.5.2.2. *Monitoramento do crescimento vegetativo e produção de matéria seca*

Ao longo do período experimental foi avaliada aos 120, 240 e 360 DAP o crescimento das plantas. Foi mensurado o diâmetro, medido com uso de paquímetro automático (Diginess) a 10 cm do solo. A altura da planta foi realizada até a folha +1 com uso de uma trena. Para a determinação do número de folhas, foram contadas todas as folhas com mais de 20% do limbo foliar em bom estado e completamente expandido, e o número de colmos foi determinado a partir da contagem dos colmos nitidamente definidos.

Para a determinação da matéria seca da parte aérea das plantas foram coletadas três plantas por parcela aos 120 e 240 DAP. Aos 360 DAP coletou-se 10 plantas por parcela e determinou-se a matéria seca da parte aérea por compartimento (colmo, folha e ponteiro). As plantas foram trituradas em forrageira, posteriormente pesadas para obtenção da matéria fresca. Em seguida foram retiradas subamostras e armazenadas em

sacos de papel e colocadas em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C, onde permaneceram até atingirem peso constante (BENINCASA, 2003).

3.5.2.3. *Teor e conteúdo de N*

O teor de N foi determinado na matéria seca da parte aérea, nos diferentes compartimentos da planta (colmo, folha, ponteiro e raiz) aos 360 DAP.

As amostras foram fracionadas de acordo com os respectivos órgãos (colmo, folha, ponteiro e raiz), e secas em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C até atingir peso constante. Depois foram trituradas e amostras com massa de 0,1 g pesadas para posteriormente serem digeridas em solução sulfúrica e analisadas pelo método de Kjeldahl (EMBRAPA, 2009).

O teor de N na parte aérea foi obtido através de uma média ponderada dos teores dos diferentes compartimentos (colmo, folha e ponteiro) e os respectivos pesos de matéria seca.

O acúmulo de N foi calculado com base no teor de N da parte aérea e com a produção de matéria seca, sendo expresso em kg ha^{-1} , porque se utilizou o número de plantas por hectare que foi calculado a partir do número de plantas por m linear.

Para o acúmulo de N por compartimento, os procedimentos foram os mesmos utilizados para a parte aérea.

Não foi possível calcular acúmulo de N nas raízes porque não foi possível mensurar a matéria seca das raízes, pois como experimento foi em campo, tornando-se impossível de mensurar com precisão a matéria seca deste órgão.

3.5.2.4. *Pigmentos fotossintéticos*

Para a extração dos pigmentos fotossintetizantes foram coletadas três folhas +1 por parcela experimental e retirada uma fração do terço médio do limbo foliar, sem a nervura principal, pesados 100 mg de matéria fresca da amostra, picotados e em seguida colocados em tubos de ensaio rosqueados contendo 10 mL de acetona a 80%. Os tubos foram cobertos com papel alumínio para evitar passagem de luz e colocados em local refrigerado por 24 h.

Após este período foi realizada a quantificação dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a*, *b*) que foi determinada de acordo com a metodologia de Lichtenthaler & Buschamann (2001) nos comprimentos de onda 663 e 647 nm, com o uso do

espectrofotômetro (Biospectro, modelo SP-220). A clorofila total foi obtida a partir da soma da clorofila *a* e clorofila *b*. Os teores dos pigmentos foram calculados pelas fórmulas descritas abaixo e expressos em $\mu\text{mol mg}^{-1}$ (LICHTENTHALER & BUSCHMANN, 2001):

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g/mL}) = 12,25 \times A_{663} - 2,79 \times A_{647}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ } (\mu\text{g/mL}) = 21,50 \times A_{663} - 5,10 \times A_{647}$$

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{g/mL}) = \text{Clo } a + \text{Clo } b$$

3.5.2.5. *Proteínas e aminoácidos*

Foram coletadas amostras de folha +1 aos 120, 240 e 360 DAP, 3 repetições por parcela experimental, retirando-se 1g do limbo foliar sem nervura para extração com tampão fosfato monobásico 100 mM, pH 7, contendo EDTA a 0,1 mM e N líquido. A partir do extrato obtido foram quantificadas as concentrações de proteína e aminoácidos.

A determinação de proteína foi realizada pelo método da ligação ao corante *coomassie brilliant blue* (BRADFORD, 1976), utilizando-se como padrão albumina sérica bovina. Os aminoácidos foram analisados pelo método de ninhidrina (YEMM & COCKING, 1955), utilizando-se glicina como padrão. Os resultados das análises foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ de matéria fresca.

3.5.2.6. *Estimativa da atividade da enzima nitrogenase*

A atividade da enzima nitrogenase (AN) foi determinada através da técnica de redução de acetileno, adaptando-se a metodologia descrita por Hardy et al. (1968). Ela foi realizada em amostras compostas por três folhas +1 e em uma porção de raízes de três touceiras de cana-de-açúcar coletada aleatoriamente por parcela.

As amostras de raiz e folha foram colocadas, separadamente, em frascos de vidro de 900 mL, que foram hermeticamente fechados. Em seguida, para não alterar a pressão interna dos frascos de vidro, retirou-se 90 mL de ar e introduziu-se 90 mL de acetileno, deixando-os incubados por uma hora. Após este período, foi coletado 9 mL da atmosfera dos recipientes para ser armazenado em frasco de *vacunteiner* de mesmo volume.

A determinação da redução do acetileno e produção de etileno foi realizada em cromatógrafo a gás com coluna PORAPAK N empacotada, detector de ionização de

chama, com temperaturas de forno, de injetor e de detector de, respectivamente 70; 130; e 150 °C e vazões de N₂ (gás de arraste), H₂ e O₂ de, respectivamente 30; 30; e 300 mL min⁻¹.

A estimativa da AN foi calculada de acordo com Boddey et al. (2007) pela seguinte equação:

$$AN = \frac{(E_2 - E_1) \cdot V \cdot K_E}{244,50 \cdot S_E \cdot t \cdot m}$$

Onde:

AN = atividade da nitrogenase (mmol de C₂H₄ h⁻¹ g⁻¹);

E1 = área do pico de etileno na amostra inicial;

E2 = área do pico de etileno na amostra final;

V = volume do frasco (mL);

KE = concentração do pico de etileno no padrão (mg L⁻¹);

SE = área do pico de etileno no padrão;

t = tempo de incubação (h);

m = massa do tecido vegetal (g).

3.5.2.7. Determinação da abundância natural do isótopo ¹⁵N (δ¹⁵N)

As amostras de folhas +1 utilizadas para quantificar a AN foram as mesmas utilizadas para a determinação da razão ¹⁵N/¹⁴N para estimativa do valor de δ¹⁵N. Para isso as folhas coletadas aos 120, 240 e 360 DAP foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C, trituradas em moinho de facas e tamisadas em peneira de 100 mesh para determinação, em espectrômetro de massa, do teor de ¹⁵N e estimativa do δ¹⁵N.

Simultaneamente foram coletadas a parte aérea de 5 espécies de plantas espontâneas (*Emilia coccínea* (Sims) G. Don, *Euphorbia hyssopifolia* L., *Pavonia sidifolia* Kunt, *Pycreus decumbens* T. Koyama, *Commelina benghalensis* L.) que foram usadas como referência para determinação do δ¹⁵N.

3.5.2.8. *Balanço de N no sistema solo/planta*

O balanço de N no sistema solo/planta foi calculado segundo Urquiaga et al. (2012), com o conteúdo de N na parte aérea expresso em kg ha^{-1} , a quantidade de N inicial no solo expressa em kg ha^{-1} até a profundidade de 0,4 m, a quantidade de N adicionada pela adubação (apenas no tratamento TN), a quantidade de N adicionada pela água pluvial e irrigação, a quantidade de N adicionada na semente de plantio e a quantidade de N final no solo expressa em kg ha^{-1} até a profundidade de 0,4 m.

O conteúdo de N na parte aérea foi calculado como descrito no item 7.5.2.3. e as quantidades de N no solo inicial e final foram calculadas utilizando-se os teores de N inicial antes da adubação e do plantio e aos 360 DAP. Para isso, se utilizou a densidade do solo para expressar N armazenado até 0,4 m de profundidade.

O balanço foi calculado pela seguinte expressão:

(Conteúdo de N na parte aérea + N final do solo) - (N inicial do solo + N adubação + N precipitação pluvial + Irrigação + N semente de plantio)

De acordo com Urquiaga et al. (2012) esse balanço pode ser chamado de contribuição da fixação biológica de N (FBN).

3.5.2.9. *Análise estatística*

Os dados das variáveis dependentes foram submetidos à análise da variância pelo teste F ($p < 0,05$) em função dos tratamentos inoculados, das testemunhas e das variedades. Excepcionalmente, para o balanço de N os dados foram analisados por variedade.

Os dados de solo foram analisados separadamente por profundidade e tempo de coleta, no entanto os dados de planta foram analisados separadamente por tempo de coleta e por compartimento no caso do N acumulado na parte aérea.

Nas variáveis em que os efeitos principais e/ou interação foram significativos, se aplicou o teste de médias de Scott Knott ($p < 0,05$). O pacote estatístico utilizado foi o software estatístico SAS[®] versão 2.0.

Para contrastar os efeitos dos tratamentos inoculados com as testemunhas, absoluta (TA) e nitrogenada (TN), foram realizados contrastes ortogonais pelo programa estatístico SISVAR, usado como software auxiliar. Para testar os contrastes foi utilizado os testes t e F ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teor de Nitrogênio na folha+1 e raiz

Os dados do teor de N na folha +1 da cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo variaram de forma semelhante ao longo do período experimental. Os intervalos de variação foram de 7,8 a 10,03 g kg⁻¹ aos 120 DAP, de 6,75 a 11,26 g kg⁻¹ aos 240 DAP e de 5,4 a 10,09 g kg⁻¹ aos 360 DAP para as duas variedades (Tabela 4). Aos 120 dias não foi observado diferença significativa para os diferentes tratamentos, para as variedades e nem para o efeito de interação. Semelhantemente ocorreu com o teor de N na folha aos 240 dias, pois não diferiu entre os tratamentos e nem para o efeito de interação, diferindo apenas entre as variedades, apresentando maior teor de N (8,87 g kg⁻¹) para a RB 92579.

Aos 360 DAP não foi observado diferença significativa para tratamento e variedade, porém houve diferença no efeito de interação, revelando que o efeito dos tratamentos dependeu da variedade. A inoculação de bactérias do gênero *Stenotrophomonas* (Tratamento ST) fez com que o teor de N na variedade RB 92579 se diferenciasse da variedade RB 867515 (Tabela 4), apresentando um acréscimo de 46%.

Por outro lado, os contrastes revelaram, na comparação entre os grupos, que os teores de N dos tratamentos inoculados foram semelhantes às das testemunhas TN e TA e que aos 240 DAP, a testemunha nitrogenada teve maior teor de N do que os tratamentos inoculados na variedade RB 92579 (Tabela 4) como pode ser observado no teste t.

Nas raízes houve diferença significativa entre as variedades ao longo de todo o período experimental, com a variedade RB 867515 tendo um maior teor de N do que a RB 92579 (Tabela 5). Semelhantemente ao que ocorreu com os teores de N na folha +1, também nas raízes os tratamentos inoculados não diferiram das testemunhas TN e TA, exceto aos 240 DAP em que os tratamentos inoculados apresentaram menor teor de N do que a testemunha nitrogenada, neste compartimento em ambas as variedades. Como pode ser visto, esta afirmativa foi reafirmada pelo contraste (Tabela 5).

Tabela 4. Teor de nitrogênio na folha +1 de cana-de-açúcar, variedade RB 92579 e RB 867515, inoculadas com bactérias diazotróficas, no primeiro ciclo de cultivo. Foi realizada análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade

Variedade	Teor de N (120 DAP)							Teor de N (240 DAP)							Teor de N (360 DAP)						
	Tratamento						Média	Tratamento						Média	Tratamento						Média
	TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST	
	g kg ⁻¹																				
RB 579	9,16	10,03	9,06	9,4	8,69	8,99	9,22	8,37	11,26	7,49	8,83	9,14	8,12	8,87A	7,08Aa	8,69Aa	7,69Aa	8,18Aa	6,81Aa	10,09Aa	8,09
RB 7515	8,87	9,28	9,9	8,33	8,15	7,8	8,72	8,28	7,37	6,75	6,27	8,39	7,83	7,48B	9,75Aa	7,87Aa	9,23Aa	8,32Aa	8,15Aa	5,40Ba	8,12
Média	9,01	9,65	9,48	8,86	8,42	8,39		8,32	9,31	7,12	7,55	8,76	7,97		8,41	8,28	8,46	8,25	7,48	7,75	
Teste F (Var.)				1,418 ^{ns}							10,939 ^{**}							0,002 ^{ns}			
Teste F (Trat.)				1,032 ^{ns}							2,427 ^{ns}							0,264 ^{ns}			
Teste F (Int.)				0,505 ^{ns}							2,163 ^{ns}							2,847 [*]			
C.V. (%)				16,23							17,75							26,95			

	Teor de N (120 DAP)		Variedade RB 92579 Teor de N (240 DAP)		Teor de N (360 DAP)	
	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN
Teste t (p>0,05)	- 0,155 ^{ns}	- 1, 218 ^{ns}	0,034 ^{ns}	- 3,538 ^{***}	0,913 ^{ns}	- 0,408 ^{ns}
Teste F (p>0,05)	0,024 ^{ns}	1,483 ^{ns}	0,001 ^{ns}	12,519 ^{***}	0,834 ^{ns}	0,166 ^{ns}
	Teor de N (120 DAP)		Variedade RB 867515 Teor de N (240 DAP)		Teor de N (360 DAP)	
	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN
Teste t (p>0,05)	- 0,398 ^{ns}	- 0,898 ^{ns}	- 1,190 ^{ns}	- 0,074 ^{ns}	- 1,615 ^{ns}	- 0,074 ^{ns}
Teste F (p>0,05)	0,158 ^{ns}	0,807 ^{ns}	1,415 ^{ns}	0,005 ^{ns}	2,607 ^{ns}	0,006 ^{ns}

Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas iguais na linha indicam que os efeitos estudados não diferem pelo teste de Scott Knott (p>0,05). ^{ns} Não Significativo; *, ** e *** Significativo a 5; 1; e 0,1% de probabilidade, respectivamente. Testemunha Absoluta (TA) e Nitrogenada (TN); Tratamento *Burkholderia* (BK), *Pantoea* (PT) e *Stenotrophomonas* (ST).

Tabela 5. Teor de nitrogênio na raiz de cana-de-açúcar, variedades RB 92579 e RB 867515, inoculada com bactérias diazotróficas, no primeiro ciclo de cultivo. Foi realizada análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade

Variedade	Teor de N (120 DAP)							Teor de N (240 DAP)							Teor de N (360 DAP)						
	Tratamento						Média	Tratamento						Média	Tratamento						Média
	TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST	
	g kg ⁻¹																				
RB 579	4,8	6,43	4,65	5,37	6,24	5,13	5,44B	3,81	4,96	4,25	4,09	3,57	3,76	4,07B	4,37	4,46	4,11	4,57	4,14	3,31	4,16B
RB 7515	6,02	7,05	5,84	5,54	6,11	6,52	6,18A	4,68	5,36	4,47	3,95	4,42	5,2	4,68A	5,41	4,2	4,43	4,74	4,17	5,36	4,72A
Média	5,41	6,74	5,24	5,45	6,17	5,82		4,25b	5,16a	4,36b	4,02b	4,00b	4,48b		4,89	4,33	4,27	4,65	4,15	4,34	
Teste F (Var.)			6,054*							10,797**							5,117*				
Teste F (Trat.)			2,339 ^{ns}							3,577*							0,836 ^{ns}				
Teste F (Int.)			0,706 ^{ns}							1,541 ^{ns}							1,964 ^{ns}				
C.V. (%)			18,05							14,63							19,26				

	Teor de N (120 DAP)		Variedade RB 92579 Teor de N (240 DAP)		Teor de N (360 DAP)	
	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN
Teste t (p>0,05)	0,940 ^{ns}	- 1,840 ^{ns}	0,297 ^{ns}	- 2,920**	- 0,700 ^{ns}	- 0,902 ^{ns}
Teste F (p>0,05)	0,884 ^{ns}	3,387 ^{ns}	0,088 ^{ns}	8,525**	0,490 ^{ns}	0,813 ^{ns}

	Teor de N (120 DAP)		Variedade RB 867515 Teor de N (240 DAP)		Teor de N (360 DAP)	
	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN
Teste t (p>0,05)	- 0,039 ^{ns}	- 1,797 ^{ns}	- 0,476 ^{ns}	- 2,372*	- 1,543 ^{ns}	0,997 ^{ns}
Teste F (p>0,05)	0,002 ^{ns}	3,228 ^{ns}	0,227 ^{ns}	5,629*	2,382 ^{ns}	0,994 ^{ns}

Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas iguais na linha indicam que os efeitos estudados não diferem pelo teste de Scott Knott (p>0,05). ^{ns} Não Significativo; * e ** Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente. Testemunha Absoluta (TA) e Nitrogenada (TN); Tratamento *Burkholderia* (BK), *Pantoea* (PT) e *Stenotrophomonas* (ST).

De maneira geral, o teor de N na folha+1 da cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo foi maior do que nas raízes, com um acréscimo superior a 56% e em alguns casos chegou a aproximadamente 70% para diferentes variedades, nos diferentes tratamentos, que tiveram médias gerais que variaram de 7,12 a 9,01 g kg⁻¹ para o teor de N na folha+1 e de 4,00 a 6,74 g kg⁻¹ nas raízes.

É interessante ressaltar que o teor de N nas raízes nos tratamentos inoculados aos 120 e 360 DAP não diferiram estatisticamente da TN e nem da TA, constatando que o N foi absorvido igualmente em todos os tratamentos. O N dos tratamentos inoculados e TA não foram oriundos da adubação nitrogenada e sim, de outra fonte, que pode ser mineralização da matéria orgânica ou FBN (Tabela 5).

Essa afirmação é pertinente, porque se em plantas de cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo, a oferta do N é maior do que em cana-de-açúcar de ciclos subsequentes, como defende boa parte dos pesquisadores, e é o que justifica a não resposta à adubação nitrogenada no primeiro ciclo, então era de se esperar que o teor de N no tratamento nitrogenado fosse bem maior do que o observado. Se há, além do N proveniente da matéria orgânica, da mineralização presente no solo, que como pode ser visto na tabela 2 é de baixa representatividade, e mais o N proveniente da adubação, os teores seriam maiores no tratamento nitrogenado. O que pode ter ocorrido é que nos tratamentos inoculados o N proveniente da matéria orgânica é o mesmo que o do tratamento nitrogenado. O N a mais nos tratamentos inoculados é provavelmente da FBN, o que corresponderia a aproximadamente ao N colocado como adubo no tratamento nitrogenado, e por isso, não ocorreu diferença nos teores entre estes tratamentos. Pode se constatar também que nenhum tratamento inoculado se destacou, ou seja, as estirpes atuaram individualmente e em conjunto, no tratamento mistura bacteriana.

Urquiaga et al. (2012a) e Schultz et al. (2012) comentaram que vários fatores, como o genótipo da planta, o elevado teor de matéria orgânica no solo, as condições climáticas favoráveis durante o período experimental e a irrigação de salvação podem atuar no desenvolvimento da cana-de-açúcar, fazendo com que se tenha baixas respostas a adubação nitrogenada e a inoculação, tornando mais difícil de comprovar os benefícios causados pelas bactérias promotoras de crescimento vegetal neste ciclo da cultura.

Aos 240 DAP o teor de N nas raízes do tratamento nitrogenado foi maior do que nos tratamentos inoculados e na testemunha absoluta, independente da variedade (Tabela 5). Neste caso, o aporte de N proveniente da FBN não parece ter sido capaz de superar ou se assemelhar ao N proveniente do fertilizante. Como a FBN parece ser um fenômeno variável durante o ciclo da cultura, esse provavelmente foi um período de redução da atividade biológica de fixação.

Com relação ao benefício da inoculação no teor de N, também mencionados na literatura, na qual há registros que relatam resposta positiva no teor de N nas plantas quando inoculadas com bactérias diazotróficas. Pereira et al. (2013) avaliando a influência da inoculação bacteriana de diazotróficas, por meio de um coquetel bacteriano: *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia tropica* e *Azospirillum amazonense*; e três bactérias individualizadas: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia gladioli*, em plantas de cana-de-açúcar de diferentes variedades (RB72454, RB867515, RB92579, RB918639, RB92606 e RB855536), cultivadas em um Planossolo Háptico distrófico, observaram que o teor de N variou dependendo dos genótipos, no entanto não diferiram significativamente entre os tratamentos.

4.2. Conteúdo de N na parte aérea

O conteúdo de N na parte aérea da cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo diferenciou-se significativamente entre os tratamentos, com o TN (210 kg ha⁻¹) e MB (207 kg ha⁻¹) com as maiores médias. As plantas inoculadas com a mistura de bactérias tiveram maior conteúdo de N do que os demais tratamentos com inoculantes individualizados e a TA, independente da variedade (Tabela 6). De forma semelhante ao que ocorreu com o teor de N na folha +1 e na raiz, que também apresentaram as menores médias para os tratamentos inoculados (Tabelas 4 e 5).

Tabela 6. Conteúdo de nitrogênio na parte aérea da cana-de-açúcar, variedades RB 92579 e RB 867515, inoculada com bactérias diazotróficas, no primeiro ciclo de cultivo. Foi realizada análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade

	Tratamento						Média
	TA	TN	BK	MB	PT	ST	
Variedade	Conteúdo de N na parte aérea (kg ha ⁻¹)						
RB 92579	138	205	136	200	134	145	160
RB 867515	113	215	199	213	129	164	172
Média	125 ^b	210 ^a	168 ^b	207 ^a	131 ^b	155 ^b	
Teste F (variedade)	0,449 ^{ns}						
Teste F (Tratamento)	2,505*						
F (Interação)	0,400 ^{ns}						
CV (%)	39,1						
Variedade RB 92579							
Tratamentos Inoculados versus	TA			Tratamentos Inoculados versus TN			
	0,451 ^{ns}			Teste t (p>0,05)			- 1,412 ^{ns}
	0,203 ^{ns}			Teste F(p>0,05)			1,993 ^{ns}
Variedade RB 867515							
Tratamentos Inoculados versus	TA			Tratamentos Inoculados versus TN			
	1,713 ^{ns}			Teste t (p>0,05)			- 1,078 ^{ns}
	2,996 ^{ns}			Teste F(p>0,05)			1,161 ^{ns}

Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas iguais na linha indicam que os efeitos estudados não diferem pelo teste de Scott Knott (p>0,05). ^{ns} Não Significativo; * Significativo a 5% de probabilidade. Testemunha Absoluta (TA) e Nitrogenada (TN); Tratamento *Burkholderia* (BK), *Pantoea* (PT) e *Stenotrophomonas* (ST).

Ao analisar o contraste ortogonal entre os inoculados e as testemunhas, verificase que em ambas as variedades o conteúdo de N dos inoculados não diferiu das testemunhas (Tabela 6). Os tratamentos inoculados se equivaleram a TN, constatando sua efetividade em ofertar N para as plantas. O que não ocorreu foi uma diferença entre

os inoculados e a TA. Isso coloca em dúvida se a origem do N dos inoculados é a fixação biológica ou mineralização da matéria orgânica, que não se diferencia entre inoculados e TA. Por outro lado, o que pode ter ocorrido também foi a FBN pela população nativa na TA.

O que se pode efetivamente ressaltar é que as plantas da TN se diferenciaram das plantas da TA, certamente porque o N mineralizado da matéria orgânica e o N aplicado como fertilizante proporcionaram uma maior oferta de N e conseqüentemente as plantas tiveram mais N em sua parte aérea (Tabela 6). O que se esperaria era que os tratamentos inoculados ofertassem além do N mineralizado da matéria orgânica, N originado pela fixação biológica, o que só ocorreu com o mix de bactérias (MB) (Tabela 6).

Outra hipótese plausível é que ainda se busca na pesquisa uma forma efetiva de inocular bactérias em gramíneas e pode ser que a inoculação de bactérias realizada nesse trabalho não tenha tido a efetividade que se esperava. O que não sustenta afirmativamente essa hipótese foi o desempenho do tratamento do mix de bactérias (MB), em que o conteúdo de N na parte aérea da cana-de-açúcar foi equivalente ao da TN e se diferenciou da TA (Tabela 6), constatando a efetividade da inoculação e a possibilidade da origem do N ter sido da fixação biológica.

Reis et al. (2009) e Schultz et al. (2012) constataram que a inoculação com bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar nas variedades RB867515 e RB72454, que não houve diferença estatística para o teor de N total da parte aérea nos tratamentos inoculados em relação a testemunha absoluta e nitrogenada em plantas de cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo. Nesses trabalhos o conteúdo de N nas plantas variaram de 136 a 242 kg ha⁻¹.

Schultz et al. (2014) ao trabalhar com inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de cana-de-açúcar das variedades RB867515 e RB72454 verificaram um acúmulo no conteúdo de N dos tratamentos inoculados em relação ao tratamento controle e menor ou igual ao tratamento nitrogenado em ambas as variedades. Neste trabalho, o conteúdo de N na parte aérea da cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo em Gleissolo variou, em média, de 139,5 a 163,3 kg ha⁻¹. Na primeira socaria variou de 128,2 a 125,4 kg ha⁻¹ e de 66,2 a 71,9 kg ha⁻¹ na segunda socaria, respectivamente.

Baptista et al. (2014) observaram que o conteúdo de N em plantas de cana-de-açúcar de diferentes variedades cultivadas em um Planossolo Háplico e inoculadas com

bactérias diazotróficas foram influenciados positivamente pelos diferentes inóculos utilizados, no primeiro ciclo de cultivo e nos dois ciclos subsequentes, independente da variedade de cana-de-açúcar avaliada.

O presente trabalho pode ter diferido dos demais tratamentos utilizados na discussão devido ao uso de diferentes gêneros bacterianos, gêneros estes não utilizados pelos autores em seus experimentos de inoculação, além dos distintos tipos de solos.

4.3. Conteúdo de N nos diferentes compartimentos (colmo, folha e ponteiro)

De maneira geral, observou-se que dentre os diferentes compartimentos da parte aérea das plantas, o compartimento com maior conteúdo de N foi o colmo (Tabela 7). Provavelmente, isso foi devido ao uso deste elemento em diferentes compostos bioquímicos, tais como os aminoácidos, ácidos nucleicos e proteínas acumulados neste compartimento.

Nos diferentes compartimentos da parte aérea da cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo, o conteúdo de N só se diferenciou no colmo, onde se observou que o tratamento inoculado BK (117 kg ha⁻¹) e MB (133 kg ha⁻¹) se equiparam a testemunha TN (144 kg ha⁻¹), tendo estes uma melhor performance do inóculo utilizado, quando comparados com o tratamento inoculado PT (73 kg ha⁻¹) e ST (96 kg ha⁻¹), que apresentaram redução 49% e 33%, respectivamente, no conteúdo de N quando comparados com a TN, demonstrando com este resultado resposta de caráter positivo a inoculação bacteriana (Tabela 7).

Os contrastes realizados entre os tratamentos inoculados e as testemunhas evidenciaram o que se vinha discutindo em relação ao conteúdo de N na parte aérea. No colmo da variedade RB 867515, a FBN ficou evidenciada porque o conteúdo de N dos tratamentos inoculados não se diferenciou da TN, porém se diferenciou da TA (Tabela 7). Portanto, foi observado também um efeito varietal, em que a FBN é mais efetiva na variedade RB 867515.

Tabela 7. Conteúdo de nitrogênio no colmo, folha e ponteiro de cana-de-açúcar, variedades RB 92579 e RB 867515, inoculada com bactérias diazotróficas, no primeiro ciclo de cultivo. Foi realizada análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade

Variedade	Conteúdo de nitrogênio no colmo						Média	Conteúdo de nitrogênio na folha						Média	Conteúdo de nitrogênio no ponteiro						Média
	Tratamento							Tratamento							Tratamento						
	TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST	
	kg ha ⁻¹																				
RB 579	97	140	82	137	78	104	106	4	28	12	26	25	18	19	37	37	42	37	30	23	34
RB 7515	40	148	152	128	68	88	104	33	10	23	32	20	33	25	41	57	23	53	40	43	43
Média	69b	144a	117a	133a	73b	96b		18	19	18	29	23	25		39	47	33	45	35	33	
Teste F (Var.)			0,023ns							1,039 ^{ns}							2,583 ^{ns}				
Teste F (Trat.)			2,872*							0,336 ^{ns}							0,889 ^{ns}				
Teste F (Int.)			1,279 ^{ns}							1,171 ^{ns}							1,335 ^{ns}				
C.V. (%)			49,41							98,81							47,1				

	Conteúdo de nitrogênio no colmo		Variedade RB 92579 Conteúdo de nitrogênio na folha		Conteúdo de nitrogênio no ponteiro	
	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN
Teste t (p>0,05)	0,118 ^{ns}	- 1,360 ^{ns}	1,341 ^{ns}	- 0,681 ^{ns}	- 0,329 ^{ns}	- 0,332 ^{ns}
Teste F (p>0,05)	0,014 ^{ns}	1,850 ^{ns}	1,797 ^{ns}	0,463 ^{ns}	0,109 ^{ns}	0,110 ^{ns}
	Variedade RB 867515		Conteúdo de nitrogênio na folha		Conteúdo de nitrogênio no ponteiro	
	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN
Teste t (p>0,05)	2,376*	- 1,352 ^{ns}	- 0,477 ^{ns}	1,420 ^{ns}	- 0,052 ^{ns}	- 1,669 ^{ns}
Teste F (p>0,05)	5,645*	1,828 ^{ns}	0,228 ^{ns}	2,016 ^{ns}	0,003 ^{ns}	2,786 ^{ns}

Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas iguais na linha indicam que os efeitos estudados não diferem pelo teste de Scott Knott (p>0,05). ^{ns} Não Significativo; * Significativo a 5% de probabilidade. Testemunha Absoluta (TA) e Nitrogenada (TN); Tratamento *Burkholderia* (BK), *Pantoea* (PT) e *Stenotrophomonas* (ST).

A afirmação de uma evidência da FBN na variedade RB 867515 é que a oferta de N da TN é a soma da mineralização da matéria orgânica e do N aplicado com o fertilizante nitrogenado, fazendo com que essa testemunha se diferencie da TA. Nos tratamentos inoculados, principalmente o mix de bactérias e o desempenho apresentado pela BK, a oferta de N é a soma da mineralização da matéria orgânica e o N, provavelmente, oriundo da FBN, que se equivaleu ao N aplicado como fertilizante, porque os inoculados não se diferenciaram da testemunha nitrogenada (Tabela 7).

Urquiaga et al. (2012) avaliando a contribuição da inoculação de bactérias em nove variedades de cana-de-açúcar durante nove ciclos de cultivo em Argissolo, observaram que o conteúdo de N na parte aérea variou de acordo com a variedade e com o tempo de plantio, tendendo a diminuir com os ciclos subsequentes. Além disso, foi observado que os diferentes órgãos acumularam diferentemente o N de acordo com a variedade, variando nos diferentes ciclos de cultivo.

Pereira et al. (2013) observaram que o acúmulo de N na biomassa de diferentes variedades de cana-de-açúcar (RB 72454, RB 867515, RB 92579, RB 918639, RB 92606 e RB 855536) cultivadas em um Planossolo Háptico distrófico e inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas foi influenciado pelos genótipos. Semelhantemente ao presente trabalho, os autores observaram que o teor de N para o ponteiro, nas variedades RB92579 e RB867515 não diferiram nos diferentes tratamentos inoculados e nem quando comparados com a testemunha absoluta e com a testemunha nitrogenada.

4.4. Análise de crescimento

Nas diferentes variáveis utilizadas para realizar a análise de crescimento apresentaram médias com baixa variação, não diferindo estatisticamente, na maioria das vezes, os fatores avaliados (tratamento e variedade) e nem o efeito de interação, tendo as médias dos tratamentos inoculados equiparadas aos da testemunha nitrogenada (Tabela 8).

Convém salientar que as médias da testemunha absoluta não diferiram das médias dos tratamentos inoculados, confirmando a suposição da possível atuação de bactérias nativas do solo e da planta. É possível também que outros fatores inerentes a variedade cultivada possam ter influenciado o desenvolvimento da cana-de-açúcar, como: N presente no solo, que foi de 0,29 e 0,22% para as profundidades 0,0-0,2 m e

0,2-0,4 m, respectivamente; tratos culturais; reserva de N da semente, cujo teor de N para as variedades RB 92579 e RB 867515 foi de 2,8 e 1,82 g kg⁻¹, respectivamente; o regime hídrico (precipitação pluvial e água de irrigação) que contribuíram com um total de 1.085 mm de água durante o ensaio.

O diâmetro do colmo não diferiu significativamente nos diferentes tratamentos nas épocas de avaliação, diferindo apenas entre as variedades aos 360 DAP, com maior média (25,15 mm) na variedade RB 867515 (Tabela 8).

Na altura da planta só houve diferença significativa aos 120 DAP nos diferentes tratamentos e variedades estudadas, com maior média (79,93 cm) para a variedade RB 867515; e para os tratamentos as médias variaram de 57, 85 – 82 cm, com maiores valores para os tratamentos TA (71,23 cm), BK (78,63 cm), MB (77,60 cm) e ST (82,00 cm) quando comparados com a TN, que apresentou a menor altura (57,85 cm). Semelhantemente, o número de colmos aos 240 DAP teve as maiores médias para os tratamentos inoculados e para a TA, quando comparados com a TN, indicando que a inoculação estimulou o perfilhamento nos tratamentos inoculados. Aos 360 DAP houve diferença significativa entre as variedades, com maior média (28 colmos por planta) para a variedade RB 867515 (Tabela 8).

Apesar da pouca variação entre as médias, o número de folhas se diferenciou significativamente aos 240 e 360 DAP entre as variedades, com maior média (8 folhas por planta) para a variedade RB 92579 (Tabela 8).

A análise quantitativa de crescimento em plantas de cana-de-açúcar realizadas geralmente por meio de estimativas de índices morfofisiológicos pode auxiliar no entendimento da dinâmica de crescimento da espécie ao longo do tempo. Por exemplo, a produtividade agrícola, pode estar relacionada diretamente com variáveis biométricas (diâmetro do colmo, altura da planta, número de folhas, número de colmos), pois o acúmulo de sacarose no colmo é determinado pelo metabolismo, armazenamento nas células parenquimatosas do colmo e por transporte de sacarose por órgãos drenos, como folhas, colmos e raízes e fonte, como as folhas (EMBRAPA, 2012).

Tabela 8. Diâmetro, altura, número de folhas e colmos da cana-de-açúcar, variedades RB 92579 e RB 867515, inoculada com bactérias diazotróficas, no primeiro ciclo de cultivo. Foi realizada análise da variância, coeficiente de variação dos dados

Variedade	Diâmetro (mm)						Média	Altura (cm)						Média	Número de folhas						Média	Número de colmos						Média	
	Tratamento							Tratamento							Tratamento							Tratamento							
	TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST		
120 DAP																													
RB92579	23,37	22,53	23,63	22,81	24,15	24,89	23,56	56,85	55,54	73,29	67,25	74,42	85,83	68,87B	5,08	5,5	5,17	5,42	5,25	5,1	5,25	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
RB867515	26,77	22,77	23,81	25,49	23,47	24,59	24,48	85,6	60,17	83,96	87,96	83,71	78,17	79,93A	5,21	5,68	5,17	4,88	5,08	5,46	5,25	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Média	25,07	22,65	23,72	24,15	23,81	24,74		71,23a	57,85b	78,63a	77,60a	79,06ab	82,00a		5,15	5,59	5,17	5,15	5,17	5,28		Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Teste F (Var.)				2,89 ^{ns}																									
Teste F (Trat.)				1,66 ^{ns}																									
Teste F (Int.)				1,62 ^{ns}																									
C.V. (%)				6,76																									
240 DAP																													
RB92579	24,18	24,89	23,56	25,05	24,31	24,97	24,49	232	246,71	242,86	251,71	239,58	244,33	242,87	8,21	7,83	7,71	8,21	8,23	7,67	7,98A	11	11,25	11,75	11,25	12,75	12,25	11,71	
RB867515	26,84	27,52	25,23	24,69	24,45	24,26	25,5	255,71	251,83	249,52	248	244,62	236,47	247,69	6,63	7,71	7,25	7,08	77,46	7,45	7,26B	12	11,5	12,04	12,25	12,75	12,92	12,24	
Média	25,51	26,21	24,4	24,87	24,38	24,61		243,86	249,27	246,19	249,86	242,1	240,4		7,42	7,77	7,48	7,65	7,85	7,56		11,50a	11,38b	11,89a	11,75a	12,75a	12,59a		
Teste F (Var.)				3,83 ^{ns}																									
Teste F (Trat.)				1,33 ^{ns}																									
Teste F (Int.)				1,44 ^{ns}																									
C.V. (%)				6,17																									
360 DAP																													
RB92579	23,07	24,7	23,19	23,76	23,33	23,5	23,59B	285,75	295,63	284,04	294,29	289,16	280,46	288,22	9,13	9,67	9,42	9,71	9,08	8,33	9,22A	19	18,75	21	19,25	20,5	20,25	19,79B	
RB867515	26,25	26,18	24,66	25,3	24,52	24	25,15A	305,29	287,41	288,13	292,54	285,38	288,58	291,22	7,92	8,75	8,04	7,71	7,88	7,83	8,02B	21,5	20,00	20,12	21,25	20,75	21,07	20,78A	
Média	24,66	25,44	23,93	24,53	23,93	23,75		295,52	291,52	286,08	293,42	287,27	284,52		8,52	9,21	8,72	8,71	8,48	8,08		20,25	19,38	21,56	20,25	20,62	20,66		
Teste F (Var.)				12,51*																									
Teste F (Trat.)				1,40 ^{ns}																									
Teste F (Int.)				0,66 ^{ns}																									
C.V. (%)				5,42																									

Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas iguais na linha indicam que os efeitos estudados não diferem pelo teste de Scott Knott ($p > 0,05$). ^{ns} Não Significativo; *, **, e *** Significativo a 0,1; 1; e 5% de probabilidade. Testemunha Absoluta (TA) e Nitrogenada (TN); Tratamento *Burkholderia* (BK), *Pantoea* (PT) e *Stenotrophomonas* (ST).

Girio et al., (2015) avaliando uma mistura bacteriana com cinco espécies de BPCP's (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum amazonense*, *Burkholderia tropica*, *Herbaspirillum seropedicae* e *H. Rubrisubalbicans*) em plantas de cana-de-açúcar da variedade RB 867515, constataram que o tratamento inoculado influenciou positivamente o diâmetro do colmo, altura das plantas, perfilhamento e produção da matéria seca, aumentando linearmente ao longo do período experimental, evidenciando que o inoculante tem efeito fisiológico benéfico sobre o crescimento de plantas de cana-de-açúcar.

Semelhantemente, Garcia et al. (2013) verificaram resposta positiva no desenvolvimento inicial, até os 120 dias, de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB 867515, cultivadas em Neossolo Quartizarênico em vasos plásticos de 12 litros e inoculadas com as estirpes bacterianas BR11335 (*Herbaspirillum seropedicae*), BR11504 (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*), BR11281T (*Gluconacetobacter diazotrophicus*), BR11366T (*Burkholderia tropica*) e BR11145 (*Azospirillum amazonense*), quando comparadas a testemunha nitrogenada.

Como observado nestes trabalhos, os tratamentos inoculados, quando significativamente diferentes, tiveram médias iguais ou acima das médias para a TN, evidenciando o efeito positivo da inoculação. Na interação com bactérias as plantas podem ser beneficiadas nutricionalmente, podendo aumentar a acessibilidade e absorção dos nutrientes (BERTRAND et al, 2000; PARK et al, 2009; KRAISER et al., 2011). As bactérias promotoras de crescimento vegetal contribuem para a nutrição das plantas, pois atuam produzindo efeitos positivos sobre o crescimento das plantas através da produção de fitohormônios (ácido indol-acético, citocininas e giberelinas) (LONG et al, 2008; ISLAM et al, 2009; KRAISER et al., 2011).

4.5. Pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e total) em algumas épocas de avaliação não se diferenciaram estatisticamente nos diferentes fatores avaliados (variedade e tratamento) e nem no efeito de interação, como foi o caso do teor de clorofila *a* aos 120 DAP, do teor de clorofila *b* aos 240 e 360 DAP e do teor de clorofila total as 120 DAP (Tabelas 9, 10 e 11).

Tabela 9. Teor de clorofila *a* em folha de cana-de-açúcar, variedades RB 92579 e RB 867515, inoculada com bactérias diazotróficas, no primeiro ciclo de cultivo. Foi realizada análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade

Variedade	Clorofila <i>a</i> (120 DAP)							Clorofila <i>a</i> (240 DAP)							Clorofila <i>a</i> (360 DAP)						
	Tratamento						Média	Tratamento						Média	Tratamento						Média
	TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST	
	μmol mg ⁻¹																				
RB 579	2,07	1,94	2,36	1,89	2,11	2,19	2,1	1,26	1,38	1,43	1,19	1,26	1,52	1,34	1,2	1,36	1,32	1,4	1,18	1,32	1,30B
RB 7515	2,05	2,05	2,19	1,66	2,12	1,96	2,01	1,44	1,59	1,26	1,27	1,26	1,4	1,37	1,36	1,56	1,41	1,45	1,43	1,44	1,44A
Média	2,06	2	2,27	1,77	2,12	2,08		1,35b	1,48a	1,35b	1,23b	1,26b	1,46a		1,28	1,46	1,37	1,43	1,31	1,38	
Teste F (Var.)			1,154 ^{ns}							0,365 ^{ns}							10,781 ^{**}				
Teste F (Trat.)			2,542 ^{ns}							3,227 [*]							1,570 ^{ns}				
Teste F (Int.)			0,471 ^{ns}							1,910 ^{ns}							0,436 ^{ns}				
C.V. (%)			14,15							11,77							11,36				

	Clorofila <i>a</i> (120 DAP)		Variedade RB 92579 Clorofila <i>a</i> (240 DAP)		Clorofila <i>a</i> (360 DAP)	
	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN
Teste t (p>0,05)	0,402 ^{ns}	1,201 ^{ns}	1,051 ^{ns}	- 0,307 ^{ns}	1,230 ^{ns}	- 0,642 ^{ns}
Teste F (p>0,05)	0,162 ^{ns}	1,441 ^{ns}	1,105 ^{ns}	0,094 ^{ns}	1,514 ^{ns}	0,412 ^{ns}
	Variedade RB 867515		Clorofila <i>a</i> (240 DAP)		Clorofila <i>a</i> (360 DAP)	
	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN
Teste t (p>0,05)	- 0,443 ^{ns}	- 0,420 ^{ns}	- 1,560 ^{ns}	- 3,264 ^{**}	0,805 ^{ns}	- 1,491 ^{ns}
Teste F (p>0,05)	0,196 ^{ns}	0,177 ^{ns}	2,433 ^{ns}	10,655 ^{**}	0,648 ^{ns}	2,224 ^{ns}

Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas iguais na linha indicam que os efeitos estudados não diferem pelo teste de Scott Knott (p>0,05). ^{ns} Não Significativo; * e ** Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente. Testemunha Absoluta (TA) e Nitrogenada (TN); Tratamento *Burkholderia* (BK), *Pantoea* (PT) e *Stenotrophomonas* (ST).

Tabela 10. Teor de clorofila *b* em folha de cana-de-açúcar, variedades RB 92579 e RB 867515, inoculada com bactérias diazotróficas, no primeiro ciclo de cultivo. Foi realizada análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade

Variedade	Clorofila <i>b</i> (120 DAP)							Clorofila <i>b</i> (240 DAP)							Média	Clorofila <i>b</i> (360 DAP)							Média
	Tratamento						Média	Tratamento						Média									
	TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST			TA	TN	BK	MB	PT	ST		
	$\mu\text{mol mg}^{-1}$																						
RB 579	0,84	0,87	1,04	0,77	0,89	0,9	0,88	0,07	0,12	0,14	0,12	0,09	0,14	0,11	0,36	0,37	0,34	0,4	0,3	0,38	0,36		
RB 7515	0,79	0,84	0,92	0,61	0,98	0,75	0,81	1,14	0,67	1,04	1,07	0,4	1,03	0,09	0,33	0,39	0,33	0,36	0,34	0,4	0,36		
Média	0,81 ^b	0,85 ^b	0,98 ^a	0,69 ^b	0,93 ^a	0,82 ^b		0,09	0,09	0,12	0,11	0,07	0,12		0,34	0,38	0,34	0,38	0,32	0,39			
Teste F (Var.)	2,147 ^{ns}							2,547 ^{ns}							0,006 ^{ns}								
Teste F (Trat.)	3,249*							1,679 ^{ns}							1,695 ^{ns}								
Teste F (Int.)	0,675 ^{ns}							1,144 ^{ns}							0,597 ^{ns}								
C.V. (%)	18,7							49							17,43								

	Clorofila <i>b</i> (120 DAP)		Variedade RB 92579 Clorofila <i>b</i> (240 DAP)		Clorofila <i>b</i> (360 DAP)	
	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN
Teste t (p>0,05)	0,690 ^{ns}	0,361 ^{ns}	2,096*	0,290 ^{ns}	- 0,012 ^{ns}	- 0,369 ^{ns}
Teste F (p>0,05)	0,475 ^{ns}	0,130 ^{ns}	4,393*	0,084 ^{ns}	0,001 ^{ns}	0,136 ^{ns}
	Clorofila <i>b</i> (120 DAP)		Variedade RB 867515 Clorofila <i>b</i> (240 DAP)		Clorofila <i>b</i> (360 DAP)	
	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN
Teste t (p>0,05)	0,286 ^{ns}	- 0,278 ^{ns}	- 0,906 ^{ns}	0,788 ^{ns}	0,785 ^{ns}	- 0,938 ^{ns}
Teste F (p>0,05)	0,082 ^{ns}	0,077 ^{ns}	0,821 ^{ns}	0,620 ^{ns}	0,617 ^{ns}	0,879 ^{ns}

Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas iguais na linha indicam que os efeitos estudados não diferem pelo teste de Scott Knott (p>0,05). ^{ns} Não Significativo; * Significativo a 5% de probabilidade. Testemunha Absoluta (TA) e Nitrogenada (TN); Tratamento *Burkholderia* (BK), *Pantoea* (PT) e *Stenotrophomonas* (ST).

Tabela 11. Teor de clorofila total em folha de cana-de-açúcar, variedades RB 92579 e RB 867515, inoculada com bactérias diazotróficas, no primeiro ciclo de cultivo. Foi realizada análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade

Variedade	Clorofila total (120 DAP)							Clorofila total (240 DAP)							Clorofila total (360 DAP)						
	Tratamento						Média	Tratamento						Média	Tratamento						Média
	TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST	
	$\mu\text{mol mg}^{-1}$																				
RB 579	2,91	2,81	3,4	2,66	3	3,08	2,98	1,32	1,49	1,58	1,31	1,35	1,66	1,45	1,55	1,73	1,66	1,8	1,48	1,69	1,65B
RB 7515	2,84	2,89	3,1	2,27	3,1	2,71	2,82	1,55	1,65	1,36	1,37	1,3	1,5	1,46	1,69	1,95	1,75	1,81	1,77	1,84	1,80A
Média	2,88	2,85	3,25	2,46	3,05	2,9		1,44b	1,57a	1,47b	1,34b	1,33b	1,58a		1,62	1,84	1,7	1,8	1,62	1,76	
Teste F (Var.)			1,568 ^{ns}							0,010 ^{ns}							6,615*				
Teste F (Trat.)			2,870 ^{ns}							3,153*							1,707 ^{ns}				
Teste F (Int.)			0,521 ^{ns}							2,048 ^{ns}							0,514 ^{ns}				
C.V. (%)			15							11,87							11,61				

	Clorofila total (120 DAP)		Variedade RB 92579 Clorofila total (240 DAP)		Clorofila total (360 DAP)	
	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN
Teste t (p>0,05)	0,520 ^{ns}	0,933 ^{ns}	1,570 ^{ns}	- 0,201 ^{ns}	0,951 ^{ns}	- 0,613 ^{ns}
Teste F (p>0,05)	0,271 ^{ns}	0,871 ^{ns}	2,465 ^{ns}	0,040 ^{ns}	0,905 ^{ns}	0,376 ^{ns}

	Variedade RB 867515		Variedade RB 867515		Variedade RB 867515	
	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN
Teste t (p>0,05)	- 0,191 ^{ns}	- 0,382 ^{ns}	- 1,700 ^{ns}	- 2,789**	0,869 ^{ns}	- 1,449 ^{ns}
Teste F (p>0,05)	0,037 ^{ns}	0,146 ^{ns}	2,888 ^{ns}	7,780**	0,756 ^{ns}	2,101 ^{ns}

Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas iguais na linha indicam que os efeitos estudados não diferem pelo teste de Scott Knott (p>0,05). ^{ns} Não Significativo; * e ** Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente. Testemunha Absoluta (TA) e Nitrogenada (TN); Tratamento *Burkholderia* (BK), *Pantoea* (PT) e *Stenotrophomonas* (ST).

O teor de clorofila *a* aos 240 DAP diferiu entre os tratamentos, com as maiores médias para a TN (1,48 $\mu\text{mol mg}^{-1}$) e para o tratamento ST(1,26 $\mu\text{mol mg}^{-1}$). Este tratamento inoculado promoveu um maior teor de clorofila *a* nesta época de avaliação, diferentemente do que ocorreu com os demais tratamentos inoculados (valor médio de 1,28 $\mu\text{mol mg}^{-1}$) e com a TA (1,35 $\mu\text{mol mg}^{-1}$), em que as médias do teor de clorofila *a* foram inferiores ao da TN (1,48 $\mu\text{mol mg}^{-1}$), indicando que a maioria dos tratamentos inoculados não promoveram aumento de teor de clorofila *a*. Similarmente pode ser observado no contraste ortogonal, onde os tratamentos inoculados foram significativamente menores que a TN aos 240 DAP na variedade RB 867515 (Tabela 9).

Ocorreu um efeito varietal aos 360 DAP e a variedade RB 867515 teve maior teor de clorofila *a* do que a RB 92579, independente da inoculação das bactérias (Tabela 9). Semelhantemente ao presente trabalho, Marcos et al. (2016) observaram que os teores dos pigmentos variaram de acordo com o genótipo da espécie estudada, no entanto, não foram comprometedores ao desenvolvimento da cultura. Apesar do resultado semelhante, o experimento dos autores em questão foi diferente da presente pesquisa, pois o teor de clorofila foi estimado em plantas de cana-de-açúcar das variedades IACSP94-2094 and IACSP95-5000, inoculadas com duas composições de bactérias promotoras de crescimento vegetal, composição 1 (*Burkholderia cabensis*, *Kosakonia oryzae*, *Pectobacterium sp.*, *Kosakonia oryzae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter asburiae*) e composição 2 (*Enterobacter radicincitans*, *Kosakonia oryzae*, *Kosakonia oryzae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter cloacae*), cultivadas em casa de vegetação durante 72 dias, em vasos de plástico de 5 L contendo uma mistura estéril de areia, solo e substrato na proporção de 1:1:1. A discrepância entre os experimentos dificulta a comparação, no entanto está foi feita devido a escassez de trabalhos com maior similaridade a presente pesquisa.

O teor de Clorofila *b* diferiu-se estatisticamente entre os tratamentos aos 120 DAP, com uma maior concentração deste pigmento nos tratamentos inoculados BK (0,98 $\mu\text{mol mg}^{-1}$) e PT (0,93 $\mu\text{mol mg}^{-1}$) em relação as testemunhas TA (0,81 $\mu\text{mol mg}^{-1}$) e TN (0,85 $\mu\text{mol mg}^{-1}$). Aos 240 e 360 DAP, como foi dito anteriormente, não houve diferença estatística significativa nos diferentes tratamentos e variedades, nem na interação (Tabela 10).

Os contrastes para o teor de clorofila *b* foram significativos quando se comparou o grupo dos tratamentos inoculados com a TA apenas aos 240 DAP, com uma maior concentração de clorofila *b* nos inoculados (Tabela 10).

O teor de clorofila total variou significativamente aos 240 DAP entre os tratamentos inoculados, com maior teor proporcionado pelo ST ($1,58 \mu\text{mol mg}^{-1}$) e a TN ($1,57 \mu\text{mol mg}^{-1}$). Os outros tratamentos inoculados e a TA tiveram médias inferiores a TN (Tabela 11).

Como ocorreu com os teores de clorofila *a* (Tabela 9), a TN se diferenciou estatisticamente do grupo dos inoculados também em relação aos teores de clorofila total (Tabela 11).

Não apresentar diferença significativa entre os tratamentos inoculados e a TN para os teores de clorofila representou um desempenho satisfatório da inoculação, pois se as plantas dos tratamentos inoculados, não ficaram aclorofiladas e se desenvolveram semelhantemente a TN, evidenciando que o N está entrando no sistema e suprindo a demanda da planta, através de alguma fonte, seja ela mineralização da matéria orgânica ou FBN.

O N é um nutriente fundamental no desenvolvimento das plantas, presente obrigatoriamente, por exemplo, na constituição de proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos e pigmentos fotossintéticos. Quando os pigmentos fotossintéticos são afetados pela deficiência de N, conseqüentemente, esse efeito pode causar uma diminuição nos teores de clorofila, diminuindo assim a atividade fotossintética das plantas e conseqüentemente sua produtividade (MALAVOLTA et al. 1997; NASCIMENTO et al., 2014). Isto não foi evidenciado neste trabalho, que apesar da não adubação nitrogenada, os tratamentos inoculados apresentaram um desenvolvimento vegetal satisfatório, sem redução nas variáveis teor de N, crescimento e pigmentos fotossintéticos (Tabelas 4, 5, 8, 9, 10 e 11).

Plantas cultivadas na ausência de N, em experimentos de supressão de nutrientes, geralmente o crescimento vegetativo é afetado, nas variáveis como: altura da planta, diâmetro do caule, número de folhas, produção e alocação de biomassa seca dos diferentes órgãos, fotossíntese e pigmentos fotossintéticos (NASCIMENTO et al., 2014).

Os pigmentos fotossintéticos, como por exemplo, a clorofila *a* e *b* são moléculas de estrutura química instável que possuem N na sua constituição. Estes pigmentos são facilmente degradados e a sua abundância varia de acordo com a espécie de planta. As moléculas das clorofilas, também podem variar de acordo com a influência dos fatores

exógenos do meio ambiente, como por exemplo, luz, temperatura e quantidade de nutrientes (SILVEIRA, 2014).

Apesar de suas peculiaridades e diferentes tolerâncias a fatores correlacionados com a sua existência, os pigmentos fotossintéticos avaliados neste trabalho não tiveram redução quantitativa nos seus teores de clorofila nos tratamentos inoculados, quando comparados a testemunha nitrogenada (Tabelas 9, 10 e 11). Semelhantemente ao presente trabalho, Garcia et al. (2013) avaliando a inoculação por imersão e pulverização de um mix de 5 estirpes bacterianas, BR11335 (*Herbaspirillum seropedicae*), BR11504 (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*), BR11281T (*Gluconacetobacter diazotrophicus*), BR11366T (*Burkholderia tropica*) e BR11145 (*Azospirillum amazonense*) em plantas de cana-de-açúcar cultivadas em vasos plásticos de 12 litros, com Neossolo Quartzarênico até os 120 dias, constataram respostas semelhantes e revelaram que os teores das clorofilas não foi reduzido nos tratamentos inoculados, indicando que a inoculação com os diferentes gêneros bacterianos em plantas de cana-de-açúcar foram promissoras, não desencadeando clorose, nem redução no desenvolvimento vegetativo das plantas da variedade RB 867515.

Gírio et al. (2015) ao avaliar experimento de cana-de-açúcar inoculada com bactérias promotoras de crescimento vegetal (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum amazonense*, *Burkholderia tropica*, *Herbaspirillum seropedicae* e *H. Rubrisubalbicans*), cultivadas em vasos de 130 litros com Neossolo Quartzarênico órtico disposto no campo durante 180 dias após o transplante, observaram que o teor de clorofila total, estimado com o SPAD (clorofilometro portátil), diferiu ao longo do período experimental e nas diferentes doses de N utilizadas, reduzindo o teor de clorofila ao longo do tempo. Também foi observado que o tratamento com inoculação não diferiu estatisticamente da testemunha nitrogenada com 50 kg ha⁻¹ de N e nem da testemunha absoluta.

4.6. Proteínas e aminoácidos

As concentrações de proteína nas folhas de cana-de-açúcar não diferiram entre as variedades RB 92579 e RB 867515, independentemente dos tratamentos e das diferentes épocas de avaliações (Tabela 12).

Tabela 12. Teor de proteínas na matéria fresca de folha +1 de cana-de-açúcar, variedades RB 92579 e RB 867515, inoculada com bactérias diazotróficas, no primeiro ciclo de cultivo. Foi realizada análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade

Variedade	Teor de proteínas (120 DAP)							Teor de proteínas (240 DAP)							Teor de proteínas (360 DAP)						
	Tratamento						Média	Tratamento						Média	Tratamento						Média
	TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST	
	$\mu\text{mol g}^{-1}$																				
RB 579	238,32Aa	190,48Bb	317,35Aa	167,35Ab	243,51Aa	287,23Aa	240,71	135,09	180,25	189,4	150,15	143,51	150,68	158,18	161,7	158,48	173,53	148,53	156,78	181,06	163,35
RB 7515	172,42Ab	276,98Aa	247,10Aa	203,91Ab	198,00Ab	178,28Bb	212,78	152,83	181,16	152,12	159,28	145,31	146,76	156,24	159,02	190,2	165,74	137,78	148,89	139,21	156,81
Média	205,37	233,73	282,23	185,63	220,75	232,76		143,96b	180,71a	170,76a	154,71b	144,41b	148,72b		160,36	174,34	169,64	143,16	152,84	160,14	
Teste F (Var.)			3,769 ^{ns}							0,066 ^{ns}							0,847 ^{ns}				
Teste F (Trat.)			3,445*							2,696*							1,672 ^{ns}				
Teste F (Int.)			4,408**							1,043 ^{ns}							1,812 ^{ns}				
C.V. (%)			21,52							16,64							15,38				

	Teor de proteínas (120 DAP)		Variedade RB 92579 Teor de proteínas (240 DAP)		Teor de proteínas (360 DAP)	
	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN
Teste t (p>0,05)	0,558 ^{ns}	2,276*	1,596 ^{ns}	- 1,492 ^{ns}	0,238 ^{ns}	0,472 ^{ns}
Teste F (p>0,05)	0,311 ^{ns}	5,178*	2,547 ^{ns}	2,226 ^{ns}	0,056 ^{ns}	0,223 ^{ns}

	Variedade RB 867515		Teor de proteínas (240 DAP)		Teor de proteínas (360 DAP)	
	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN
Teste t (p>0,05)	1,235 ^{ns}	- 2,519*	- 0,135 ^{ns}	- 2,071*	- 0,807 ^{ns}	- 3,072**
Teste F (p>0,05)	1,525 ^{ns}	6,344*	0,018 ^{ns}	4,291*	0,651 ^{ns}	9,439**

Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas iguais na linha indicam que os efeitos estudados não diferem pelo teste de Scott Knott (p>0,05). ^{ns} Não Significativo; * e ** Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente. Testemunha Absoluta (TA) e Nitrogenada (TN); Tratamento *Burkholderia* (BK), *Pantoea* (PT) e *Stenotrophomonas* (ST).

De forma geral, as proteínas diferiram estatisticamente apenas nas duas primeiras avaliações iniciais, apresentando uma maior concentração aos 120 DAP. Aos 120 DAP, a interação dos fatores foi significativa, variando de 167,35 a 317,35 $\mu\text{mol g}^{-1}$ para a RB92579 e de 172,42 a 276,98 $\mu\text{mol g}^{-1}$ para a RB 867515, demonstrando ser dependentes da variedade (Tabela 12). A RB 92579 teve algumas médias iguais e outras superiores a média da TN, indicando que os tratamentos inoculados foram melhores e/ou iguais a TN. A RB 92579 apresentou no teor de proteínas as menores médias para a TN (190,48 $\mu\text{mol g}^{-1}$) e a MB (167,35 $\mu\text{mol g}^{-1}$), os demais tratamentos foram superiores 25% (TA), 66% (BK), 28% (PT), 50% (ST) em relação a TN, indicando que os tratamentos inoculados foram melhores e/ou iguais a TN (Tabela 12).

O contraste realizado para a concentração de proteínas aos 120 DAP entre os tratamentos inoculados e a TN na variedade RB 92579 indicou que os tratamentos inoculados tiveram um melhor desempenho que a TN. No entanto, na RB 867515 se observou-se o inverso, o tratamento com inoculação bacteriana teve uma menor concentração de proteínas que a TN (Tabela 12).

A concentração de proteínas aos 240 DAP diferiu entre os tratamentos, com uma maior concentração de proteínas para o tratamento BK (170,76 $\mu\text{mol g}^{-1}$). Os tratamentos MB (154,71 $\mu\text{mol g}^{-1}$), PT (144,41 $\mu\text{mol g}^{-1}$), ST (148,72 $\mu\text{mol g}^{-1}$) e TA (143,96 $\mu\text{mol mg}^{-1}$) tiveram as menores concentrações de proteína, quando comparados com a TN (180,71 $\mu\text{mol g}^{-1}$) (Tabela 12).

No contraste realizado aos 240 DAP, semelhante ao que ocorreu aos 120 DAP, houve diferença estatística significativa entre o grupo de tratamentos inoculados e a TN, com maior concentração de proteínas constatada na testemunha nitrogenada. A melhor performance dos inoculados apresentada aos 120 DAP na variedade RB 92579 não se manteve aos 240 DAP e a concentração de rotinas se assemelhou a TN (Tabela 12).

Aos 360 DAP, a concentração de proteínas não se diferenciou significativamente entre os tratamentos, as variedades e a interação. Com relação ao contraste foi observada diferença significativa entre o grupo dos inoculados e a TN apenas na variedade RB 867515, como ocorreu aos 120 e 240 DAP, com a concentração de proteínas sendo maior na testemunha nitrogenada (Tabela 12).

A FBN é um processo muito variável ao longo do ciclo da cana-de-açúcar, o que pode ter causado essas variações na síntese de proteínas pelo maior ou menor aporte de N, dependendo da fase de crescimento das plantas. A testemunha nitrogenada recebeu N

no plantio e utilizou na síntese proteica de forma mais uniforme ao longo do ciclo da cultura.

A síntese de aminoácidos nas folhas oscilou ao longo do ciclo da cana-de-açúcar com uma tendência de produção menor de aminoácidos no final do período experimental aos 360 DAP (Tabela 13).

A variedade RB 867515 teve um maior teor de aminoácidos ($445,61 \mu\text{mol g}^{-1}$) quando comparada com a RB 92579 aos 120 DAP. Nesta época de avaliação o maior teor de aminoácidos entre os tratamentos inoculados foi de BK ($442,59 \mu\text{mol g}^{-1}$) e PT ($440,78 \mu\text{mol g}^{-1}$), porém não diferiram da TN ($465,50 \mu\text{mol g}^{-1}$). Aos 240 DAP na variedade RB 92579 foi observada uma boa resposta dos tratamentos inoculados para esta variável, pois eles tiveram teores de aminoácidos maior ou igual a TN, com médias que variaram de $209,50$ a $386,64 \mu\text{mol mg}^{-1}$. Diferentemente do que ocorreu com a variedade RB 867515, que teve menor teor de aminoácidos ($171,97$ e $219,92 \mu\text{mol g}^{-1}$) em relação as testemunhas TA e TN, para os tratamentos MB ($245,60 \mu\text{mol g}^{-1}$), PT ($171,97 \mu\text{mol g}^{-1}$) e ST ($219,92 \mu\text{mol g}^{-1}$) (Tabela 13).

O teor de aminoácidos aos 360 DAP variou entre os tratamentos e dependeu das variedades. Na RB 92579, o tratamento com maior média foi o do ST ($228,32 \mu\text{mol g}^{-1}$), que diferiu das testemunhas TA ($163,95 \mu\text{mol g}^{-1}$) e TN ($179,01 \mu\text{mol g}^{-1}$). Na variedade RB 867515, os tratamentos inoculados e a TA tiveram uma menor produção de aminoácidos que o tratamento TN ($237,10 \mu\text{mol g}^{-1}$), com teores que variaram de $136,47$ a $193,62 \mu\text{mol g}^{-1}$, respectivamente (Tabela 13).

Nos contrastes entre o grupo dos inoculados e as testemunhas, observou-se que para a variedade RB 92579 não houve diferença estatística significativa nas diferentes épocas de avaliações. Para a RB 867515 houve diferença estatística significativa ao longo do período experimental. Aos 120 DAP os tratamentos inoculados produziram mais aminoácidos do que a TA e aos 240 e 360 DAP a TN produziu mais aminoácidos dos que os tratamentos inoculados (Tabela 13). Esta oscilação pode ter sido devido a fase de desenvolvimento da cultura e/ou influência do genótipo, visto que outras variáveis tais como, teor de N na raiz, conteúdo de nitrogênio no colmo, diâmetro, número de colmo, teor de clorofila *a*, clorofila total, também variariam ao longo do período experimental para a variedade RB 867515.

Marcos et al. (2016) ao avaliar compostos bioquímicos, como aminoácidos e carboidratos, em plantas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias endofíticas

promotoras de crescimento vegetal, verificaram que as concentrações dos solutos orgânicos não oscilaram significativamente entre os fatores avaliados. Os pesquisadores observaram que os tratamentos inoculados tiveram uma tendência que evidenciou um maior acúmulo dos compostos, inclusive do aminoácido, porém foram dependentes do genótipo da espécie avaliada.

A inoculação de bactérias pode promover o desenvolvimento vegetal, pois os diazotróficos realizam diversas funções benéficas para as plantas, pois além de realizarem a FBN, beneficiam as plantas através de outras maneiras, como por exemplo, realizam controle de patologias, promovem o crescimento vegetal por meio da liberação de fitormônios, contribuem diretamente com a síntese de aminoácidos, proteínas, poliaminas e outras substâncias importantes no metabolismo das plantas, além de auxiliarem os vegetais quando estão sob circunstâncias adversas (TAULÉ et al., 2011; FERRARA et al., 2011).

Tabela 13. Teor de aminoácidos na matéria fresca de folha +1 de cana-de-açúcar, variedades RB 92579 e RB 867515, inoculada com bactérias diazotróficas, no primeiro ciclo de cultivo. Foi realizada análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade

Variedade	Teor de aminoácidos (120 DAP)							Teor de aminoácidos (240 DAP)							Teor de aminoácidos (360 DAP)						
	Tratamento						Média	Tratamento						Média	Tratamento						Média
	TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST	
	$\mu\text{mol g}^{-1}$																				
RB 579	293,22	408,92	384,58	363,58	433,63	338,7	370,44B	267,56Ab	265,42Ab	320,61Aa	209,50Ab	386,64Aa	383,51Aa	305,54	163,95Ab	179,01Bb	159,76Ab	142,18Ab	177,26Ab	228,32Aa	175,08
RB 7515	346,62	522,08	500,61	429,9	447,94	426,49	445,61A	303,31Aa	332,27Aa	385,20Aa	245,60Ab	171,97Bb	219,92Bb	276,37	139,78Ac	237,10Aa	193,62Ab	160,60Ac	136,47Bc	156,53Bc	170,68
Média	319,92b	465,50a	442,59a	396,74b	440,78a	382,59b		285,43	298,84	372,9	227,55	279,31	301,71		151,87	208,05	176,69	151,39	156,86	192,43	
Teste F (Var.)			8,924**							3,079 ^{ns}							0,352 ^{ns}				
Teste F (Trat.)			2,971*							3,59**							6,767***				
Teste F (Int.)			0,396 ^{ns}							9,527***							7,355***				
C.V. (%)			21,36							19,79							14,87				

	Teor de aminoácidos (120 DAP)		Variedade RB 92579 Teor de aminoácidos (240 DAP)		Teor de aminoácidos (360 DAP)	
	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN
Teste t (p>0,05)	1,783 ^{ns}	- 0,591 ^{ns}	1,787 ^{ns}	1,853 ^{ns}	0,900 ^{ns}	- 0,148 ^{ns}
Teste F (p>0,05)	3,180 ^{ns}	0,349 ^{ns}	3,192 ^{ns}	3,434 ^{ns}	0,810 ^{ns}	0,022 ^{ns}

	Variedade RB 867515		Teor de aminoácidos (240 DAP)		Teor de aminoácidos (360 DAP)	
	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN
Teste t (p>0,05)	2,147*	- 1,454 ^{ns}	- 1,480 ^{ns}	-2,380*	1,533 ^{ns}	- 5,241***
Teste F (p>0,05)	4,609*	2,114 ^{ns}	2,190 ^{ns}	5,663*	2,349 ^{ns}	27,465***

Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas iguais na linha indicam que os efeitos estudados não diferem pelo teste de Scott Knott (p>0,05).^{ns} Não Significativo; *, **, e *** Significativo a 5; 1; e 0,1% de probabilidade, respectivamente. Testemunha Absoluta (TA) e Nitrogenada (TN); Tratamento *Burkholderia* (BK), *Pantoea* (PT) e *Stenotrophomonas* (ST).

4.7. Estimativa da atividade da enzima nitrogenase nas folhas e raízes

A atividade da enzima nitrogenase (AN) na folha +1 se diferenciou significativamente entre os tratamentos, as variedades a interação ao longo do período experimental. Nas raízes, o comportamento foi semelhante e o efeito dos tratamentos dependeu da variedade em todos os períodos avaliados (Tabelas 14 e 15).

De maneira geral, pode-se inferir que a AN na folha +1 decresceu ao longo do ciclo de cultivo da cana-de-açúcar, principalmente na raiz. A variedade que teve maior atividade enzimática nas folhas e raízes foi a RB 92579 (Tabelas 14 e 15).

Santos (2014) avaliando o molibdênio no metabolismo e na FBN em cana-de-açúcar cultivada em ARGISSOLO VERMELHO AMARELO distrocoeso observou que a AN nas folhas +1 e nas raízes das variedades RB 92579 e RB 867515 durante o ciclo de cana-de-açúcar aumentou progressivamente nos primeiros meses de cultivo, com declínio a partir dos 100 DAP, até ficar nula a partir dos 200 DAP. Resultado semelhante foi encontrado no presente trabalho, no qual ocorreu uma diminuição da AN a partir dos 120 DAP, diferindo do autor citado acima, pois a AN não ficou nula após 200 DAP. Esse comportamento foi diferente provavelmente devido ao uso da inoculação, diferentemente do realizado por Santos (2014), que avaliou a AN em plantas não inoculadas, avaliando a AN oriunda de bactérias intrínsecas da própria cana-de-açúcar.

A AN nas folhas aos 120 DAP na variedade RB 92579 foi maior ($35,83 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) para o tratamento inoculado MB, que diferiu de todos os outros tratamentos inoculados e das testemunhas TA e TN. Para a variedade RB 867515 os tratamentos inoculados tiveram menor AN quando comparados com a TN (Figura 14), fato este que pode ser de carácter genotípico, podendo esta ter maior preferência pela assimilação do íon amônio e nitrato via sistema radicular.

A AN do grupo dos tratamentos inoculados aos 120 DAP foi maior do que a TA e não se diferenciou da TN na variedade RB 92579. No entanto, na variedade RB 867515 o comportamento foi inverso, ocorreu maior AN na TN do que nos tratamentos inoculados e não houve diferença da AN para a TA (Tabela 14).

Aos 240 DAP, a variedade RB 92579 teve a maior AN ($33,74 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) no tratamento inoculado PT. Os demais tratamentos inoculados, apesar de terem uma menor AN em relação ao tratamento PT, tiveram uma maior e/ou igual AN em relação a TN, com exceção do tratamento MB (Tabela 14).

Tabela 14. Atividade da nitrogenase na folha +1 de cana-de-açúcar, variedades RB 92579 e RB 867515, inoculada com bactérias diazotróficas, no primeiro ciclo de cultivo. Foi realizada análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade

Variedade	Atividade da nitrogenase (120 DAP)							Atividade da nitrogenase (240 DAP)							Atividade da nitrogenase (360 DAP)							
	Tratamento						Média	Tratamento						Média	Tratamento						Média	
	TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST		
	mmol g ⁻¹ h ⁻¹																					
RB 579	18,72Ad	23,25Ac	11,48Ae	35,83Aa	18,32Ad	28,80Ab	22,73	16,29Bb	6,22Bd	7,48Ad	2,81Be	33,74Aa	10,83Ac	12,9	6,88Bc	16,41Aa	13,80Ab	7,29Ac	1,64Bd	16,12Aa	10,36	
RB 7515	10,59Bb	13,54Ba	9,34Ab	8,72Bb	9,15Bb	10,89Bb	10,37	28,89Aa	14,48Ab	0,35Bd	8,83Ac	2,81Bd	10,54Ac	10,98	10,10Ac	15,17Aa	6,41Bd	12,43Bb	6,25Ad	3,55Be	8,99	
Média	14,65	18,4	10,41	22,27	13,73	19,84		22,59	10,35	3,92	5,82	18,27	10,69		8,49	15,79	10,11	9,86	3,95	9,83		
Teste F (Var.)			417,374***							6,657*									10,484**			
Teste F (Trat.)			35,041***							62,821***									53,433***			
Teste F (Int.)			35,298***							75,605***									48,516***			
C.V. (%)			12,67							21,53									15,17			

	Atividade da nitrogenase (120 DAP)		Variedade RB 92579 Atividade da nitrogenase (240 DAP)		Atividade da nitrogenase (360 DAP)	
	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN
Teste t (p>0,05)	4,169***	0,301 ^{ns}	- 1,790 ^{ns}	5,215***	3,454**	- 8,166***
Teste F (p>0,05)	17,379***	0,090 ^{ns}	3,206 ^{ns}	27,193***	11,929**	66,678***
	Atividade da nitrogenase (120 DAP)		Variedade RB 867515 Atividade da nitrogenase (240 DAP)		Atividade da nitrogenase (360 DAP)	
	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN
Teste t (p>0,05)	- 0,908 ^{ns}	-3,425**	-16,185***	- 6,154***	- 3,581***	- 9,770***
Teste F (p>0,05)	0,825 ^{ns}	11,727**	261,963***	37,877***	12,824***	95,459***

Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas iguais na linha indicam que os efeitos estudados não diferem pelo teste de Scott Knott (p>0,05). ^{ns} Não Significativo; *, **, e *** Significativo a 0,1; 1; e 5% de probabilidade. Testemunha Absoluta (TA) e Nitrogenada (TN); Tratamento *Burkholderia* (BK), *Pantoea* (PT) e *Stenotrophomonas* (ST).

Tabela 15. Atividade da nitrogenase na raiz de cana-de-açúcar, variedades RB 92579 e RB 867515, inoculada com bactérias diazotróficas, no primeiro ciclo de cultivo. Foi realizada análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade

Variedade	Atividade da nitrogenase (120 DAP)							Atividade da nitrogenase (240 DAP)							Atividade da nitrogenase (360 DAP)						
	Tratamento						Média	Tratamento						Média	Tratamento						Média
	TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST	
	mmol g ⁻¹ h ⁻¹																				
RB 579	56,59Aa	24,69Ac	41,02Ab	37,31Ab	22,97Bc	22,73Ac	34,22	5,88Ab	1,44Ae	4,24Ac	2,76Bd	2,92Ad	10,96Aa	4,7	1,93Bc	4,75Bc	8,86Ab	7,08Ab	8,97Ab	17,04Aa	8,11
RB 7515	14,02Bc	13,33Ac	50,77Aa	35,85Ab	39,40Ab	12,59Ac	27,66	5,50Ab	2,53Ad	2,37Bd	8,52Aa	3,85Ac	4,35Bc	4,52	9,71Aa	10,37Aa	6,87Aa	2,27Bb	8,79Aa	12,63Ba	8,44
Média	35,3	19,01	45,89	36,58	31,18	17,66		5,69	1,99	3,3	5,64	3,39	7,65		5,82	7,56	7,86	4,68	8,88	14,84	
F (Var.)			8,394**							0,534 ^{ns}							0,267 ^{ns}				
F (Trat.)			15,454***							46,850***							20,220***				
F (Int.)			14,024***							44,725***							11,062***				
C.V. (%)			25,33							18,62							27,01				
	Variedade RB 92579																				
	Atividade da nitrogenase (120 DAP)						Atividade da nitrogenase (120 DAP)						Atividade da nitrogenase (120 DAP)								
	Inoculados versus TA			Inoculados versus TN			Inoculados versus TA			Inoculados versus TN			Inoculados versus TA			Inoculados versus TN					
Teste t (p>0,05)	- 5,839***			1,442 ^{ns}			- 1,375 ^{ns}			7,869***			6,855***			4,591***					
Teste F (p>0,05)	34,099***			2,078 ^{ns}			1,890 ^{ns}			61,920***			46,984***			21,081***					
	Variedade RB 867515																				
	Inoculados versus TA			Inoculados versus TN			Inoculados versus TA			Inoculados versus TN			Inoculados versus TA			Inoculados versus TN					
Teste t (p>0,05)	4,709***			4,867***			-1,524 ^{ns}			4,672***			- 1,656 ^{ns}			- 2,190*					
Teste F (p>0,05)	22,176***			23,687***			2,323 ^{ns}			21,827***			2,741 ^{ns}			4,797*					

Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas iguais na linha indicam que os efeitos estudados não diferem pelo teste de Scott Knott (p>0,05). ^{ns} Não Significativo; *, **, e *** Significativo a 0,1; 1; e 5% de probabilidade. Testemunha Absoluta (TA) e Nitrogenada (TN); Tratamento *Burkholderia* (BK), *Pantoea* (PT) e *Stenotrophomonas* (ST).

Na comparação entre o grupo dos tratamentos inoculados e as testemunhas, observou-se aos 240 DAP que na variedade RB 92579 os tratamentos inoculados tiveram uma maior AN em relação a TN e não se diferenciaram da TA. Na variedade RB 86751 as testemunhas TA e TN tiveram maior AN do que os tratamentos inoculados (Tabela 14).

Na folha +1 aos 360 DAP, a variedade RB 92579 teve a maior AN no tratamento ST ($16,12 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) entre os tratamentos inoculados, no entanto, não se diferenciou da TN. Na variedade RB 867515 a AN da TN superou todos os tratamentos inoculados (Tabela 14).

Na análise do grupo dos inoculados com as testemunhas, a variedade RB 92579 aos 360 DAP teve uma maior AN nos tratamentos inoculados em relação a TA, porém a AN na TN foi maior do que nos tratamentos inoculados, diferindo do comportamento apresentado aos 120 e 240 DAP. Na variedade RB 867515 o comportamento da TN em relação aos tratamentos inoculados se manteve como no início do cultivo, ou seja, a AN foi sempre superior nessa testemunha em relação aos tratamentos inoculados (Tabela 14).

Nas raízes, a AN na variedade RB 92579 foi maior nos tratamentos inoculados nas diferentes épocas de avaliação, com o tratamento ST, aos 240 e 360 DAP, sendo mais proeminente, devido a sua maior AN quando comparado com os demais tratamentos inoculados. Nessa variedade a AN da TA aos 120 DAP superou todos os outros tratamentos, mantendo ainda uma elevada AN aos 240 DAP. Na variedade RB 867515, o tratamento inoculado BK teve a maior AN aos 120 DAP, reduzindo-se significativamente ao longo do ciclo (Tabela 15).

Aos 240 DAP, os tratamentos que tiveram uma maior AN foi o tratamento ST para a variedade RB 92579 e tratamento MB para a RB 867515. Vale ressaltar que os demais tratamentos inoculados, apesar da AN ter sido menor do que ST e MB, tiveram AN igual ou superior a TN (Tabela 15).

Aos 360 dias, a AN nas raízes para a variedade RB 92579 foi maior nos tratamentos inoculados BK ($8,86 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), MB ($7,08 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), PT ($8,97 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e ST ($17,04 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) quando comparados com as Testemunhas TA ($1,93 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e TN ($4,75 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Para a variedade RB 867515 foi observado que o tratamento MB ($2,27 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) teve a menor AN entre os tratamentos inoculados, com AN menores do que as testemunhas TA ($9,71 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e TN ($10,37 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). No entanto, os demais tratamentos inoculados BK ($6,87 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), PT ($8,79$

mmol g⁻¹ h⁻¹) e ST (12,63 mmol g⁻¹ h⁻¹) tiveram AN que não diferiu das testemunhas TA (9,71 mmol g⁻¹ h⁻¹) e TN (10,37 mmol g⁻¹ h⁻¹) (Tabela 15).

Diferentemente do que ocorreu com a AN na folha +1 (Tabela 14), o grupo dos tratamentos inoculados tiveram nas raízes uma maior AN, superando as testemunhas TA e TN ao longo do ciclo da cultura (Tabela 15). Este resultado significa que as bactérias inoculadas mantiveram nas raízes seu nicho e exerceram nesse compartimento das plantas suas atividades. A literatura corrobora com o presente resultado, pois relata que a raiz é o nicho de maior densidade bacteriana nas plantas (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; SILVA et al., 2012).

De maneira geral, pode-se inferir que os tratamentos inoculados com os diferentes gêneros bacterianos tiveram uma performance satisfatória na atividade enzimática apresentada nas folhas e nas raízes das diferentes variedades em relação as testemunhas.

Performance positiva, também foi encontrada por Fernandes et al. (2013) ao avaliar a atividade da enzima nitrogenase por *Gluconacetobacter diazotrophicus*, no qual os tratamentos inoculados não apresentaram redução na atividade da enzima nitrogenase quando expostos a presença dos diferentes inseticidas, não diferindo da testemunha.

A AN variou de acordo com o período de avaliação, a variedade, o compartimento da planta avaliado e o inóculo utilizado, evidenciando a sua sensibilidade a esses diferentes fatores. Dobereiner (1973) ao avaliar a FBN na rizosfera de *Paspalum notatum* e cana-de-açúcar, observou que a estimativa da medida da atividade da enzima nitrogenase é sensível a diferentes fatores, como pressão parcial do O₂, tempo de incubação, compartimento da planta e espécie. Rodrigues et al. (2006) e Prakamhang et al. (2009) também constataram que esses diferentes fatores causam efeitos na estimativa da medida da AN.

Os resultados da AN, principalmente na folha +1, sugerem que a aplicação de N na forma de fertilizante não impede que haja FBN, como ocorre com as leguminosas. É provável que bactérias nativas, presentes na própria cana-de-açúcar e no solo, tenham tido algum estímulo do meio favorecendo a atuação dessas bactérias nas testemunhas, absoluta e nitrogenada, promovendo a FBN.

4.8. Abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$

Os valores do $\delta^{15}\text{N}$ nas folhas de cana-de-açúcar não se diferenciaram significativamente para os diferentes tratamentos avaliados, variedades e interação aos 120, 240 e aos 360 DAP (Tabela 16).

Quando se comparou os valores das diferentes épocas de avaliações do $\delta^{15}\text{N}$ nas plantas de cana-de-açúcar com os valores do $\delta^{15}\text{N}$ das cinco espécies de plantas espontâneas, que serviram de referências não fixadoras (*Emilia coccínea* (Sims) G. Don; *Euphorbia hyssoipifolia* L.; *Pavonia sidiolia* Kunth; *Pycreus decumbens* T. Koyama; *Commeliana benghalensis* L.), observa-se que os valores de $\delta^{15}\text{N}$ das plantas de cana-de-açúcar são maiores que os das plantas, teoricamente, ditas não fixadoras, podendo-se afirmar, que ao longo do primeiro ciclo da cana-de-açúcar não houve FBN (120, 240 e 360 DAP) independente das variedades e dos diferentes tratamentos aplicados (Tabela 16).

Urquiaga et al. (2012) observaram em cana-de-açúcar que houve pouca ou nenhuma entrada de N via FBN, pois a abundância do $\delta^{15}\text{N}$ nas amostras das folhas das diferentes variedades variou de +5,29 ‰ (Krakatau) a +7,66 ‰ (CB 45-3) e nas plantas referência +5,4 e + 6,2 ‰, aproximadamente a mesma quantidade de $\delta^{15}\text{N}$ ou mesmo ligeiramente menor que as variedades de cana-de-açúcar.

Para considerar que houve FBN, o $\delta^{15}\text{N}$ da cana-de-açúcar teria que ser menor do que o valor $\delta^{15}\text{N}$ na planta de referência, ou seja, plantas referências, denominadas não fixadoras, teoricamente, tiram todo seu N do solo, e conseqüentemente elas deveriam ser mais abundantes em $\delta^{15}\text{N}$ que plantas fixadoras, porque tiram parte do N do ar atmosférico (FREITAS et al., 2010).

Baptista et al. (2014) avaliando a abundância natural do $\delta^{15}\text{N}$ em plantas de cana-de-açúcar cultivadas em um Planossolo Háptico observaram que houve contribuição da FBN nos diferentes ciclos avaliados. A FBN foi dependente das ervas daninhas utilizadas como planta referência, variando a contribuição da FBN, de acordo com as plantas referência escolhidas para realizar a comparação da presença ou ausência da FBN em plantas de cana-de-açúcar. Também foi observado que as plantas espontâneas podem ter sinais diferentes de $\delta^{15}\text{N}$ de acordo com a profundidade do solo avaliado.

Tabela 16. Abundância natural de nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) em cana-de-açúcar, variedades RB 92579 e RB 867515, inoculada com bactérias diazotróficas, no primeiro ciclo de cultivo. Foi realizada análise da variância, coeficiente de variação dos dados e $\delta^{15}\text{N}$ de plantas de referência

Variedade	Tratamento						Média
	TA	TN	BK	MB	PT	ST	
120 DAP							
RB 92579	+7,08	+6,29	+6,63	+7,06	+7,29	+7,89	+7,04
RB 867515	+5,67	+6,74	+6,66	+6,91	+7,37	+6,81	+6,69
Média	+6,37	+6,51	+6,65	+6,99	+7,33	+7,35	
Teste F (variedade)				1,46 ^{ns}			
Teste F (Tratamento)				1,43 ^{ns}			
Teste F (Interação)				1,08 ^{ns}			
CV (%)				14,46			
240 DAP							
RB 92579	+6,61	+5,87	+5,36	+6,76	+5,92	+5,84	+6,06
RB 867515	+6,47	+6,12	+5,64	+6,53	+6,63	+6,72	+6,35
Média	+6,54	+5,99	+5,50	+6,64	+6,27	+6,28	
Teste F (variedade)				1,14 ^{ns}			
Teste F (Tratamento)				1,55 ^{ns}			
Teste F (Interação)				0,45 ^{ns}			
CV (%)				15,09 ^{ns}			
360 DAP							
RB 92579	+5,36	+6,43	+5,89	+6,14	+5,99	+5,67	+5,91
RB 867515	+5,67	+5,82	+6,26	+6,21	+5,91	+5,26	+5,85
Média	+5,51	+6,12	+6,08	+6,18	+5,95	+5,46	
Teste F (variedade)				0,17 ^{ns}			
Teste F (Tratamento)				3,41 ^{ns}			
Teste F (Interação)				1,30 ^{ns}			
CV (%)				8,23			
Planta referência							
<i>Emilia coccínea</i> (Sims) G. Don				+4,77			
<i>Euphorbia hyssopifolia</i> L.				+5,51			
<i>Pavonia sidiolia</i> Kunth				+4,86			
<i>Pycreus decumbens</i> T. Koyama				+5,49			
<i>Commeliana benghalensis</i> L.				+5,44			
Média				+5,21			

Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas iguais na linha indicam que os efeitos estudados não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). ^{ns} Não Significativo; *, **, e *** Significativo a 0,1; 1; e 5% de probabilidade. Testemunha Absoluta (TA) e Nitrogenada (TN); Tratamento *Burkholderia* (BK), *Pantoea* (PT) e *Stenotrophomonas* (ST).

Nas socarias de quatro anos de cultivos subsequentes, Urquiaga et al. (2012) conseguiram detectar e estimar a contribuição oriunda da FBN, através da técnica da abundância natural do isótopo $\delta^{15}\text{N}$. As médias para $\delta^{15}\text{N}$ variaram de +3,08 a +4,82 ‰ para a primeira socaria, +2,74 a +4,18 ‰ para a segunda socaria, +3,18 a +4,80 ‰ para a terceira socaria e +1,89 a +3,23 ‰ para a quarta socaria. Em cana-de-açúcar de primeiro ciclo, essas mesmas plantas referência tinham valores médios de sinais de $\delta^{15}\text{N}$ que variavam de +5,4 a + 6,2 ‰, evidenciando que houve FBN nas socarias, e que a inoculação foi mais eficiente com o passar dos ciclos, demonstrando que a FBN é cada vez mais representativa nas socarias, demonstrando assim, o potencial de uso da inoculação bacteriana nos cultivos de cana-de-açúcar.

A redução nos sinais de $\delta^{15}\text{N}$ ocorreu no primeiro ciclo, apresentando em média os valores de $\delta^{15}\text{N}$ que reduziram de +6,87 ‰ para +6,21 ‰ e por fim para +5,88 ‰ dos 120, 240 e 360 DAP, respectivamente (Tabela 16).

Por outro lado, há relatos que o tipo de solo influencia na detecção da contribuição da FBN pela técnica de abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$. Oliveira et al. (2003) avaliando a eficiência da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em duas variedades de cana-de-açúcar cultivadas em três tipos de solo (Argissolo, Latossolo e Luvisolo), observaram que o solo influenciou na detecção da FBN pela técnica de abundância natural do isótopo ^{15}N . Plantas cultivadas em Latossolo não apresentaram FBN, diferentemente do que ocorreu com as plantas que foram cultivadas nos solos Argissolo e Luvisolo, que tiveram FBN para ambas as variedades. Os pesquisadores nesse trabalho comentaram que a detecção da FBN não foi possível no Latossolo, provavelmente por causa do grande uso de adubações nitrogenadas usadas em experimentos anteriores.

Para que a técnica da abundância natural seja mais eficiente, é necessário que o N disponível seja oriundo, apenas do solo e da atmosfera. As plantas têm que ter abundâncias diferentes de $\delta^{15}\text{N}$ e pequena variabilidade biológica entre as espécies (BODDEY et al., 2000).

Fatores como: diferença das espécies utilizadas no estudo, diferença espacial do solo ocupado pela raiz, podem ser determinantes no distanciamento dos resultados da realidade e causar variações de sinais de $\delta^{15}\text{N}$ do N disponível para as plantas. Assim, é importante selecionar plantas referências que tenham o máximo de semelhanças com a planta alvo; outra alternativa seria realizar coletas pareadas da planta fixadora e da

planta referência, ou seja, coletar a planta fixadora e a planta referência que estiver ao seu lado (PATE et al., 1994; HOGBERG, 1997; ESMEYER-LIU et al., 2012; BAPTISTA et al., 2014).

Outro fator que pode influenciar a estimativa da FBN pelo método da abundância natural do $\delta^{15}\text{N}$ é o uso adequado do valor B na fórmula de cálculo da contribuição da FBN. Este valor de $\delta^{15}\text{N}$ deve ser obtido da planta alvo, cultivada na ausência de N, cuja nutrição nitrogenada dependa exclusivamente do N_2 atmosférico (HOGBERG, 1997; BODDEY et al., 2000). Hogberg (1997) e relata que um fator determinante que influencia no sucesso da quantificação do N elementar por meio do uso da técnica de abundância natural do isótopo $\delta^{15}\text{N}$ é o padrão isotópico do sistema, corroborando com os resultados encontrados por Oliveira et al. (2003).

4.9. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) estimada pelo balanço total de nitrogênio no sistema solo/planta

A contribuição da FBN não se diferenciou estatisticamente entre os tratamentos inoculados e as testemunhas para ambas as variedades avaliadas (Tabela 17).

A comparação entre o grupo de tratamentos inoculados e as testemunhas indicou que não houve diferença na contribuição da FBN, ou seja, a inoculação, o N aplicado no plantio e o cultivo de plantas sem inoculação de bactérias e sem N tiveram contribuições semelhantes (Tabela 17). Essa constatação valida o que se observou na atividade da nitrogenase, ou seja, todas as plantas fixaram N do ar atmosférico (Tabela 14). Parte dele foi para as plantas e outra parte foi enriquecer o solo. O método da abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ não permitiu quantificar quanto foi para a planta, o que permitiria também quantificar quanto da FBN enriqueceu o solo.

Tabela 17. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em função da inoculação de bactérias em duas variedades de cana-de-açúcar no primeiro ciclo de cultivo estimada pelo balanço total de nitrogênio no sistema solo/planta até a profundidade de 0,40 m

Tratamento	Conteúdo de N na planta	N inicial (solo)	N aplicado	N irrigação	N precipitação pluvial kg ha ⁻¹	N semente	N final (solo)	N sistema solo/planta ⁽¹⁾	Balanço de N ⁽²⁾
Variedade RB 92579									
TA	138b	1.768a	0	0,1	0,5	11,5	1.917a	2.055a	275a
TN	205a	1.546a	40	0,1	0,5	11,5	1.729a	1.934a	336a
BURK	136b	1.697a	0	0,1	0,5	11,5	1.763a	1.900a	263a
MB	200a	1.701a	0	0,1	0,5	11,5	1.903a	2.103a	390a
STENNO	145b	1.732a	0	0,1	0,5	11,5	1.772a	1.917a	173a
PANTOE	134b	1.612a	0	0,1	0,5	11,5	1.751a	1.885a	380a
Contrastes para balanço de N									
	Inoculados versus Ta				Inoculados versus TN				
Teste t (p>0,05)	0,286 ^{ns}				- 0,382 ^{ns}				
Teste F (p>0,05)	0,082 ^{ns}				0,146 ^{ns}				
Variedade RB 867515									
TA	113b	1.721a	0	0,1	0,5	8,6	1.830a	1.943a	214a
TN	215a	1.740a	40	0,1	0,5	8,6	1.855a	2.070a	281a
BURK	199b	1.605a	0	0,1	0,5	8,6	1.758a	1.957a	343a
MB	213a	1.424a	0	0,1	0,5	8,6	1.719a	1.932a	499a
STENNO	164b	1.681a	0	0,1	0,5	8,6	1.864a	2.028a	338a
PANTOE	129b	1.727a	0	0,1	0,5	8,6	1.839a	1.967a	231a
Contrastes para balanço de N									
	Inoculados versus Ta				Inoculados versus TN				
Teste t (p>0,05)	1,722 ^{ns}				0,891 ^{ns}				
Teste F (p>0,05)	2,966 ^{ns}				0,794 ^{ns}				

Letras minúsculas iguais na coluna indicam que os efeitos estudados não diferem pelo teste de Scott Knott (p>0,05). ^{ns} Não Significativo.

⁽¹⁾N no sistema solo/planta = (Conteúdo de N + N final); ⁽²⁾Balanço de N = (N no sistema solo/planta) - (N inicial + N aplicado + N Irrigação + N precipitação pluvial + N semente. Testemunha Absoluta (TA) e Nitrogenada (TN); Tratamento *Burkholderia* (BK), *Pantoea* (PT) e *Stenotrophomonas* (ST).

Foram quantificadas todas as entradas de N no sistema solo-planta, como o N do fertilizante nitrogenado usado na adubação de fundação, o N da água da precipitação pluvial, o N da água de irrigação e o N da semente. No entanto, ao analisar os resultados é notória a contribuição da FBN como pode ser visto no balanço de N, que apesar das diferentes fontes terem contribuído para o N do sistema solo/planta, o balanço de N continuou positivo.

Assim, é pertinente afirmar que houve uma fonte externa de N e que essa fonte pode ser decorrente de diferentes fatores, como:

1. Atuação das bactérias inoculadas, sendo estas endofíticas facultativas, promotoras de crescimento vegetal;
2. Bactérias nativas, tais como os gêneros bacterianos (*Burkholderia*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*), confirmados por Silva (2011) e Lima (2012), que verificaram a presença deste e outros gêneros diazotróficos da população bacteriana da mesma localidade que o do presente trabalho e, que estes por sua vez, apresentaram características positivas, para a avaliação *in vitro* e em casa-de-vegetação, conforme constatou Lima (2012);
3. N depositado através da água da chuva, 0,004375% aos 120 e 240 DAP, 0,006125% aos 360 DAP, a água de irrigação 0,00525%, e quando se extrapola esses valores para a precipitação e a irrigação durante todo o ciclo da cana planta, a estimativa foi de 0,5 kg ha⁻¹ de N oriundos da água da chuva. Urquiaga et al. (2012) relataram que a contribuição anual de N precipitado pela água da chuva chegou a 5,42 kg ha⁻¹.
4. Degradação da palhada (folhas e ponteiro) da cana-de-açúcar deposta ao longo do período experimental, que de acordo com a literatura apresentam valores que variam de aproximadamente 15 a 50 kg ha⁻¹ relativos à estimativa da contribuição de N referente a estes resíduos (VITTI et al., 2008). Semelhantemente, a este, o presente trabalho, que tem o conteúdo de N para folhas e ponteiro aos 360 DAP, que no caso é relativa à contribuição de N depositado no solo no final do período experimental, que para folha foi de 18,58 e 41,25 kg/ha, e o do ponteiro foi 34,66 e 44,70 kg/ha, para as variedades RB92579 e RB867515, respectivamente (Tabela 7);

5. Decomposição da própria matéria orgânica do solo, que estava em torno de 5,11 e 5,76 g k⁻¹ para as profundidades 0-20 e 20-40 cm, respectivamente.
6. Profundidade do sistema radicular pode ter influenciado na avaliação do balanço do N, pois varia a profundidade de acordo com a variedade, solo, época de avaliação e etc. Farias et al. (2008) quantificaram raízes de cana-de-açúcar ao longo do ciclo da cultura observando que a profundidade de maior densidade radicular é de 0,0-0,4 m, com uma representatividade de 100% até os 98 DAP e de aproximadamente 85% a partir dos 171 DAP, indicando que as camadas superficiais do solo possuem maior influência do sistema radicular.

Além do teor de N presente nas sementes de plantas de cana-de-açúcar, que foram na ordem de 11,5 e 8,6 kg ha⁻¹ de N, para as variedades, RB92579 e a RB867515, respectivamente (Tabela 17).

Diante dos resultados, podemos inferir que a cana-de-açúcar respondeu de forma positiva a inoculação dos gêneros bacterianos (*Burkholderia*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*) utilizados, pois os tratamentos inoculados tiveram um desempenho semelhante ao da TN (Tabela 17). Esse comportamento foi observado nas diferentes variáveis fisiomorfológicas, além das bioquímicas e até mesmo no balanço de N, onde foi detectado contribuição da FBN, através da avaliação do sistema solo/planta ao longo do período experimental do ciclo da cana-de-açúcar.

Urquiaga et al. (2012) avaliando a contribuição da FBN através do balanço de N no sistema solo/planta, em nove variedades de cana-de-açúcar durante 15 anos consecutivos, observaram o saldo positivo de N, correspondentes a FBN com valores que variaram de 920 a 1.896 kg N ha⁻¹ nos tratamentos inoculados.

4.10. Produtividade agrícola (TCH), produtividade industrial (TPH) e açúcares totais recuperáveis (ATR)

De forma geral, foi observado que as variedades tiveram comportamentos semelhantes, independente dos tratamentos para as variáveis, produtividade agrícola (TCH) e açúcares totais recuperáveis (ATR). Para a variável produtividade industrial (TPH), as variedades se diferenciaram de acordo com o tratamento, ou seja, a variável TPH foi dependente da variedade, havendo efeito de interação (Tabela 18).

Tabela 18. Produtividade agrícola e industrial de cana-de-açúcar, variedades RB 92579 e RB 867515, inoculada com bactérias diazotróficas, no primeiro ciclo de cultivo. Foi realizada análise da variância, coeficiente de variação dos dados e contrastes ortogonais por variedade

Variedade	Produtividade agrícola (TCH)							Produtividade industrial (TPH)							Açúcares totais recuperáveis (ATR)						
	Tratamento						Média	Tratamento						Média	Tratamento						Média
	TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST		TA	TN	BK	MB	PT	ST	
							Mg ha ⁻¹								kg Mg ⁻¹						
RB 579	120	119	151	125	137	125	130	19,4Aa	21,1Aa	23,6Aa	18,4Ba	21,3Aa	20,2Aa	20,6	154	149	154	173	150	157	156
RB 7515	132	108	129	138	132	119	126	21,1Aa	15,6Bb	21,0Aa	23,8Aa	22,9Aa	17,7Ab	20,4	154	152	158	165	160	156	157
Média	126b	114b	140a	131a	134a	122b		20,2	18,3	22,3	21,1	22,1	18,9		154b	150b	156b	169a	155b	156b	
F (Var.)	0,664 ^{ns}							0,223 ^{ns}							0,125 ^{ns}						
F (Trat.)	3,653 ^{**}							5,022 ^{**}							2,671 [*]						
F (Int.)	1,970 ^{ns}							7,216 ^{***}							0,603 ^{ns}						
C.V. (%)	10,92							10,09							6,91						

	Produtividade agrícola (TCH)		Variedade RB 92579 Produtividade industrial (TPH)		Açúcares totais recuperáveis (ATR)	
	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN
Teste t (p>0,05)	1,830 ^{ns}	1,936 ^{ns}	1,271 ^{ns}	- 0,179 ^{ns}	0,695 ^{ns}	1,608 ^{ns}
Teste F (p>0,05)	3,349 ^{ns}	3,747 ^{ns}	1,615 ^{ns}	0,032 ^{ns}	0,483 ^{ns}	2,587 ^{ns}

	Variedade RB 867515		Produtividade agrícola (TCH)		Produtividade industrial (TPH)		Açúcares totais recuperáveis (ATR)	
	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN	Inoculados versus TA	Inoculados versus TN
Teste t (p>0,05)	- 0,362 ^{ns}	2,781 ^{**}	0,211 ^{ns}	5,021 ^{***}	0,940 ^{ns}	1,265 ^{ns}	0,883 ^{ns}	1,600 ^{ns}
Teste F (p>0,05)	0,131 ^{ns}	7,734 ^{**}	0,045 ^{ns}	25,215 ^{***}	0,883 ^{ns}	1,600 ^{ns}	0,883 ^{ns}	1,600 ^{ns}

Letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas iguais na linha indicam que os efeitos estudados não diferem pelo teste de Scott Knott (p>0,05). ^{ns} Não Significativo; *, **, e *** Significativo a 0,1; 1 e 5% de probabilidade, respectivamente. Testemunha Absoluta (TA) e Nitrogenada (TN); Tratamento *Burkholderia* (BK), *Pantoea* (PT) e *Stenotrophomonas* (ST).

Pereira et al. (2013) avaliando diferentes variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas observaram que diferenças significativas entre as variedades podem estar ligadas a características específicas de cada genótipo, além de rusticidade, diferença de respostas a adubação e precocidade.

A produtividade agrícola (TCH), apresentou entre os tratamentos acréscimos de 16% (MB), 23% (BK) e 18% (PT) na média em relação ao valor da testemunha nitrogenada (TN), que apresentou a menor média (114 Mg ha^{-1}) (Tabela 18). Similarmente, a variável ATR teve uma menor concentração de açúcar (150 Kg Mg^{-1}) na TN e aumento da ordem de 12% para a MB. Os demais tratamentos inoculados e TA não diferiram da TN e tiveram valores que variaram de 154 Kg Mg^{-1} (TA) a 156 Kg Mg^{-1} (BK e PT) (Tabela 18).

Para a produtividade industrial (TPH) as médias variaram de 18,40 a 23,78 Mg ha^{-1} . Para a variedade RB92579, os valores de TPH não se diferenciaram estatisticamente entre os tratamentos inoculados, diferindo apenas o tratamento MB quando comparado entre as variedades, com a menor média ($18,4 \text{ Mg ha}^{-1}$). Na variedade RB 867515 os tratamentos BK ($21,0 \text{ Mg ha}^{-1}$), MB ($23,8 \text{ Mg ha}^{-1}$), PT ($22,9 \text{ Mg ha}^{-1}$) e TA ($21,1 \text{ Mg ha}^{-1}$) tiveram uma maior TPH que a TN ($15,6 \text{ Mg ha}^{-1}$), enquanto que o tratamento ST ($17,7 \text{ Mg ha}^{-1}$) não diferiu da TN (Tabela 18).

Assim, a inoculação de bactérias promoveu aumento e/ou manteve os valores equiparados ao tratamento da TN e TA para a variável TCH e ATR nos diferentes tratamentos.

O grupo dos tratamentos inoculados na variedade RB 867515 foi responsável por aumentos consideráveis e significativos de produtividade agrícola e industrial em relação a testemunha nitrogenada (TN) e não se diferenciou desta mesma testemunha, quando a variedade foi a RB 92579. No entanto, em nenhuma das variedades os tratamentos inoculados se diferenciaram da testemunha absoluta (TA).

A inoculação das bactérias não se limitou a fornecer N por meio da FBN. A quantidade de N nas plantas inoculadas foi semelhante ao TN, o que levaria a crer que a produtividade também fosse. No entanto, ela foi maior e mais consistente, provavelmente porque outros benefícios proporcionados pelas bactérias tornaram as plantas mais produtivas.

Era de se esperar que isto também tivesse acontecido com a testemunha absoluta. Neste caso, especificamente, é provável que isso não tenha ocorrido devido à

elevada resposta destas plantas ao P adicionado no plantio. Os teores de P no solo eram muito baixos (Tabela 1). Adicionalmente, essas plantas possuem os mesmos gêneros que também foram inoculados, só que em quantidade menor do que as inoculadas, assim, a testemunha absoluta pode ter sido influenciada e por isso não ocorreu a diferenciação em relação aos tratamentos inoculados.

A testemunha absoluta que não foi inoculada e nem recebeu N produziu colmo e açúcar, tanto quanto os tratamentos de inoculação e foi superior ao que produziu o tratamento nitrogenado. Os valores elevados de produtividade agrícola encontrados neste trabalho nas duas variedades estudadas na TA podem estar relacionadas, segundo Schultz et al. (2012), a fatores inerentes ao ciclo da cana-de-açúcar e às condições de implantação e condução do ensaio, como por exemplo: preparo e correção do solo; nutrientes adicionados, aos toletes utilizados como mudas, além da elevada precipitação pluviométrica.

Trabalhos como os de Silva (2011) que isolou bactérias da rizosfera, das folhas e do rizoplane de variedades comerciais (RB 92579, RB 867515 e RB 863129) de cana-de-açúcar na área deste ensaio, além de Lima (2012) e Ramos (2011) que analisaram a comunidade rizosférica e endofítica de raiz nas variedades RB 92579 e RB 867515, que também realizaram o trabalho nas proximidades da área experimental desta pesquisa e encontraram bactérias potencialmente promotoras do crescimento vegetal nos diferentes nichos estudados. As bactérias isoladas, nos trabalhos citados acima, possuíam capacidade de fixar N, solubilizar fosfato inorgânico e produzir Acido indol acético, eram pertencentes a diferentes gêneros, dentre estes gêneros se encontravam os gêneros utilizados na inoculação do presente trabalho, tais como: *Burkholderia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *enterobacter* (SILVA, 2011; LIMA, 2012), *Klebsiella* (SILVA, 2011) e *Stenotrophomonas* (LIMA, 2012).

Respostas positivas da inoculação em plantas de cana-de-açúcar foram encontrada por Reis et al. (2009), que testaram um inoculante contendo uma mistura de cinco linhagens bacterianas (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *Burkholderia tropica*), funcionais para a FBN, em duas variedades de cana-de-açúcar RB 72454 e RB 867515, cultivadas em Cambissolo, Argissolo e Planossolo. Esses pesquisadores observaram que no primeiro ano de plantio, apenas a variedade RB 867515 respondeu positivamente a inoculação, tendo uma maior produtividade (142 Mg ha⁻¹).

Schultz et al. (2012) avaliando inoculação de bactérias diazotróficas em diferentes variedades de cana-de-açúcar cultivadas em um Cambissolo Flúvico eutrófico, observaram que as variedades tiveram comportamentos diferentes em relação a inoculação e que a RB867515 apresentou maior desempenho e maior produtividade, 157,2 e 81,4 Mg ha⁻¹, para o tratamento com inoculação de plantas de cana-de-açúcar no primeiro ciclo do cultivo e no ciclo subsequente, respectivamente. Estas produtividades foram similares aos tratamentos com adubação nitrogenada (120 kg ha⁻¹ de N).

5. CONCLUSÕES

- A inoculação de bactérias fixadoras de N em cana-de-açúcar nas variedades RB 92579 e RB 867515 promoveram o desenvolvimento de ambas as variedades e também apresentaram performance semelhante;
- Os gêneros bacterianos *Burkholderia*, *Pantoea* e *Stenotrophomonas* utilizados na inoculação individualmente, bem como a mistura bacteriana promoveram o crescimento vegetal da cana-de-açúcar ao longo do ciclo da cultura;
- As variáveis TCH, ATR, TPH, atividade da enzima nitrogenase e o balanço do N foram influenciadas positivamente pela inoculação bacteriana.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Embora a inoculação de bactérias diazotróficas no primeiro ciclo de cultivo da cana-de-açúcar ter influenciado positivamente o crescimento da cultura, faz-se necessário continuar a avaliação dessa inoculação nas socarias para que se conheça o potencial promotor de crescimento vegetal desencadeado pelos gêneros bacterianos *Burkholderia*, *Pantoea* e *Stenotrophomonas* utilizados na inoculação individualmente, bem como a mistura bacteriana;
- Em estudos futuros, para fazer o balanço do N, deve-se realizar abertura de perfis do solo para ver até que profundidade se encontra as raízes da espécie estudada, além de determinar a compactação do solo no início e final do período experimental, evitando superestimação da FBN;

- Quando for avaliar a funcionalidade das diazotróficas em plantas de cana-de-açúcar, além de mensurar a FBN, lembrar de avaliar outras funcionalidades envolvidas com a promoção de crescimento vegetal nas plantas, como por exemplo, verificar a solubilização de fosfato, produção do ácido indol acético, entre outras.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2015 - Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab 2015.

ADÃO, N. M. L. **A degradação ambiental no Brasil colônia: relatos para reflexões contemporâneas.** Educação Ambiental em Ação, n. 20, 28 maio 2007. Disponível em: < <http://www.revistaea.org/artigo.php?idartigo=477&class=20>>. Acesso em: 09 de março de 2013.

AHMED, R.; KHATTAK, S. W.; SIRAJ, K. Impact of area under cultivation, credit disbursement and fertilizers off-take on sugarcane production: an econometric analysis. **Journal of global innovation in agricultural and social sciences.** v. 2, n.4, p.185-189. 2014.

ALEXANDER WITT, KRIS SKENDE, AND ANDREI CIMPAN. Biofuels in An e-book on strategies for sustainability. **Massachusetts Academy of Mathematics and Science.** 2012.

ALMEIDA, A. C. S.; SOUZA, J. L.; TEODORO, I.; BARBOSA, G. V. S.; MOURA FILHO, G.; FERREIRA JÚNIOR, R. A. Desenvolvimento vegetativo e produção de variedades de cana-de-açúcar em relação a disponibilidade hídrica e unidades térmicas. **Ciência Agrotecnica.** Lavras, v. 32, n. 5, p. 1441-1448, 2008.

ALMEIDA, F. F. D. **Atividade das enzimas nitrogenase e nitrato redutase em plantas de feijoeiro oriundas de sementes com diferentes teores de molibdênio.** 2010, 67 p. Dissertação (Mestrado), UFRRJ, Rio de Janeiro, 2010.

ALVES, B. J.; SANTOS, J. C. F.; segundo URQUIAGA.; BODDEY, R. M. Métodos de determinação do nitrogênio em solo e planta. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola.** EMBRAPA. 1994, 542p. (EMBRAPA. Documentos 46).

ALVES, B.J.R.; ZOTARELLI, L.; JANTALIA, C.P.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. **Emprego de isótopos estáveis para o estudo do carbono e nitrogênio no sistema solo-planta.** In: AQUINO, A.M.; ASSIS, R.L. (Org.). Processos biológicos no sistema soloplanta: Ferramentas para uma agricultura sustentável. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. v.1, p.343-368.

AMARGER, N.; MARIOTTI, A.; MARIOTTI, F. et al. Estimate of symbiotically fixed nitrogen in field grown soybeans using variations in ^{15}N natural abundance. **Plant and Soil**, v. 52, n. 2, p. 269-280, 1979.

ANDREOTE, F. D.; LACAVAL, P. T.; AZEVEDO, J. L. **Diversidade molecular de microorganismos endofíticos**. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SILVA SANTOS, C. E. R. Microorganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. 1Ed. Guaíba. Agrolivros. 2008, p. 233-258.

ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 40, n. 3, p. 417-432, 2009.

ARAÚJO, A. M. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SALCEDO, I. H. Mineralização do carbono em amostras armazenadas de solo cultivado com cana-de-açúcar, ao longo de dez anos, com e sem fertilização nitrogenada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, n. 1, p. 43-53, 2001.

AUGSTBURGER, F.; BERGER, J.; CENSKOWSKY, U.; HEID, P.; MILZ, J.; STREIT, C. **Organic Farming in the Tropics and Subtropics - Exemplary Description of 20 Crops (Sugarcane)**. NATURLAND. 2000. 20 p.

BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALDANI, J.I.; KIRCHHOF, G. & DÖBEREINER, J. *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **ANAIAS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS**, v. 69, p. 116, 1997.

BAPTISTA, R. B. et al. Variations in the ^{15}N natural abundance of plant-available N with soil depth: Their influence on estimates of contributions of biological N_2 fixation to sugar cane. **Applied Soil Ecology**, v. 73, p. 124-129, 2014.

BARROS, J. D. S.; CHAVES, L. H. G.; CHAVES, I. B.; FARIAS, C. H. A.; PEREIRA, W. E. Estoque de carbono e nitrogênio em sistemas de manejo do solo, nos tabuleiros costeiros paraibanos. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 26, n. 1, p. 35-42, 2013

BERTRAND, H.; PLASSARD, C.; PINOCHET, X.; TOURAINE, B.; NORMAND, P.; CLEYET-MAREL, J. C. Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Canadian Journal of Microbiology* v. 46, n. 3, p. 229-236, 2000.

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

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 2003, 41p.

BERTON, G. S. **Análise de crescimento e produtividade de sete clones de cana-de-açúcar, em cana-soca, cultivados no município de paranavaí-pr**. 2014. 68 p. Dissertação (mestre em Ciências). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; segundo URQUIAGA. Quantificação da fixação biológica de nitrogênio associada a plantas utilizando o isótopo ¹⁵N. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. 1994, 542p. (EMBRAPA. Documentos 46).

BODDEY, R. M.; segundo URQUIAGA.; ASSIS, R. L.; DOBEREINER, J. **Fixação biológica de nitrogênio por bactérias associadas à cana-de-açúcar**. EMBRAPA-CNPBS. 1992.

BODDEY, R. M.; PEOPLES, M. B.; PALMER, B.; DART, P. Use of ¹⁵N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v.57, n. 3, p. 235-270, 2000.

BODDEY, L. H. et al. **A Avaliação da Fixação Biológica de N₂ Associada a Leguminosas e Não-Leguminosas Utilizando a Técnica da Redução do Acetileno: História, Teoria e Prática**. Seropédica - RJEmbrapa Agrobiologia, 2007.

BOMFETI, C. A.; FLORENTINO, L. A.; GUIMARÃES, A. P.; CARDOSO, P. G.; GUERREIRO, M. C.; MOREIRA, F. M. S. Exopolysaccharides produced by the symbiotic Nitrogen-fixing bacteria of leguminosae. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 35, n. 3, p. 657-671, 2011.

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

Cana-de-açúcar. MAPA, Ministério da agricultura. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acessado em: 17/12/2015.

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

CASTRO, C. M.; ALVES, B. J. R.; ALMEIDA, D. L.; RIBEIRO, R. L. D. Adubação verde como fonte de nitrogênio para a cultura da berinjela em sistema orgânico. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 39, n. 8, p. 779-785, 2004.

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

CARVALHO, L. C.; BUENO, R. C. O. F.; CARVALHO, M. M.; FAVORETO, A. L.; GODOY, A. F. Cana-de-açúcar e álcool combustível: histórico, sustentabilidade e segurança energética. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.16, p. 530-543. 2013.

Censo varietal e de produtividade em 2011. Centro de tecnologia canavieira – CTC. Piracicaba, 2011.

Conab Companhia Nacional De Abastecimento. **Cana-de-açúcar**. v. 1, n. 4, (2015) – Brasília: Conab, 2015.

CHENEBY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAULT, C., GERMON, J. C. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 34, n. 2, p. 121-128, 2000.

CIVIERO, J.C. **Arranjo de plantas em cana-de-açúcar: comportamento do sistema radicular, análise de crescimento, componentes morfológicos e de produção**. 2014. 192p. Tese de Doutorado. Curitiba: Universidade Federal do Paraná.

COLE, J.R.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; BANDELA, A.M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing my RDP space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 169-172, 2007.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro** – Região Sul /– Brasília: MMA, 2011. 934p.

DOBEREINER, J.; DAY, J. M.; DART, P. J. Fixação de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum notatum* e da cana-de-açúcar. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 8, n. 7, p. 153-157, 1973.

DUARTE, A. M. A. **Crescimento e maturação da cana-de-açúcar, sob condições de cultivo irrigado, em Janaúba-MG**. 2009. 57 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.

EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**/ editor técnico, Fábio Cesar da Silva. -2.ed. ver. Amp – Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627p.

EMBRAPA. **Análise quantitativa de crescimento em cana-de-açúcar: uma introdução ao procedimento prático**/ editor técnico, Andreson Carlos Marafon. - 1.ed. – Aracaju, SE: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012. 29 p. (Documento 168)

ESMEIJER-LIU, A.J.; KÜRSCHNER, W.M.; LOTTER, A.F.; VERHOEVEN, J.T.A.; GOSLAR, T.SA. Stable carbon and nitrogen isotopes in a peat profile are influenced by early stage diagenesis and changes in atmospheric CO₂ and N deposition. **Water Air and Soil Pollution**. v. 223, n. 5, p. 2007-2022, 2012.

FAGAN, E. B.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A.; CASAROLI, D.; SIMON, J.; DOURADO NETO, D.; LIER, Q. J.; SANTOS, O. S.; MÜLLER, L. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja – revisão. **Revista da FZVA**. v. 14, n. 1, p. 89-106, 2007.

FARIAS, A. R. B.; LIMA, D. R. M.; LIRA-CADETE, L.; RAMOS, A. P. S.; SILVA, M. C. B.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAI, J. Promoção de crescimento vegetal de feijão comum por bactérias isoladas de cana-de-açúcar. **Pesquisa agropecuária pernambucana**. v. 17, n. único, p. 101-104, 2012.

FARIAS, C. H. A.; FERNANDES, P. D.; AZEVEDO, H. M.; DANTAS NETO, J. Índices de crescimento da cana-de-açúcar irrigada e de segueiro no Estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 12, n. 4, p. 356-362, 2008.

FERRARA, F. I. S.; OLIVEIRA, Z. M.; GONZALES, H. H. S.; FLOH, E. I. S.; BARBOSA, H. R. Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. **Plant Soil**. v. 347, n. 1-2, p. 409-417, 2012.

FERNANDES, M. F.; PROCÓPIO, S. O.; TELES, D. A.; SENA FILHO, J. G.; CARGNELUTTI FILHO, J. G.; ANDRADE, C. R. Crescimento e fixação de nitrogênio de *Gluconacetobacter diazotrophicus* na presença de inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. **Revista Ciência Agrária**, v. 56, n. 1, p. 12-18, 2013.

FRACETTO, F. J. C.; FRACETTO, G. G. M.; CERRI, C. C.; FEIGL, B. J.; SIQUEIRA NETO, M. Estoques de carbono e nitrogênio no solo cultivado com mamona na caatinga. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 5, p. 1545-1552, 2012.

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant Soil**. v. 321, n. 1-2, p. 35-59, 2009.

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S. **Abundância natural do 15N para a quantificação da fixação biológica de nitrogênio em plantas**. capítulo 5. 505-517 In: Figueiredo, M. V.; Burity, H. A.; Oliveira, J. P.; Santos, C. E. R. S.; Stamford, N. P. *Biotechnology Aplicada a Agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais*. Brasília, DF : Embrapa informação tecnológica; Recife, PE: Instituto agrônômico de Pernambuco (IPA), 2010, 761 p.

GALVANI, F.; GAERTNER, E. **Adequação da Metodologia Kjeldahl para determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta**. Circular técnica 63. (Embrapa. 2006).

GASCHO, G.J.; SHIH, S.F. Sugarcane. In: Teare, ID.; PEET, M.M.; **Crop – Water relations**. New York: John Wiley, 1983. 547p.

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

GÍRIO, L. A. S.; DIAS, F. L. F.; REIS, V. M.; SEGUNDO URQUIAGA (3), 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**. Brasília, v.50, n.1, p.33-43, 2015.

GOES, T.; MARRA, R. **A expansão da cana-de-açúcar e sua sustentabilidade**, Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2008/A%20expansao%20da%20cana-de-acucar%20e%20a%20sua%20sustentabilidade.pdf>>. Acesso em 11 de maio de 2013.

HARDY, R. W. F.; BURNS, R. C.; HOLSTEN, R. D. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 5, n. 1, p. 47-81, 1973.

HARTMANN, A.; LEMANCEAU, P.; PROSSER, J. I. Multitrophic interactions in the rhizosphere. Rhizosphere microbiology: at the interface of many disciplines and expertises. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology**. v. 65, n. 2, p. 179- 179, 2008.

HOFFMAN, J. R.; FALVO, M. J. Protein – which is best. **Journal of Sports Science and Medicine**. v. 3, n. 3, p. 118-130, 2004.

HOGBERG, P. 15N natural abundance in soil-plant systems. *New Phytologist*, Oxford, v. 137, p. 179-203,1997.

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

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; CAMPO, R. J.; GALERANI, P. R. **Adubação nitrogenada na soja?** Londrina: Embrapa Soja, 1997. 4 p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 57).

IPA– Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária.**Recomendações de adubação para o Estado de Pernambuco**. 2ª ed. Recife, 2008. 198p.

ISLAM, M. R; MADHAIYAN, M; DEKA, BORUAH, H. P; YIM, W; LEE, G;S ARAVANAN, V. S; FU, Q; HU, H; SA, T. Characterization of plant growth-promoting traits of free-living diazotrophic bacteria and their inoculation effects on growth and nitrogen uptake of crop plants. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 19, n. 10, 1213-1222, 2009.

KRAISER, T.; GRAS, D. E.; GUTIÉRREZ, A. G.; GONZÁLEZ, B.; GUTIÉRREZ, R. A. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n.4, p. 1455-1466, 2011

KINKEL, L.L., WILSON, M., AND LINDOW, S.E. Plant species and plant incubation conditions influence variability in epiphytic bacterial population size. **Microbiology Ecology**. v. 39, n. 1, p. 1-11, 2000.

KUKLINSKY-SOBRAAL, J; ARAUJO, W.L; MENDES, R; GERALDI, I. O; PIZZIRANI-KLEINER, A. A; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**. v. 6, n. 12, p. 1244-1251, 2004.

LEPSCH, I. F. **19 lições de pedologia**. São Paulo: Oficina de textos, 2011.

LIMA, D. R. M. **Bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco**. 2012. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo). UFRPE, Recife-PE, 2012.

LIMA NETO, J. F. et al. Avaliação agroindustrial e parâmetros genéticos de clones UFRPE de cana-de-açúcar no litoral norte de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 18, n. 1, p. 8–13, 2013.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, 2001.

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

LONG, H. H, SCHMIDT DD, BALDWIN IT. Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. **PLoS ONE**.v. 3, n. 7, p. 2702. 2008.

MACEDO, I. C. A Energia da Cana-de-açúcar – **Doze estudos sobre a agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil e a sua sustentabilidade**. Berlendis & Vertecchia. São Paulo: SP. Única – União da Agroindústria Canavieira de São Paulo, 2005. 231 p.

MALAVOLTA, Eurípides. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações/Eurípedes Malavolta, Godofredo Cesar Vitti, Sebastião Alberto de Oliveira.—2. ed., ver. e atual. **Piracicaba: Potafos**, 1997.

MARCOS, F. C. C.; IÓRIO, R. P. F.; SILVEIRA, A. P. D.; RIBEIRO, R. V.; MACHADO, E. C.; LAGÔA, A. M. M. A. Endophytic bacteria affect sugarcane physiology without changing plant growth. **Bragantia, Campinas, Ahead of print**, 2016 (DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.256>)

Manual de métodos de análise de solos / organizadores, Guilherme Kangussú Donagema... [et al.]. — Dados eletrônicos. — Rio de Janeiro : Embrapa Solos, 2011. 230 p. - (Documentos / Embrapa Solos, ISSN 1517-2627 ; 132)

MARAFON, A. C.; **Análise Quantitativa de Crescimento em Cana-de-Açúcar: uma Introdução ao Procedimento Prático**. Aracaju, EMBRAPA, 2012. 29 p. (Documentos, 168).

MARAFON, A. C.; **Análise Quantitativa de Crescimento em Cana-de-Açúcar: uma Introdução ao Procedimento Prático**. Aracaju, EMBRAPA, 2012. 29 p. (Documentos, 168).

MARIN, V. A.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. I. **Fixação biológica de nitrogênio: Bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical**. Embrapa. 2010. Infoteca. Informação Tecnológica em Agricultura. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/598661/1/doc091.pdf> > Acessado: 12 de março de 2013.

MARQUES, D. **Guia da cana-de-açúcar/Avanço científico beneficia o país**. Conselho de Informações sobre Biotecnologia. **2009**. Disponível em: http://www.cib.org.br/pdf/guia_cana.pdf. Acessado: 12 de março de 2013.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MINCHIN, F. R. **O método da redução do acetileno. Técnicas auxiliares nos estudos de microbiologia do solo**. 437 – 447 p. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. EMBRAPA. 1994, 542p. (EMBRAPA. Documentos 46).

MIRANDA, C. H. B.; VIEIRA, A.; CADISCH, G. Determinação da Fixação Biológica de Nitrogênio no Amendoim Forrageiro (*Arachis* spp.) por Intermédio da Abundância Natural de ¹⁵N. **Revista Brasileira Zootecnia**. v. 32, n. 6, p. 1859-1865, 2003.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. Minas Gerais: Editora UFLA, 2006. 729p.

NASCIMENTO, H. H. C.; PACHECO, C. M.; LIMA, D. R. M.; SILVA, E. C.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; Aspectos ecofisiológicos de mudas de *Hymenaea*

courbaril L. em resposta a supressão de N, P e K. **Scientia Florestais**.v. 42, n. 103, p. 315-328, 2014.

NATURLAND. **II Special section: Organic Farming in the Tropics and Subtropics / Sugarcane.** 2000 Disponível em: <<http://www.naturland.de/fileadmin/MDB/documents/Publication/English/sugarcane.pdf>> Acessado em: 14 de março de 2013.

NELSON, D. L.; MICHAEL, M. C. **Princípios de Bioquímica de Lehninger** - 6ª Ed. 2014 editora Artmed. 2014.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science.** 2010.

OLIVEIRA, P. J.; SILVA, M. L. R. B.; LIRA, M. C. C. P.; BURITY, H. A. **Fixação de N₂ associativa e em vida livre.** In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. Microorganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. 97- 118, 2008.

PARK, K.H; LEE, C.Y; SON, H.J. Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. **Applied Microbiology.** v. 49, n. 2, p. 222–228, 2009.

PATE, J. S.; UNKOVICH, M. J.; ARMSTRONG, E.L.; SANFORD, P. Selection of reference plants for 15N natural abundance assessment of N₂ fixation by crop and pasture legumes in southwest Australia. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 45, p. 165-181, 1994.

PEDRAZA, R.O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology.** v. 125, n. 1 ,p. 25-35, 2008.

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 de Ciência Agronômica**, v. 44, n. 2, p. 363-370, 2013.

PRAKAMHANG, J.; MINAMISAW, K.; TEAMTAISON, K.; BOONKERD, N. & TEAUMROONG, N. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). **Applied Soil Ecology**, v. 42, n. 1,p. 141- 149, 2009.

RDP. Ribosomal database project. Disponível em : < <http://pyro.cme.msu.edu/>>. Acesso em: 1 nov. 2011.

REIS JUNIOR, B. F.; MENDES, I.C.; REIS, V. M.; HUNGRIA, M. **Fixação Biológica de Nitrogênio: uma revolução na agricultura.** Distrito Federal: Embrapa Cerrados, 2008. 32p.

REIS JUNIOR, F. B.; FARIA, S. M.; MENDES, I. C.; SIMON, M. F.; LOUREIRO, M. F.; ELLIOT, G. N.; YOUNG, P.; SPRENT, J. **“Beta-Rizóbios”**: os novos simbiotes encontrados em espécies de *Mimosa*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. 20 p (Embrapa Cerrados. Documentos 153).

REIS, V. M.; URQUIAGA.; PEREIRA, W.; HIPÓLITO, G.; OLIVEIRA, R. P.; LEITE, J. M.; BAPTISTA, R. B.; MORAES, R. F.; SCHULTZ, N. **Eficiência agrônômica do inoculante de cana-de-açúcar aplicado em três ensaios conduzidos no Estado Rio de Janeiro durante o primeiro ano de cultivo**. Embrapa Agrobiologia (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 45). 2009.

RODRIGUES, J.D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu: Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista, 1995. 99p. (Apostila).

ROMAGNOLI, E. M. **Diversidade e abundância de fixadores de nitrogênio de vida livre e micro-organismos amônio-oxidantes em solos de Mata Atlântica do Estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado), USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2010.

SACRAMENTO, B. L.; CRUZ, T. S.; SILVA, L. L.; MOTA, K. N. A. B.; AZEVEDO NETO, A. D. Pigmentos e teores de solutos orgânicos em plantas de aguapé sob estresse salino. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18, p. 3344, 2014.

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

SANTOS, J. M.; PIETRAFESA, J.P.; CAMPOS, F.I. **Cultura da cana-de-açúcar, créditos de carbono e desafios da sustentável**. 2008. 133 p. Dissertação (Mestrado multidisciplinar em sociedade, tecnologia e meio ambiente). Anápolis: Unievangélica, 2008.

SANTOS, R. L. **Molibdênio no metabolismo e fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar**. 2014. 135 p. Tese (Doutor em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.

SCHULTZ, N.; MORAIS, R. F.; SILVA, J. A.; BAPTISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P.; LEITE, J. M.; PEREIRA, W.; CARNEIRO JÚNIOR, J. B.; ALVES, B. J. R.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; Segundo URQUIAGA; e 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.

SIMÕES NETO, D. E. et al. Níveis críticos de fósforo em solos cultivados com cana-de-açúcar em Pernambuco. **Revista Ceres**, v. 58, n. 6, p. 802–810, 2011.
SILVA, M. O.; FREIRE, J. F.; LIRA JUNIOR, M. A.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; COSTA, D. P.; LIRA-CADETE, L. Isolamento e prospecção de bactérias

endofíticas e epifíticas na cana-de-açúcar em áreas com e sem cupinicida. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 1113-1121, 2012.

SENTHILKUMAR, M.; ANANDHAM, R.; MADHAIYAN, M.; VENKATESWARAN, V.; SA, T. **Endophytic bacteria: Perspectives and Applications in Agricultural Crop Production**, 61-96 p. in: MAHESHWARI, D. K. *Bacteria in agrobiolology: Crop ecosystems*. 2011, 434 p. disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/978-3-642-83560/#section=883595&page=4&locus=50>> acessado em: 14/03/2012.

SHEARER, G.; KOHL, D.H. N₂-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 13, n. 6, p. 699-756, 1986.

SILVA, M. O. 2011. 69 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) **Bactérias associadas à cana-de-açúcar: isolamento e potencial promocional de crescimento vegetal**. UFRPE, Recife-PE, 2011.

SILVA, M.F.; OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; REIS, V. M. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. **Pesquisa agropecuária brasileira**. v. 44, n. 11, p. 1437-1443, 2009.

SILVEIRA, A. J. **Química orgânica teórica**. 1º edição. Belém-Pa. edtAedi. 2014.

STURZ, A.V., CHRISTIE, B.R., AND NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 19, n.1, p. 1-30, 2000.

"sugarcane." **Encyclopaedia Britannica. Britannica Academic. Encyclopædia Britannica Inc.**, 2015. Web. 22 Dec. 2015. <<http://academic-eb-britannica.ez19.periodicos.capes.gov.br/EBchecked/topic/571999/sugarcane>>.

TAÍZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. Trad. SANTARÉM, E.R. et al., 3º ed., Porto Alegre: Artemed, 2004, p.719.

TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V. M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant Soil**. v. 347, n. 1-2, p. 1-400, 2011.

TEIXEIRA, D. T. F.; NOGUEIRA, G. A. S.; MALTAROLO, B. M.; ATAÍDE, W. L. S.; OLIVEIRA NETO, C. F. Alterações no metabolismo do nitrogênio em plantas de noni sob duas condições hídricas. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11, n.22, p. 89-106, 2015.

TERUEL, D. A.; BARBIERE, V.; FERRARO JÚNIOR, L. A. Sugarcane leaf area index modeling under different soil water condintios. **Scientia Agrícola**, v.54, n. SPE, p.93-44, 1997.

THEODORO, A. D. **Expansão da cana-de-açúcar no Brasil: ocupação da cobertura vegetal do Cerrado**. (TCC)- Araçatuba, SP: Fatec, 2011.

TILAK, S., ABU-GHAZALEH, N. & HEINZELMAN, W.B. **Storage management in wireless sensor networks**. Mobile, Wireless and Sensor Networks, John Wiley publishers, 2006.

URQUIAGA; 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 Soil**. v. 356, n. 1-2, p. 5-21. 2012.

VASCONCELOS, P. H. C. Uma História Feita de Açúcar e Álcool: apontamentos para uma discussão. **Revista Crase.edu**. A revista do e-Tec Brasil - IFG/Campus Inhumas. 2010.

VITOUSEK, P. M.; MENGE, D. N. L.; REED, S. C.; CLEVELAND, C. C. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. **Royal societypublishing**. 9p.Downloaded from <http://rstb.royalsocietypublishing.org/> on March 16, 2016

VITTI, G.C.; MAZZA, J.A. Planejamento, estratégias de manejo e nutrição da cultura de cana-de-açúcar. Piracicaba: POTAFOS, 2002. 16p. (Encarte técnico/Informações Agronômicas, 97).

YEMM, E. W.; COCKING, E. F. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, n. 948, p. 209-214, 1955.